

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Петровська Уляна Василівна

УДК 615.32:582.661.15:54.061/.062

ДИСЕРТАЦІЯ

Фармакогностичне вивчення шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.)

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

У.В. Петровська

Науковий керівник Журавель Ірина Олександрівна, доктор фармацевтичних наук,
професор

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Список публікацій здобувача

1. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення жирнокислотного складу в насінні шпинату городнього сорту «Фантазія». *Фітотерапія. Часопис*. 2017. № 3. С. 55-58. (Особистий внесок – огляд літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту).
2. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів в листі шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.). *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 28. С. 29-33. (Особистий внесок – огляд літературних джерел, планування та проведення

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANNOTATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

herb extracts as per Ukrainian State Pharmacopeia.

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

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

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

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

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

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

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО (Огляд літератури)	28
1.1 Ботанічна характеристика шпинату городнього	28
1.2 Хімічний склад шпинату городнього	30
1.3 Фармакотерапевтичні властивості шпинату городнього	42
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, ПРИЛАДИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ, ВИКОРИСТАНІ В ДОСЛІДЖЕННЯХ	49
2.1 Об'єкти дослідження	49
2.2 Короткі відомості про прилади, методи і реактиви	49
2.3 Методики якісного та кількісного аналізу БАР	51
2.4 Методики визначення показників якості за вимогами ДФУ та технологічних параметрів сировини	68
2.5 Методики дослідження фармакологічної активності	71
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БАР У СИРОВИНІ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО	75
3.1 Дослідження вуглеводів	75
3.2 Дослідження карбонових кислот	77
3.3 Дослідження нітрогенвмісних сполук	87
3.4 Дослідження фенольних сполук	95
3.5 Дослідження ізопренових сполук	108
3.6 Дослідження мінерального складу	119
Висновки до розділу 3	122

РОЗДІЛ 4	СТАНДАРТИЗАЦІЯ	СИРОВИНИ	ШПИНАТУ	
	ГОРОДНЬОГО	ТА	ОДЕРЖАНОГО	ЛІКАРСЬКОГО
	ЗАСОБУ,	ОБГОВОРЕННЯ	ЙОГО	ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ
	АКТИВНОСТІ			128
4.1	Визначення	числових	показників	якості та
	технологічних	параметрів		129
4.2	Дослідження	макро- та	мікроскопічних	ознак
	шпинату	городнього	листя	131
4.3	Стандартизація	шпинату	городнього	листя
				135
4.4	Розробка	технології	одержання	шпинату
	городнього	листя	екстракту	густого
				146
4.5	Фітохімічне	вивчення	шпинату	городнього
	екстракту	густого		157
4.6	Стандартизація	шпинату	городнього	листя
	екстракту	густого		164
4.7	Обговорення	фармакологічної	активності	шпинату
	городнього	листя	екстракту	густого
				174
Висновки до розділу 4				181
ВИСНОВКИ				185
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ				189
ДОДАТКИ				208

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

2,4-ДНФГ – 2,4 – динітрофенілгідразон

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

ААС – атомно-абсорбційна спектроскопія

АТФ – аденозинтрифосфат

БАР – біологічно активні речовини

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія

ГХ – газова хроматографія

ГЦ А– геміцелюлоза А

ГЦ Б – геміцелюлоза Б

КТ – каталаза

МКЯ – методи контролю якості

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ПР – пектинові речовини

ПХ – паперова хроматографія

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК-АП – тіобарбітурової кислоти активні продукти;

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ЦП – церулоплазмін

Час утр. – час утримування

DRPH· – 1,1-дифеніл-2-пікрілгіразил

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Звіти ВООЗ вказують, що кількість хворих із патологіями печінки у світі щорічно збільшується на 60 мільйонів. За останні 20 років їх число зросло на 60 % і має тенденцію до подальшого росту. В Україні, за останніми даними літератури, частота виявлення аномалій гепатобіліарної системи зросла на 70-80 %. У загальній структурі захворювань разом із іншими патологіями травної системи вони посідають третє місце за поширеністю.

Печінка є одним з найбільших залозистих органів, за участі якого відбуваються життєвонеобхідні біохімічні процеси, пов'язані з метаболізмом та детоксикацією організму. Цей орган має унікальну здатність до регенерації та компенсації неітеративних уражень. Однак, тривала дія ксенобіотиків та токсинів, зокрема, їх здатність до посиленої генерації активних форм кисню, вірусні захворювання та жирове переродження печінки негативно впливають на здатність гепатоцитів до відновлення, призводять до втрати їх функціональності, дисбалансу ферментної системи, що згодом може стати причиною летальних наслідків. Незважаючи на значну кількість досліджень, які були проведені з метою лікування різних печінкових хвороб по всьому світу, на теперішній час існує потреба у пошуку ефективних та безпечних гепатопротекторних препаратів, які здатні посилювати процеси регенерації клітин печінки.

Ліки природного походження були невід'ємною частиною медицини з давніх часів. Статистичні дані вказують, що завдяки доведеній безпечності, ефективності та доступності, такий вид терапії використовує близько 88% населення планети для первинної медико-санітарної допомоги та тривалого лікування. Тому пошук нових перспективних джерел лікарських рослинних засобів є важливим завданням сучасної фармацевтичної науки.

Сьогодні зростаючий інтерес викликають рослини, що здавна культивуються для сільськогосподарських потреб завдяки своїм цілющим властивостям та забезпеченій сировинній базі. Однією з них є шпинат городній. Закордонними

дослідниками було вивчено хімічний склад флавоноїдів (Barkat N., 2017; Aboshi T. et al., 2018; Schlering C. et al., 2020), каротиноїдів (Andjelkovic M. 2008; Kennedi E. V. та Devarajan N., 2011; Mendelová A. et al. 2014), вітамінів (Mane P. C. et al., 2015; Panda V. та Shinde P., 2017; Ohidul I. et al., 2018; Schlering C. et al., 2020) та мінеральних елементів (Narsing Rao G. et al., 2015; Bader A. A. et al., 2016; Zhu S. et al., 2019) листя шпинату городнього. Дослідження показали, що хімічний склад листя шпинату городнього може суттєво варіюватись залежно від сорту. Проте, комплексних порівняльних фармакогностичних досліджень коренів, листя та насіння цієї рослини не проводилось. Роботи вітчизняних дослідників пов'язані із особливостями селекції (Позняк О. В. та Чабан Л. В., 2017) або присвячені технології вирощування (Прудкий Р. І., 2019; Алексейчук О. М., 2019; Вдовенко С. А., 2020) шпинату городнього.

За даними літератури, екстракти із листя шпинату городнього мають широкий спектр фармакологічної дії: антибактеріальну, антигельмінтну, протівірусну, протипухлинну, імуномодулюючу, антиексудативну, протидіабетичну, противиразкову, кардіо- та нейропротекторну, а також здатні знижувати рівень печінкових маркерів у крові, що свідчить про їх гепатотропність. Проте, на сьогоднішній день в Україні відсутні лікарські засоби на основі шпинату городнього.

Трава шпинату городнього входить до Фармакопеї Народної Республіки Китай, а листя – до Аюрведичної Фармакопеї Індії та Американської Трав'яної Фармакопеї. В Україні шпинат городній належить до нефармакопейних рослин, а його сировина потребує стандартизації. Зважаючи на зростаючу популярність шпинату городнього серед аграріїв України, що свідчить про його забезпечену сировинну базу та перспективність хімічного складу цієї рослини для розробки нових лікарських засобів з антиоксидантною та гепатопротекторною дією, комплексне фармакогностичне вивчення сировини шпинату городнього вітчизняних сортів Красень Полісся і Фантазія та розробка лікарських засобів на її основі є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану МОЗ і НАМН України та є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і завдання дослідження

Метою дисертаційної роботи було комплексне фармакогностичне вивчення коренів, листя та насіння шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.) сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженого листя цієї рослини вітчизняного виробництва, розробка лікарського рослинного засобу на їх основі, стандартизація рослинної сировини та одержаного лікарського рослинного засобу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- здійснити пошук та узагальнити дані сучасної наукової літератури стосовно ботанічної характеристики, хімічного складу та фармакотерапевтичних властивостей шпинату городнього;
- провести комплексне фармакогностичне вивчення якісного складу та кількісного вмісту досліджуваних зразків сировини: коренів, листя та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія;
- вибрати перспективну сировину для одержання лікарського рослинного засобу;
- дослідити морфолого-анатомічну будову, визначити числові показники якості за вимогами ДФУ та технологічні параметри обраної сировини;
- розробити технологію одержання лікарського засобу з обраної сировини, дослідити його хімічний склад;
- стандартизувати лікарську рослинну сировину та одержаний на її основі лікарський рослинний засіб;
- провести дослідження фармакологічної активності одержаного лікарського засобу *in vitro* та *in vivo*.

Об'єкт дослідження – комплексне дослідження коренів, листя та насіння

шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, замороженого листа цієї рослини вітчизняного виробництва та одержаного на їх основі лікарського засобу.

Предмет дослідження – вивчення якісного складу та визначення кількісного вмісту основних груп БАР у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, замороженому листі шпинату городнього вітчизняного виробництва та лікарському рослинному засобі на їх основі, стандартизація сировини шпинату городнього та лікарського засобу на її основі, дослідження фармакологічної дії одержаного лікарського рослинного засобу.

Методи дослідження

Якісний склад БАР вивчали за допомогою хімічних реакцій, хроматографічних методів (ПХ, ТШХ, ВЕРХ, ГХ) та ААС. Кількісний вміст БАР визначали методами ВЕРХ, ГХ, ААС, абсорбційної спектрофотометрії, титриметрії, гравіметрії, поляриметрії та К'ельдаля. Дослідження анатомічної будови проводили за допомогою методу світлової мікроскопії. Фармакологічну активність досліджували *in vitro* та *in vivo*. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за вимогами ДФУ з використанням комп'ютерної програми Statistica 10,0.

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше проведено комплексне порівняльне фармакогностичне вивчення коренів, листа та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженого листа цієї рослини. Для досліджуваної сировини вивчено якісний склад та визначено кількісний вміст полісахаридів, ПР, ГЦ А, ГЦ Б, крохмалю, клітковини, органічних, зокрема, аскорбінової та щавлевої, жирних та амінокислот, протеїну, поліфенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, хлорофілів а і b, каротиноїдів, суми стероїдних сполук, мінеральних елементів.

Досліджено морфолого-анатомічну будову та визначено числові показники якості шпинату городнього листа.

Уперше визначено технологічні параметри шпинату городнього листа.

Уперше одержано шпинату городнього листа екстракт густий та проведено його фітохімічне вивчення.

Уперше запропоновано критерії стандартизації для шпинату городнього листя та шпинату городнього листя екстракту густого.

Уперше *in vitro* досліджено антимікробну та антиоксидантну, *in vivo* – гепатопротекторну властивість шпинату городнього листя екстракту густого.

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

Практичне значення отриманих результатів

Результати морфолого-анатомічного вивчення шпинату городнього листя були використані про розробці інформаційного листа про нововведення у галузі охорони здоров'я «Макро- та мікроскопічні ознаки листя прикореневої розетки шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.)» (2018 р.).

Розроблено технологію одержання шпинату городнього листя екстракту густого.

Дані фармакогностичних досліджень покладено в основу проєктів МКЯ «Шпинату городнього листя», «Шпинату городнього листя екстракт густий».

Результати фітохімічного вивчення сировини шпинату городнього впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри хіміко-фармацевтичних дисциплін АО «Національний Медичний університет»; кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету; кафедри фармації Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова; кафедри фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії ПВНЗ «Київський медичний університет»; кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів НМАПО імені П. Л. Шупика; кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором здійснено:

- пошук, аналіз та узагальнення даних літератури за темою дисертаційної роботи;

- досліджено якісний склад та визначено кількісний вміст вуглеводів, карбонових кислот, нітрогенвмісних, фенольних та ізопренових сполук, мінеральних елементів у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженому листі цієї рослини вітчизняного виробництва;

- досліджено морфолого-анатомічну будову, визначено числові показники якості та технологічні параметри для шпинату городнього листя;

- розроблено технологію одержання та проведено фітохімічне вивчення шпинату городнього листя екстракту густого;

- запропоновано параметри стандартизації та розроблено проекти МКЯ «Шпинату городнього листя», «Шпинату городнього листя екстракт густий»;

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Журавель І. О., Гуцол В. В., Могильною О. М., Гур'євою І. Г., Никифоруком А. Я., Фірою Л. С., Кисличенко В. С.

Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведені разом з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017» (г. Минск, 17-19 апреля 2017 г.); 69-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (г. Витебск, 19-20 апреля 2017 г.); XII научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году молодежи» «Роль молодежи в развитии медицинской науки» (г. Душанбе, 28 апреля 2017 г.); Міжнародній науково-практичній конференції «Промислова фармація: етапи

становлення та майбутнє» (м. Харків, 29-30 вересня 2017 р.); 8th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice «Science and Practice» (Kaunas, 15th of December 2017); I Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (м. Харків, 5 квітня 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (м. Харків, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційний розвиток: освіта та наука XXI століття» (м. Київ, 19 червня 2018 р.); I науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (м. Харків, 18 жовтня 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті д. хім. н., проф. Н. П. Максютіної (до 95-річчя від дня народження) «PLANTA+. Досягнення та перспективи» (м. Київ, 20-21 лютого 2020 р.); II Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (м. Харків, 11 березня 2020 р.).

Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 226 сторінках машинописного тексту, складається із анотації, вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 165 машинописних сторінок. Робота проілюстрована 31 таблицею та 69 рисунками. Список використаних джерел налічує 180 найменувань, із них 63 кирилицею та 117 латиницею.

РОЗДІЛ 1

БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО (Огляд літератури)

1.1 Ботанічна характеристика шпинату городнього

Шпинат городній (*Spinacia oleracea* L.) є одним із трьох представників роду Шпинат (*Spinacia* L.), до якого належать також шпинат чотирьохтичинковий (*Spinacia tetrandra* Steven ex M.Bieb.) та шпинат туркестанський (*Spinacia turkestanica* Iljin.) [28, 65, 128].

Деякі джерела літератури вказують, що довгий час цей рід належав до родини Лободові (*Chenopodiaceae* Vent.) [28, 119, 128, 148, 149, 155, 158]. За більш сучасною класифікацією його відносять до родини Амарантові (*Amaranthaceae* Juss.) [28, 81, 119, 128, 134, 138, 144, 149].

Назва роду походить від персидського слова «اسپاناخ» (Äspänākh), що в перекладі означає «зелена рука», і є етимологічно зближеною формою до німецького слова «spina» – «голка, шип» за зовнішнім виглядом плодів його стародавнього прародича [28, 55].

Шпинат городній – здебільшого однорічна трав'яниста рослина, яка сягає в висоту від 30 до 90 см [28, 81, 134, 149]. Коренева система рослини стрижнева [28]. На початку вегетації рослини утворюється розетка великих листків, а згодом – прямостояче, соковите, не опушене стебло зеленого кольору з бурим відтінком, переріз якого має округлу форму [28, 83, 128, 148, 149].

Листки прості, цілокраї або глибоко зубчасті, не опушені, від 2 до 30 см завдовжки та 1-15 см завширшки, яйцеподібної або овальної форми з трикутною основою та заокругленою верхівкою. За текстурою можуть бути гладенькими або зморшкуватими [119, 134, 141, 145, 155]. Нижні листки, як правило, більші за розміром, мають довгі черешки, стеблові – дрібні, сидячі [81, 83, 119, 128]. Перші 4 - 6 листків розташовуються парами, верхні – чергові зі спіральним

розташуванням [28, 128, 134, 149].

Рослина перехресно-запилювана, роздільностатева, частіше дводомна [28, 149, 155]. Квітки непримітні, жовто-зеленого кольору, діаметром 3-4 мм, зібрані в колосоподібне суцвіття. Чоловічі квітки верхівкові, зібрані у колосо-волотеподібне суцвіття. Їх віночок і чашечка чотирьохроздільні, проте зустрічаються квітки і з 5 пелюстками, 4-5 тичинок з великими парними пиляками, які містять дрібний жовтий пилок. Жіночі квітки – сидячі або мають невелику квітконіжку, розташовані в пазухах листків. Віночок цих квіток майже шароподібний, 2-4-зубчастий. Чашечка з двома рогоподібними виростами, які поступово перетворюються у шипи при утворенні насіння [28, 55, 119, 128, 134, 148, 149].

Плоди – округлі колючі горішки, зібрані у гроно розміром близько 5-10 мм, які в процесі дозрівання насіння зростаються у грона [28, 65, 83, 119]. Насінини великі, кулеподібні, до 3 мм у діаметрі, забарвлені переважно у світло-коричневий колір із гладенькою поверхнею або колючими виростами [149, 155].

Існує декілька теорій з приводу походження шпинату [81, 102, 128, 155, 158, 159]. Згідно однієї з них батьківщиною цієї рослини вважають країни Південно-Західної Азії, зокрема Іран, Ефіопію, Індію, Афганістан та Кавказ [55, 65, 80, 81, 119, 145, 155, 158].

Перші згадки застосування шпинату в їжу в Древній Персії були датовані II ст. [55, 65]. У Китай шпинат потрапив у VII ст. як подарунок від короля Непалу, куди його завезли по Шовковому шляху [1]. Писемні згадки про вирощування шпинату на території арабського Середземномор'я в 827 році збереглися у медичному трактаті Аль-Разі та сільськогосподарських трактатах Ібн Вайшияга, Ібн аль-Аввама та Кусус Аль-Руйя [1, 65]. До Європи ця рослина була завезена в XI ст. сарацинами під час завоювання Сицилії та Іспанії. У XIII-XV ст. шпинат не мав особливої популярності та культивувався, переважно, у монастирських садах італійськими монахами, які споживали його в період Великого посту [1, 65]. У 1390 році шпинат внесено до відомої англійської кулінарної книги «The Forme of Cury» [65]. До Північної Америки шпинат завезли американські колоністи у 1806 р., а з початку XX ст. цей овоч набув широкої популярності у США [1, 65]. На території

Російської Імперії перші згадки про шпинат датуються 1793 р. В Україні рослину вперше почали вирощувати у Києві та Одесі наприкінці XIX ст. [1].

У дикому вигляді шпинат зростає у південних і південно-західних районах Європи, в Криму, на Кавказі та в Середній Азії, а також широко культивується в усьому світі як сільськогосподарська та харчова рослина [81, 102, 128, 145, 155, 158, 159]. Відомо понад дві тисячі сортів цієї рослини [65]. Перший сорт культурного шпинату Савойський був виведений у 1828 р. До 1950 р. уже нараховувалось більше 20 сортів цієї рослини різних за своїм фенотипом [1].

Українськими дослідниками протягом тривалого часу проводились селекційні дослідження, що дозволило вивести безліч нових сортів шпинату городнього адаптованих до культивування в кліматичних умовах лісостепу України. До Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, з 2006 р. по червень 2020 року внесено 23 сорти шпинату городнього [22, 175]. Найпопулярнішими серед них в Україні є сорти вітчизняної селекції Красень Полісся, який вважається еталонним сортом, та Фантазія, виведений у 2010 р. на Дослідній станції "Маяк" Інституту овочівництва і баштанництва НААН (с. Крути, Чернігівська обл.) [52].

Обидва сорти характеризуються високою продуктивністю, стійкістю до стеблуння, подовженою фазою господарської придатності, стійкістю до шкідників і хвороб [52, 59]. Рослини схожі за фенотипом: мають напівприпідняту розетку 14-15 великими, слабопухирчастими, зеленими листками і кулястим неколючим насінням [59]. Проте форма листової пластинки у них різна: у шпинату городнього сорту Красень Полісся вона овальна із заокругленою верхівкою, у сорту Фантазія – трикутна із загостреною верхівкою [27, 52, 59].

1.2 Хімічний склад шпинату городнього

З джерел літератури відомо, що шпинат городній містить різноманітні БАР. Листя шпинату городнього накопичують вітаміни, мікроелементи, вуглеводи, органічні кислоти, флавоноїди, алкалоїди, дубильні речовини, хінони,

каротиноїди, терпеноїди, фітостероїди [28, 73, 80, 81, 128, 132, 134, 138, 144, 145, 155], вільні амінокислоти та бетаїни [28, 120, 155], хлорофіли, сапоніни та ω -3-жирні кислоти [144, 155, 179], фітобатамін, флобатаніни, карденоліди [134, 179]. За інформацією, знайденою в науковій літературі, насіння шпинату городнього накопичує вуглеводи, філохінон, сапоніни, фітостероїди, флавоноїди, глікопротеїни [55, 128, 144, 158], корені – спіростанолові сапоніни [128].

За даними індійських та американських вчених, методом ВЕРХ з електророзпилювальною іонізацією у надземній частині шпинату городнього ідентифіковано флавоноїди рутин, гіперозид, астрагалін, кверцетин, мірицетин, кемпферол, лютеолін, патулетин (рис. 1.1), спінацетин (рис. 1.2), спінатолизид (рис. 1.3), яцеїдин (рис. 1.4) [128, 135, 158, 179], апігенін, мірицитин [119], дайдзеїн, катехін, синапову кислоту [179], 5,3',4'-тригідрокси-3-метокси-6,7-метилендіоксифлавоон-4'-глюкуронід, 5,4'-дигідрокси-3,3'-диметокси-6,7-метилендіоксифлавоон-4'-глюкуронід, 5,4'-дигідрокси-3,3'-диметокси-6,7-метилендіоксифлавоон, 3,5,7,3',4'-пентагідрокси-6-метоксифлавоон, патулетин-3-О-глюкопіранозил-апіофуранозил-глюкопіранозид, патулетин-3-О-глюкопіранозил-глюкопіранозид, спінацетин-3-О-глюкопіранозил-апіофуранозил-глюкопіранозид, патулетин-3-О-кумаройлглюкопіранозил-апіофуранозил-глюкопіранозид, спінацетин-3-О-глюкопіранозил-глюкопіранозид, патулетин-3-О-рамнозидекопіранозил-11-копіранозил-глюкопіранозид, спінацетин-3-О- β -D-(2"-ферулоїлглюкопіранозил-глюкопіранозид, яцеїдин-4-глюкуронід та 5, 4',4' - дигідрокси-3-метокси-6:7-метилендиоксифлавоон-4-глюкуронід [128, 158].

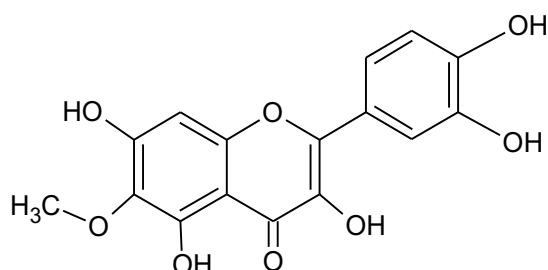


Рис. 1.1 Структурна формула патулетину

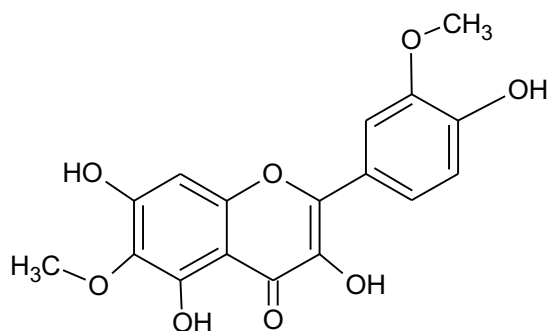


Рис. 1.2 Структурна формула спінацетину

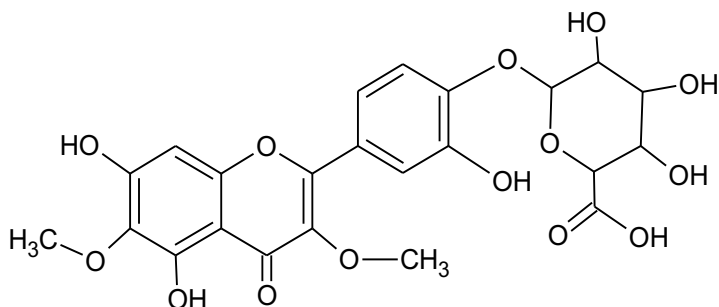


Рис. 1.3 Структурна формула спінатозиду

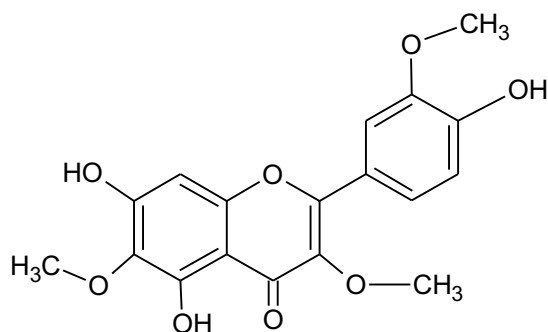


Рис. 1.4 Структурна формула яцеїдину

Тайські науковці спектрофотометричним методом встановили, що листя шпинату городнього містять до 4 мг/100 г флавоноїдів [119].

Американські дослідники методом ВЕРХ-МС ідентифікували у листі шпинату городнього 12 флавоноїдів та встановили, що у цій сировині накопичується від 588 до 954 мкг/г флавоноїдів залежно від стадії вегетації рослини. Серед них превалювали 5,3,4-тригідрокси-3-метокси-6,7-метилендіоксифлаво-4- β -D-глюкуронід та патулетин-3-O- β -D-глюкопіранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-[β -D-апіофуранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-глюкопіранозид, на вміст яких припадало близько 36 та 17 % від загального вмісту відповідно [81].

Німецькі вчені методом ВЕРХ з іонізаційним електророзпиленням та мас-детектуванням спектру визначили, що вміст флавоноїду спіреозиду (рис. 1.5) у листі шпинату городнього був у межах від 9,82 до 10,56 мг/г [69].

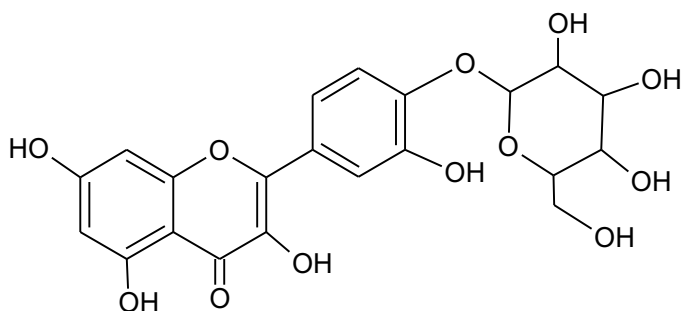


Рис. 1.5 Структурна формула спіреозиду

Вчені із Японії методом ВЕРХ з тандемною мас-спектрометрією та електроспреем ідентифікували у молодому листі шпинату городнього вітексин та його глікозид вітексин-2-О-арабінофуранозид. Аналіз показав, що вміст вітексину в листі шпинату городнього коливався від 74,9 до 211,8 мкг/г, вітексин-2-О-арабінофуранозиду (рис. 1.6) – від 168,6 до 651,5 мкг/г залежно від фази вегетації рослини [98].

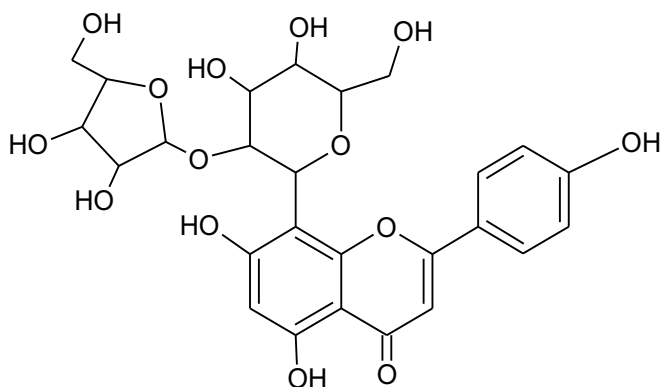


Рис. 1.6 Структурна формула вітексин-2-О-арабінофуранозиду

Іранські науковці за допомогою ВЕРХ аналізу встановили вміст фенольних сполук у водному екстракті з листя шпинату городнього сорту Маркіза, який складав 36,60 мг/г. Домінуючими сполуками в екстракті були кверцетин (119 мг/100 г) та 5,4'-дигідрокси-3,3'-диметокси-6,7- α -метилендіоксифлавонон-4'-О-глюкуронід (37 мг/100 г). Разом з тим, результати показали, що вміст у цьому екстракті апіїну та діосметин-7-апізоїл-глюкозиду сягав 16,11 мг/г та 5,63 мг/г відповідно. Проантоціанідини та катехіни були виявлені в слідових кількостях (<50 мг/кг та <10 мг /кг відповідно) [149]. Американські дослідники у листі шпинату городнього виявили лігнани ларіцірезінол (рис. 1.7), секоізоларіцірезінол та пінорезінол (рис. 1.8) [153].

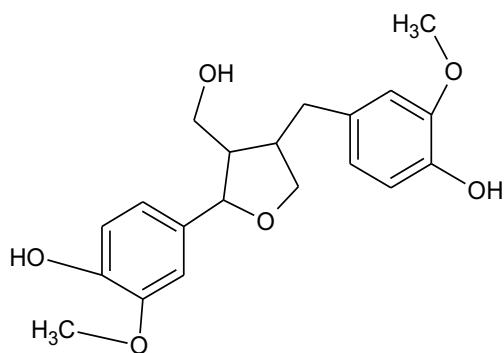


Рис. 1.7 Структурна формула ларіцірезінолу

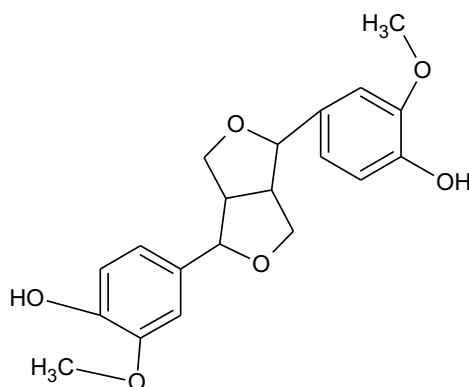


Рис. 1.8 Структурна формула пінорезінолу

Іракські вчені методами ТШХ та ВЕРХ ідентифікували в етанольних та водних екстрактах з листя шпинату городнього кемпферол та кверцетин. За результатами дослідження, у водних та етанольних екстрактах містилося 0,12 % і 0,096 % кемпферолу відповідно, а також 0,12 % і 0,268 % кверцетину відповідно [97].

Пакистанські дослідники методом ВЕРХ з реверсивною фазою за допомогою системи детектування діодного масиву вивчали хроматографічний профіль фенольних сполук у олійних екстрактах з листя шпинату городнього. У ході дослідження було ідентифіковано 22 сполуки, загальний вміст яких становив 37,77 мкг/г. Серед фенолкарбонових кислот переважала *p*-гідроксибензойна кислота (2,90 мкг/г). Крім того, було ідентифіковано галову, елагову та ванілінову кислоти. Домінуючою гідроксикоричною кислотою була *p*-кумарова кислота (1,33 мкг/г), бузкової, неохлаорогенової, хлорогенової та кофейної кислот у олійному екстракті з листя шпинату городнього містилося від 0,15 до 0,65 мкг/г. Серед флавоноїдів за вмістом превалювали діосметин-7-рутинозид (4,25 мкг/г), апігенін (4,11 мкг/г), ізорамнетин-3-(кофеїлдиглюкозид)-7-рамнозид (3,51 мкг/г), кемпферол-3-(*p*-кумароїлдиглюкозид)-7-глюкозид (3,15 мкг/г) та кверцетин-3-(синапоїлдиглюкозид)-7-глюкозид (3,23 мкг/г). Вміст спінацетину глюкуроніду, кемпферолу, кемпферол-3-кумароїлсинапоїлдиглюкозиду, апігенін-2-О-пентоксид-8-гексозиду та кверцетин-3-(*p*-кумароїлдиглюкозид)-7-глюкозиду був у межах 1,2-2,94 мкг/г. Вміст ізорамнетин-3-(гідроксиферулоїлглюкозид)-7-глюкозиду та кверцетин-3-синапоїлсофорозид-7-глюкозиду не перевищував 0,12 мкг/г [180].

Групою науковців із Бельгії та Румунії за допомогою ТШХ у свіжому та замороженому листі шпинату було ідентифіковано та визначено кількісний вміст *о*-кумарової (28-60 мг/кг), *р*-кумарової (10-35 мг/кг) та ферулової (1-30 мг/кг) кислот [158, 173]. Іранськими дослідниками у листі шпинату городнього було виявлено фенольну сполуку апоцинін [155]. Крім того, з сировини шпинату городнього було виділено гідроксикоричні кофейну, хлорогенову, неохлорогенову та протокатехову кислоти [90, 128].

Методом спектрофотометрії румунськими вченими було визначено кількісний вміст фенольних сполук у листі шпинату городнього, який складав 2088 мг/кг у еквіваленті галової кислоти [173]. Аналогічні дослідження американських науковців показали, що вміст поліфенолів у листі шпинату городнього поступово зростає впродовж всього вегетаційного періоду від 885 до 1162 мкг/г у перерахунку на галову кислоту [81]. Проведене німецькими вченими спектрофотометричне визначення суми фенольних сполук за реакцією з реагентом Фоліна-Чокалтеу в листі шпинату городнього показало, що їх вміст не перевищував 11,80 мг/г у перерахунку на катехін [69]. Результати корейських вчених свідчать, що вміст поліфенольних сполук у водних та етанольних екстрактах з листя шпинату значно відрізнявся і становив відповідно 1,5 та 0,5 мг/г у перерахунку на галову кислоту відповідно [74]. Проведене індійськими дослідниками визначення вмісту фенольних сполук спектрофотометричним методом показало, що 96 % етанолом ($112,5 \pm 4,24$ мг/г) екстрагується майже у 1,5 рази більше цих речовин у перерахунку на галову кислоту, ніж петролейним етером ($67,9 \pm 4,40$ мг/г) та 50 % етанолом ($87,5 \pm 2,05$ мг/г) [80].

У листі шпинату городнього виявлено органічні винну та щавлеву кислоти [28, 128, 158]. За даними російських науковців, вміст органічних кислот у свіжому листі шпинату складав близько 0,1 г/100 г, у сухій сировині він коливався від 6,5 до 15,5 % у перерахунку на щавлеву кислоту [28, 55].

Німецькі вчені алкаліметричним методом встановили, що загальний вміст органічних кислот у листі шпинату городнього становив 18,73 мг/г у перерахунку на лимонну кислоту. У ході подальших досліджень було визначено вміст яблучної

(12,63 мг/г) та лимонної (6,19 мг/г) кислоти. Вміст ферулової та щавлевої кислот визначали методом ВЕРХ. За результатами аналізу, у листі шпинату городнього містилося 2,26 мг/г ферулової кислоти. Також було відмічено високий вміст щавлевої кислоти – 55,70 мг/г [69]. У іншому дослідженні виявлено, що шпинат накопичує до 10,11 мг/кг оксалатів [128]. За даними іранських вчених, вміст щавлевої кислоти у насінні шпинату городнього не перевищував 4 мг/г [149].

Швейцарські дослідники методом ГХ у листі шпинату городнього ідентифікували леткі сполуки (E)-3-метиленон-2-ен-4-он, (Z)-3-(3-гексенілокси)-гексаналь, (E)-3-(2-гексанілокси)-гексаналь, алкіл-3-тіофенкарбальдегіди та ізопренову сполуку (E)-6-метил-6-(5-метил-2-фураніл)-3-гептен-2-он (рис. 1.9) [130].

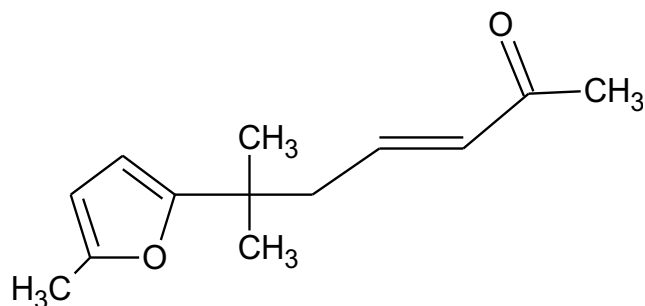


Рис. 1.9 Структурна формула (E)-6-метил-6-(5-метил-2-фураніл)-3-гептен-2-ону

У ході спільних досліджень кенійських та американських вчених встановлено хімічний склад летких компонентів у коренях шпинату городнього методом ГХ з мас-спектрофотометричним детектуванням. У метанольних екстрактах із коренів шпинату городнього було ідентифіковано монотерпенові сполуки α - та β -пінен, лімонен, δ -3-карен і сабінен, сесквітерпени геосмін (рис. 1.10), α - та β -цедрин (рис. 1.11), а також два піразини 2-ізопропіл-3-метоксипіразин та 2-(метокси)-3-(1-метилпропіл) піразин [115].

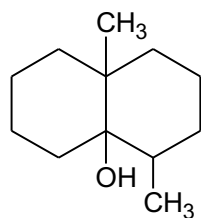


Рис. 1.10 Структурна формула геосміну

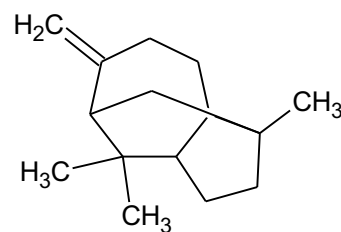


Рис. 1.11 Структурна формула β -цедрину

Американські дослідники встановили, що листя шпинату городнього містить

ланостерол [89]. Іранські та індійські вчені методом ВЕТШХ в 70 % метанольних екстрактах з листя шпинату городнього виявили екдистероїд 20-гідроксiekдизон (рис. 1.12), вміст якого сягав до 0,04 % [132, 149]. Дані індійських науковців вказують на те, що насіння шпинату містить стигмастерол та 20-гідроксiekдизон [128]. Російські дослідники методом ВЕРХ встановили вміст екдистероїдів у насінні шпинату городнього сортів Вікінг, Годрі, Маришка, Вікторія, Нафіс, Стоїк, Застільний, Маркіза та Матадор. Встановлено, що вміст цих сполук коливався від 0,5 до 4 мг/г залежно від сорту, у водному екстракті із листя шпинату городнього вміст цих сполук сягав 20 мг/г [149].

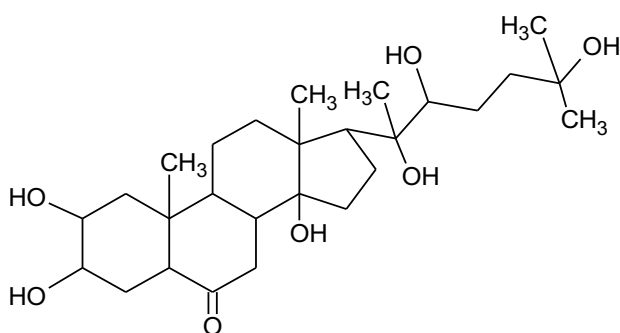


Рис. 1.12 Структурна формула 20-гідроксiekдизону

За інформацією тайських науковців листя шпинату багаті каротиноїдами (17,8 мг/100 г), серед яких превалює β -каротин (5626 мкг /100 г) [119].

Румунські та бельгійські вчені методом ВЕРХ дослідили якісний склад та визначили вміст каротиноїдів у свіжому та замороженому листі шпинату городнього. За результатами цих досліджень, домінуючими каротиноїдами в обох видах сировини були лютеїн (37-53 мкг/г), β -каротин (18-31 мкг/кг), віолаксантин (9-23 мкг/кг) та неоксантин (10-22 мкг/кг) [120, 158, 173]. Методом ВЕРХ було встановлено, що загальний вміст каротиноїдів у листі шпинату городнього німецького походження був у межах від $4,80 \pm 0,75$ мг/г. Домінуючою сполукою у сировині був лютеїн (рис. 1.13) – $1,61 \pm 0,91$ мг/г. Віолаксантину (рис. 1.14) та β -каротину у сировині містилося майже однакова кількість – $1,24 \pm 0,98$ мг/г та $1,36 \pm 0,28$ мг/г відповідно. Найменше у листі шпинату городнього акумулювалось неоксантину (рис. 1.15), вміст якого був у межах 0,26-0,65 мг/г [69]. У літературі є відомості, що листя шпинату, крім перелічених, містять каротиноїд зеаксантин [102, 116, 128, 159].

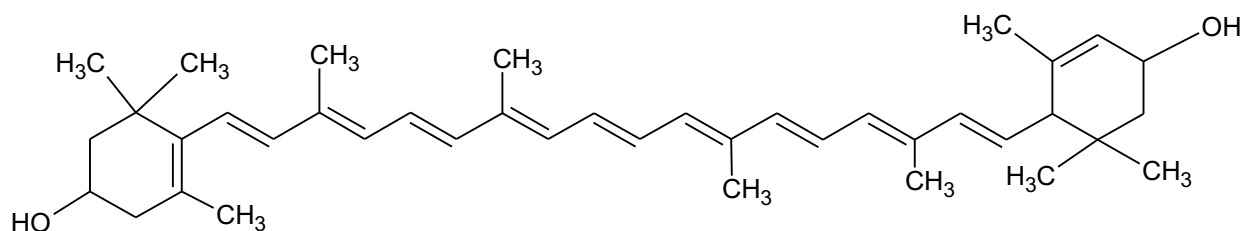


Рис. 1.13 Структурна формула лютеїну

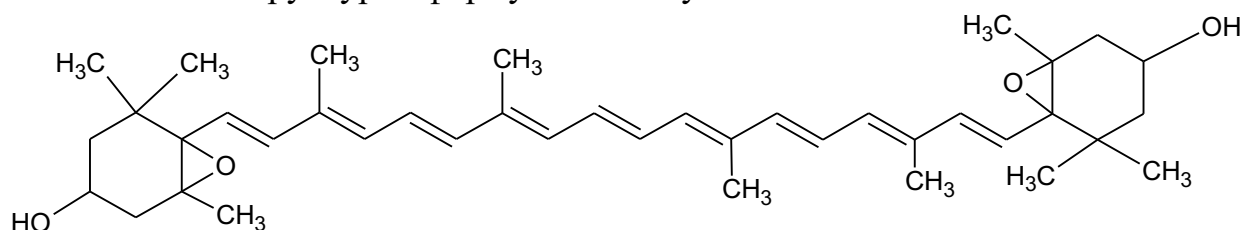


Рис. 1.14 Структурна формула віолаксантину

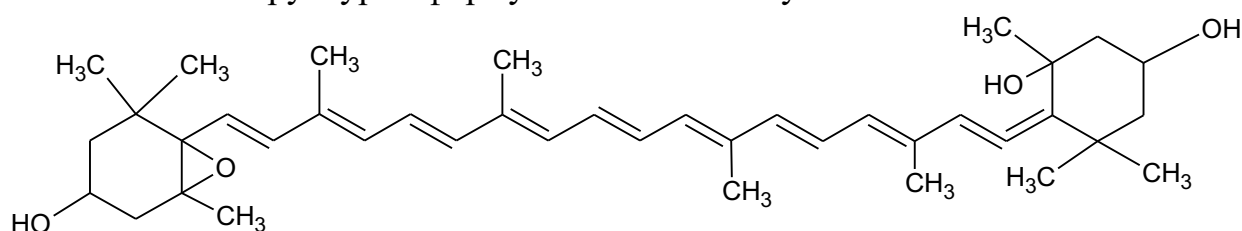


Рис. 1.15 Структурна формула неоксантину

Польські дослідники за допомогою методу ВЕРХ зі спектрофотометричним детектуванням визначили вміст ксантофілів у зразках свіжого та замороженого листя шпинату городнього. Відмічено, що вміст цих БАР у свіжому листі (0,83 мг/г) був майже вдвічі вищим, ніж у замороженій сировині (0,46 мг/г) [125].

Словацькі вчені методом спектрофотометрії визначали вміст каротиноїдів у зразках свіжого та замороженого листя шпинату сортів Боїнг, Гудзон, Чіка, Боа та Бівер. Результати показали, що у свіжому та замороженому листі містилося в середньому 27,21 мг/100 г та 21,29 мг/100 г каротиноїдів відповідно. Хоча дослідники відмічають, що у свіжому листі шпинату городнього сорту Гудзон вміст цих сполук може сягати 37,734 мг/100 г [174].

Американські науковці методом ВЕРХ визначали вміст хлорофілів у ацетонових витяжках із листя шпинату городнього. Результати показали, що вміст хлорофілу а у цій сировині коливався у межах 200-400 мкг/г, хлорофілу b – 160-320 мкг/г залежно від фази вегетації рослини [81]. Спектрофотометричним методом було визначено вміст хлорофілів а та b у свіжому та замороженому листі

шпинату городнього словацьких сортів. Встановлено, що вміст хлорофілу а у листі шпинату городнього коливався від 0,315 до 0,636 мг/г, хлорофілу b – від 0,590 до 1,142 мг/г залежно від сорту. Крім того, відмічено, що вміст цих пігментів у замороженому листі шпинату городнього був приблизно на 20 % нижчий, ніж у свіжих зразках [174].

За даними індійських дослідників, листя шпинату городнього містять вітаміни: каротиноїди (750 мкг/100 г), тіамін (100 мкг/100 г), рибофлавін (250 мкг/100 г), піридоксин (100 мкг/100 г), пантотенову (300 мкг/100 г), фолієву (80 мкг/100 г), аскорбінову (55-80 мг/100 г) кислоти, токоферол (2,5 мг/100 г), біотин (0,1 мкг/100 г), філохінон (482,9 мкг/100 г), холін (18 мг/100 г) [28, 55, 102, 128, 135, 144, 145, 158, 159]. Німецькі вчені методом йодометрії у декількох серіях листя шпинату городнього визначили вміст аскорбінової кислоти, який коливався від 4,42 до 9,90 мг/г [69]. За даними літератури листя шпинату городнього тайського походження містить 937,7 мкг/100 г ретинолу, 53 мг/100 г аскорбінової кислоти та 194 мкг/100 г фолієвої кислоти [119].

Індійські вчені стверджують, що у шпинаті накопичуються мікроелементи: магній (84 мг/100 г), манган, кальцій (73 мг/100 г), фосфор (1 мг/100 г), ферум (10,9 мг/100 г), натрій (206 мг/100 г), цинк, купрум та йод [80, 97, 116, 128, 144, 158]. У іншому дослідженні титриметричним методом було встановлено вміст кальцію ($1348,91 \pm 3,39$ мг/100 г), феруму ($28,65 \pm 1,93$ мг/100 г) та фосфору ($278,7 \pm 2,49$ мг/100 г) [143]. Тайські дослідники зазначають, що листя шпинату городнього накопичують 99 мг/100 г кальцію, 79 мг/100 г магнію та 558 мг/100 г калію [119]. За даними російських науковців, вміст мінеральних елементів у листі шпинату городнього зростав у ряду $Se < Cu < Zn < Mn < Fe < Na < Mg < P < Ca < K$ і був у межах від 1 мкг/100 г до 13,51 мг/100 г для мікроелементів та від 24 до 774 мг/100 г для макроелементів [28]. Методом атомно-емісійної спектроскопії німецькі дослідники встановили вміст калію (78,27-90,68 мг/г), кальцію (10,85-14,94 мг/г), магнію (6,20-7,77 мг/г), феруму (273,68-348,97 мкг/г), цинку (73,63-142,33 мкг/г), мангану (58,30-100,41 мкг/г) та купруму (12,64-15,75 мкг/г) у листі шпинату городнього залежно від кліматичних умов зростання у період з 2015 р. по 2017 р. Методом титриметрії з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності у цій

сировині було визначено вміст аніонів: нітратів (7,73-28,60 мг/г), фосфатів (11,08-17,13 мг/г), сульфатів (2,64-6,56 мг/г) та хлоридів (4,95-8,61 мг/г) [69]. Німецькі дослідники стверджують, що шпинат накопичує до 3,35 мг/кг нітратів [128].

За даними індійських науковців, лист шпинату містить пептиди α - та β -басрубрини [158]. Загальний вміст білка у листі шпинату городнього індійського походження становив близько 28,23 г/100 г [143, 159], у насінні російських сортів він не перевищував 13,8 % [149]. 27 амінокислот було ідентифіковано у листі шпинату городнього методом ВЕРХ. Домінуючими сполуками у цій сировині були глютамінова кислота та лейцин, вміст яких був майже однаковим і складав $13,05 \pm 0,32$ та $11,87 \pm 0,27$ г/100 г. Дещо менше у листі шпинату городнього накопичувалося аланіну ($7,68 \pm 0,21$ г/100 г), аспарагінової кислоти ($9,09 \pm 0,09$ г/100 г) та валіну ($9,24 \pm 0,05$ г/100 г). Вміст аргініну, гліцину, ізолейцину, лізину, фенілаланіну, проліну, треоніну та серину був у межах від 4,38 до 6,64 г/100 г. Цистеїну, гістидину, метіоніну та тирозину накопичувалося не більше 2 % [143]. Італійські дослідники методом ВЕРХ зі спектрофотометричним детектуванням досліджували амінокислотний склад листя шпинату городнього. За результатами було ідентифіковано 14 амінокислот, серед яких переважали гліцин (8,99 мкг/г), серин (3,46 мкг/г), глютамін (3,33 мкг/г), аргінін (0,84 мкг/г) та аланін (0,60 мкг/г) [99].

Методом ВЕРХ групою дослідників із Данії, Фінляндії та США встановлено вміст бетаїну (рис. 1.16) у листі шпинату городнього, який складав 110,0 мг/100 г [79]. Результати ВЕРХ аналізу італійських вчених показали, що в листі шпинату городнього накопичувалося до 11,0 мкг/г бетаїну [99].

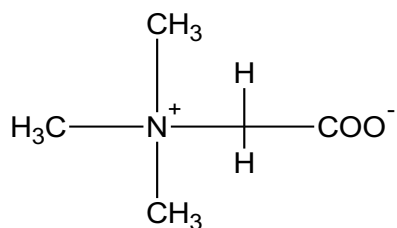


Рис. 1.16 Структурна формула бетаїну

Польські дослідники за допомогою інфрачервоної спектроскопії ідентифікували у бутанольних та 50 % метанольних екстрактах з листя шпинату городнього нітрогенвмісну гетероциклічну сполуку спінацин (рис. 1.17), яка є

конденсованим похідним тетрагідропіридину та імідазолу [92].

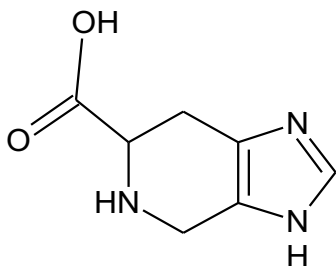


Рис. 1.17 Структурна формула спінацину

У насінні шпинату городнього містяться глікопротеїни моногалактозилдіацилгліцерол, дигалактозилдіацилгліцерол та сульфохіназоїлдіацилгліцерол [55, 128, 144, 158].

Російські науковці встановили, що вміст моно- та дисахаридів у листі шпинату городнього складав близько 1,9 %, полісахаридів – 3-4 %, у тому числі 0,1 % крохмалю [1, 28]. Крім того, листя та насіння шпинату городнього містить геміцелюлозу та пектинові речовини [149].

Німецькими дослідниками у листі шпинату було ідентифіковано D-глюкозу, D-фруктозу, поліоли інозитол (рис. 1.18) та еритритол (рис. 1.19), спектрофотометричним методом визначено їх кількісний вміст [69].

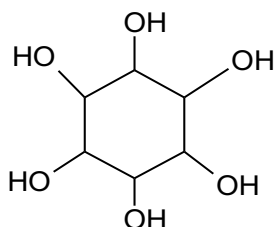


Рис. 1.18 Структурна формула інозитолу

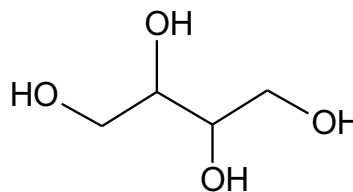


Рис. 1.19 Структурна формула еритритолу

За результатами дослідження вміст D-глюкози у цій сировині становив 50,91-72,92 мг/кг, D-фруктози містилося майже вдвічі менше – 27,70-43,59 мг/кг. Загальний вміст поліолів у листі шпинату городнього не перевищував 5,91 мг/г. При цьому, на вміст інозитолу (0,99-1,68 мг/г) припадало майже 30 % від загального вмісту поліолів. Еритритолу в сировині містилося майже втричі менше – від 0,28 до 0,55 мг/г [69]. Крім того, листя та черешки шпинату накопичують інулін [1].

За твердженням російських вчених, у листі шпинату городнього домінували

ненасичені жирні кислоти, загальний вміст яких складає близько 9,1 г/100 г. Вміст насичених кислот у цій сировині становить 0,1 г/100 г [28].

Індійські науковці методом газової хроматографії ідентифікували у листі шпинату городнього 12 жирних кислот, із яких 5 насичених та 7 ненасичених. Встановлено, що у сировині домінували ненасичені жирні кислоти – 76,1 %. Насичених жирних кислот містилося майже втричі менше – 23,9 %. Серед насичених жирних кислот превалювала пальмітинова кислота (19,7 %). Вміст стеаринової та арахідонової кислот не перевищував 1,5 %. Ліноленова кислота (44,5 %) переважала за вмістом серед ненасичених жирних кислот. Лінолевої кислоти містилося майже вдвічі менше – 22,9 %. Крім них, у незначній кількості у листі шпинату городнього містилися олеїнова (5,4 %) та пальмітолеїнова (2,3 %) кислоти. Вміст ейкозанової, ейкозамоноенової, ейкозадієнової та докозадієнової кислот не перевищував 0,5 % [143]. Іранськими дослідниками у листі шпинату городнього було ідентифіковано капринову та міристинову жирні кислоти [179].

1.3 Фармакотерапевтичні властивості шпинату городнього

За даними літератури, шпинат городній має антиоксидантну, протизапальну, вітрогінну, проносну, імуномодулюючу, тонізуючу, адаптогенну, гіпоглікемічну, сечогінну, жарознижувальну, антибактеріальну, противірусну, антигельмінтну, протипухлинну, противиразкову, антисклеротичну та гепатопротекторну активності [18, 28, 80, 102, 128, 134, 135, 138, 141, 144, 145, 149, 158, 159].

Шпинат городній у традиційній медицині Індії застосовується при застуді, кашлі, болю в горлі, суглобах, попереку, люмбаго, корості, стригучому лишайі, лейкодермії, метеоризмі, ангіні, астмі, сечокам'яній хворобі, захворюваннях жіночих статевих органів, опорно-рухового апарату, проказі, сінній лихоманці та переохолодженнях [18, 28, 128, 138, 144, 158]. Аюрведична медицина рекомендує вживання листя шпинату городнього при хворобах крові, кишечника, нирок, мозку, очей, легень, серця, запальних захворюваннях печінки та жовтяниці, блювоті, колітах, а також для покращення травлення [28, 128, 144, 158]. Насіння шпинату за даними літератури має проносну та жарознижувальну дію. Його використовують при лихоманці, лейкорейі,

люмбаго, утрудненому диханні та сечовиведенні, жовтяниці [128].

У Стародавньому Римі шпинат вважали гарним афродизіаком. Єгиптяни споживали молоді шпинатні листки та насіння для стимуляції лактації та сексуального збудження [55].

У Росії відвар листя шпинату городнього відомий як ефективний народний засіб при лікуванні болю у попереку та за грудиною, туберкульозу, для підвищення імунітету, нормалізації функцій щитоподібної залози, при захворюваннях горла [28].

Російські лікарі стверджують, що регулярне вживання шпинату покращує обмін речовин, перистальтику кишечника, регулює процеси травлення та водний баланс організму, стимулює потенцію, відновлює репродуктивну функцію у чоловіків, сприяє виведенню холестерину, зміцнює капіляри та зубну емаль, нормалізує роботу нервової системи [28]. Дієту збагачену шпинатом рекомендують при анемії, гастриті, ентероколіті, атеросклерозі, гіпертонії, аритмії, інфаркті, інсульті, діабеті, ожирінні, авітамінозі, рахіті, остеопорозі, артриті [28, 144].

Під час Першої світової війни вино настояне на шпинаті давали пораненим французьким солдатам для відновлення сил після значної втрати крові [65]. В іранській традиційній медицині шпинат городній використовують для профілактики, контролю та лікування гемолітичної анемії та тромбоцитопенії [179].

Результати досліджень індійських та американських вчених показали, що вживання дієтичної добавки з листя шпинату покращувало когнітивні функції, пам'ять та впливало на рухливість щурів [128, 159].

Індійські науковці встановили, що метанольні екстракти з листя шпинату городнього пригнічували ріст *Klebsiella pneumoniae* та *Proteus mirabilis*. Водночас, дослідники виявили, що водні та метанольні екстракти з листя шпинату не проявляли антибактеріальної дії по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus subfava*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* [128, 136, 137]. У ході досліджень антибактеріальної активності метанольних, етанольних, етилацетатних та водних екстрактів з листя та стебел шпинату городнього концентрацією від 25 до 75 мг/мл встановлено, що метанольні, етанольні та етилацетатні екстракти з

листя і стебел однаково ефективно пригнічували ріст *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Candida albicans* [120]. При вивченні антибактеріальної активності методом дифузії в агар петролейноестерних, етанольних та 50 % водно-етанольних екстрактів з листя шпинату городнього у порівнянні із амоксициліном, гентаміцином та флуконазолом встановлено, що петролейноестерні екстракти пригнічували ріст *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* та *Escherichia coli*, зона затримки росту яких була в межах 6-9 мм. Етанольні екстракти були ефективні проти *Saccharomyces cerevisiae* (6 мм) та *Aspergillus niger* (11 мм), 50 % водно-етанольні – проти *Staphylococcus aureus* (14 мм) та *Saccharomyces cerevisiae* (7 мм) [80]. При дослідженні антибактеріальної активності методом дифузії в агар Хінтона нігерійські вчені виявили чутливість штамів бактерій *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* до дії етилацетатних екстрактів з листя шпинату городнього [134].

Дослідження *in vitro* показало, що антирадикальна активність ацетонових та метанольних екстрактів з листя шпинату городнього була приблизно на одному рівні. Кількість скавенджерів у цих екстрактах при визначенні спектрофотометричним методом становила 400-570 мкг/г за реакцією з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом та 250-400 мкг/г – з 2,2'-азино-біс-(3-етил-бензотіазолін)-6-сульфоною кислотою [81, 172]. У Бангладеші спектрофотометричним методом визначили антиоксидантний потенціал 90 % метанольних екстрактів з листя шпинату городнього. Встановлено, що у напівефективній дозі 211 мг/кг екстракти з листя шпинату городнього зупиняли вільнорадикальні ланцюгові реакції, спровоковані 2,2'-дифеніл-1-пікрилгідразилом, на рівні аскорібнової кислоти концентрацією 14,5 мкг/мл [145]. Аналогічні дослідження, проведені індійськими науковцями, показали, що водні екстракти листя шпинату городнього в концентрації 1,8 мг/мл на $(42,63 \pm 0,60)$ та $(69,55 \pm 0,80)$ % сповільнювали перебіг вільнорадикальних процесів у дослідах із 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом та 2,2'-азино-біс-(3-етил-бензотіазолін)-6-сульфоною кислотою відповідно у порівнянні із бутилгідрокситолуеном [143]. Вивчення *in vitro* антирадикальної активності екстрактів із листя та стебел

шпинату городнього показало, що метанольні екстракти з обох видів сировини були ефективніші у порівнянні із водними, етанольними та етилацетатними екстрактами. При чому, метанольні екстракти з листя шпинату городнього ($88,2 \pm 0,7$ %) концентрацією 1 мг/мл майже на 20 % краще виконували роль скавенджерів вільних радикалів у порівнянні з метанольними екстрактами зі стебел ($73,3 \pm 7,5$ %) цієї рослини [120].

Корейські дослідники вивчали антиоксидантну активність водних та етанольних екстрактів із листя шпинату городнього *in vivo* та *in vitro*. Спектрофотометричне визначення антирадикальної активності за реакцією із 2,2'-азинобіс-(2-амінопропан)-дигідрохлоридом показало, що водні (147 мг/100 г) екстракти мали значно вищий антиоксидантний потенціал у порівнянні з етанольними (51 мг/100 г) [74]. Терапія водним екстрактом з листя шпинату городнього концентрацією 50 мкг/мл щурів з гіперліпідемією сприяла покращенню ліпідного профілю крові та печінки піддослідних тварин, підвищенню активності ферментів ТБК-АП, СОД та каталази, що також вказує на його здатність знешкоджувати вільні пероксиди [74].

Американські вчені встановили, що вживання екстрактів з листя шпинату у дозі 400 мг/кг зменшувало зону некротичного ураження при інфаркті кори головного мозку щурів та нормалізувало ферментну активність каспази-3 в ураженій ділянці мозку [90, 128].

Іранські вчені при дослідженні нейропротекторної активності водного екстракту із листя шпинату городнього кетаміновій моделі ішемії спинного мозку у щурів встановили, що у дозі 50 мг/кг екстракт на 50 % відновлював неврологічні та моторні функції уражених тварин у порівнянні із контрольною групою [150].

Науковці із Тайланду у досліджах *in vivo* встановили, що метанольні екстракти шпинату городнього у дозі 400 мг/кг мають антидепресивну дію та ефективні при лікуванні епілепсії та хвороби Альцгеймера за рахунок підвищення доступності нейромедіатору серотоніну, зменшення концентрації норадреналіну та дофаміну в корі головного мозку та мозочку, інгібування гідролізу ацетилхолін ферментом ацетилхолінестеразою [119].

У експерименті на тетрахлорметановій моделі гепатиту у щурів було встановлено, що етанольні екстракти з листя шпинату городнього знижують рівень ферментів АсАТ, АлАТ, γ -глутаніламінотрансферази, лактатдегідрогенази, лужної фосфатази та білірубину на рівні референтного препарату силімарину [102, 128].

Дослідження іракських науковців показали, що водні екстракти з листя шпинату городнього у дозі 200 мг/кг індукували фермент сульфгідрид, знижували рівень глутатіону, АсАТ, АлАТ та зменшували гістологічні гепатотоксичні прояви метотрексату у гризунів [97]. За даними російських вчених, виділена зі шпинату городнього білкова сполука шпинат-секретин стимулювала секрецію шлункового соку та ферментів підшлункової залози [18].

Вплив метанольних екстрактів із листя шпинату городнього на активність α -амілази американські та індійські дослідники вивчали методом лункових планшетів у порівнянні зі стандартним інгібітором акарбозою. Дослідження показали, що метанольні екстракти з листя шпинату городнього концентрацією 200 мкг/мл інгібують ферментну активність α -амілази на 85 % [81, 132].

Фінські науковці вивчали гіпоглікемічний ефект екстрактів із листя шпинату городнього на моделі алоксанового типу діабету. Під час експерименту встановлено, що водні та етанольні екстракти із листя шпинату городнього у дозі від 200 до 400 мг/кг при пероральному введенні сприяють зниженню рівня глюкози, тригліцеридів та сироваткового холестерину у крові піддослідних щурів. Гістопатологічні дослідження показали, що терапія водними та етанольними екстрактами сприяли регенерації β -клітин підшлункової залози, попередньо некротованої алоксаном [72, 103, 133, 155].

В свою чергу, індійські вчені у дослідях на тваринах встановили, що метанольні та етилацетатні екстракти з листя шпинату городнього у дозі 100 та 200 мг/кг посилювали активність інсуліну, регулювали синтез глікогену в м'язах і печінці, знижували катаболізм білків на рівні з глімепіридом [73].

Проведений у Бангладеші тест Даннета на толерантність до глюкози показав, що застосування 90 % метанольних екстрактів із листя шпинату у дозах 250 мг/кг та 500 мг/кг протягом 2 год знижувало концентрацію глюкози у крові мишей-

альбіносів з індукованим алоксаном діабетом на 35 % та 42 % відповідно [145].

Іранські дослідники стверджують, що застосування водних екстрактів у дозі 300 мг/кг прискорювало регенерацію та грануляцію шкірних виразок у дослідях на щурах з індукованим стрептозоцином діабетом [93].

Проведені індійськими науковцями дослідження показали, що терапія 70 % метанольним екстрактом з листя шпинату городнього у дозі 200 та 400 мг/кг індукувала вивільнення холецистокінів, знижувала рівень глюкози в крові, пригнічувала апетит та зменшувала приріст маси тіла у щурів на рівні референтного препарату флуоксетину [135].

Індійські вчені *in vivo* досліджували імуномодулювальну активність за реакцією гіперчутливості сповільненого типу гексанових, дихлорметанових, метанольних та водних екстрактів з листя шпинату у порівнянні із левамізолем. Результати показали, що дихлорметанові екстракти з листя шпинату у дозі 200 мг/кг стимулювали вивільнення цитокінів Т-клітинами у відповідь на антиген [128].

Корейські дослідники встановили, що водні екстракти із листя шпинату городнього зменшують прояви бронхіальної астми за рахунок інгібування секреції цитокінів інтерлейкіну-13 та інтерлейкіну-4 приблизно на 80 % та пригнічення активності імунних клітин, які індукують астму [114].

Вивчення протизапальної активності *in vivo* на ексудативній фазі гострого асептичного запалення у порівнянні з диклофенаком показало, що у дозі 100 мг/кг етанольний екстракт із листя шпинату городнього майже на 30 % зменшував величину набряку, викликаного субплантарним уведенням розчину карагеніну [44].

У дослідях на мишах дослідниками із США було доведено, що водні екстракти з листя шпинату у дозі 100 мг/кг ефективні проти вірусу папіломи [128].

Дослідження індійських науковців підтвердили, що етанольні екстракти шпинату городнього інгібують ріст пухлин раку шлунку та молочної залози [97, 128, 141]. Іранські дослідники встановили, що водні екстракти з листя шпинату городнього проявляють цитотоксичну дію на клітини мієлоїдного лейкозу у мишей на рівні з доксорубіцином [179].

Вивчення антигельмінтної активності *in vitro* показало, що метанольні

екстракти зі свіжого листа шпинату городнього концентрацією 50 мг/мл викликали загибель глистів роду *Pheretimaposthumus* [118, 128].

Японські дослідники встановили, що метанольні екстракти з листа шпинату городнього гальмували ріст личинок *Spodoptera litura* [98].

Дослідження індійських науковців довели, що метанольні екстракти з листа шпинату городнього у дозі від 200 до 1100 мг/кг проявляють радіопротекторну та антиоксидантну дію, а також підвищують вміст білка та знижують рівень глікогену та холестерину в яєчках щурів, яких попередньо опромінили γ -променями зі швидкістю 1,07 Гр/хв [128, 148, 159].

Аналіз наукових першоджерел показав, що шпинат городній накопичує різноманітні групи БАР і має широке застосування у доказовій і традиційній медицині багатьох народів світу. У літературі знайдено достатню кількість інформації стосовно хімічного складу фенольних сполук, каротиноїдів, вітамінів та мінеральних елементів у листі шпинату городнього. Дані зарубіжних вчених показали, що вміст БАР у листі шпинату городнього може суттєво варіюватися залежно від сорту та місця зростання цієї рослини. Проте всі проведені дослідження не характеризувалися комплексністю, цілісністю та послідовністю. Крім того, у літературі знайдено лише фрагментарні відомості стосовно хімічного складу інших органів цієї рослини, у тому числі коренів, стебел та насіння.

Українськими дослідниками виведено сорти шпинату городнього Красень Полісся і Фантазія, які користуються значною популярністю серед аграріїв, що забезпечує їх достатню сировинну базу.

Трава шпинату городнього входить до Фармакопеї Народної Республіки Китай, а листя – до Аюрведичної Фармакопеї Індії та Американської Трав'яної Фармакопеї [70, 142, 165]. Проте в Україні шпинат городній є нефармакопейною рослиною, яка потребує стандартизації. Зазначені факти, а також відсутність на вітчизняному фармацевтичному ринку лікарських засобів на основі сировини шпинату вказує на необхідність проведення комплексних фармакогностичних досліджень та перспективність розробки нових лікарських засобів на основі сировини цієї рослини.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, ПРИЛАДИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ, ВИКОРИСТАНІ В ДОСЛІДЖЕННЯХ

2.1 Об'єкти дослідження

Для дослідження було обрано корені, розеткове листя та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, які за даними селекційних установ, є адаптованими до вирощування в кліматичних умовах України та користуються популярністю серед аграріїв, що забезпечує їх достатню сировинну базу [1, 52, 55, 59]. Сорт Красень Полісся було внесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2006 році й вважається еталонним для селекціонерів, сорт Фантазія – у 2010 році [22]. Сировину заготовляли на полях Дослідного господарства «Інститут овочівництва та баштанництва НААН» (м. Мерефа, Харківська область) у 2016-2019 роках. Крім того, для порівняльного аналізу було взято заморожене листя шпинату городнього без зазначення сорту українського виробника ТМ «Рудь» (м. Житомир). Заготовлену сировину сушили повітряно-тіньовим та конвективним способом при температурі $55 \pm 5^\circ\text{C}$.

2.2 Короткі відомості про прилади, методи і реактиви

1. Дослідження якісного складу БАР сировини проводили хроматографічними методами (ПХ, ТШХ, ВЕРХ, ГХ, АСС).
2. Для хроматографування використовували хроматографічний папір марки «Filtrak» (FN 1, 3, 7, 14), пластинки «Sorbfil»-ПТСХ-А-УФ.
3. УФ спектрофотометричне визначення кількісного вмісту БАР проводили за допомогою спектрофотометра Mecasys Optizen POP в кюветах з товщиною шару 10 мм.
4. Дослідження якісного складу та вмісту фенольних сполук та токоферолів методом ВЕРХ проводили на рідинному хроматографі,

обладнаному діодноматричним детектором Shimadzu HPLC-system, ser. 20.

5. Вивчення жирнокислотного складу сировини проводили за допомогою газового хроматографа «Селміхром-1» з полум'яно-іонізаційним детектором. Як референтні зразки брали стандарти насичених та ненасичених метилових естерів жирних кислот фірми «Sigma».

6. Аналіз елементного складу сировини проводили методом атомно-абсорбційної спектроскопії з атомізацією в повітряно-ацетиленовому полум'ї на приладі ДФС-8. Інтенсивність ліній одержаних спектрів та градуювальних зразків вимірювали мікрофотометром МФ-1.

7. Амінокислотний склад вивчали за допомогою автоматичного аналізатора амінокислот Т 339.

8. Дослідження кількісного вмісту крохмалю проводили на цукромірі СУ-2.

9. Втрату в масі при висушуванні сировини визначали за допомогою аналізатора вологості «Sartorius» марки МА-150.

10. Мікробну суспензію готували на приладі Densi-La-Meter (з довжиною хвилі 540 нм).

11. Морфологічні ознаки сировини вивчали за допомогою лупи. Для вивчення анатомічних ознак використовували свіжозаготовлену та фіксовану в суміші етанол – гліцерин – вода (1 : 1 : 1) сировину. Мікропрепарати готували за загальними правилами.

12. Дослідження анатомічної будови проводили з використанням мікроскопа «Granum» при збільшенні в 10-100 разів. Фотофіксацію результатів здійснювали фотокамерою «Digital camera for microscope DCM 300».

13. Реактиви і титровані розчини, використані для якісного та кількісного аналізу, готували за рекомендаціями ДФУ 2.1 (розділ 4 «Реактиви») [21].

14. Математичне планування трьохфакторного експерименту здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 10,0 (trial-версія).

15. Фармакологічні дослідження одержаного лікарського засобу проводили *in vitro* та *in vivo*.

16. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали відповідно до вимог ДФУ за допомогою програмного забезпечення Statistica 10,0 [20].

2.3 Методики якісного та кількісного аналізу БАР

Для проведення якісного аналізу БАР у сировині шпинату посівного використовували петролейноестерні, хлороформні, етилацетатні, 96 % етанольні, 50 % етанольні та водні витяжки, які готували шляхом нагрівання на киплячій водяній бані 5,0 г сировини із десятикратним об'ємом екстрагенту та подальшою їх концентрацією.

Попередні дослідження за допомогою хімічних реакцій

Полісахариди. Наявність полісахаридів у досліджуваній сировині підтверджували шляхом додавання до водних витяжок трикратного об'єму 96 % етанолу. Позитивним тест вважався при випадінні об'ємного осаду [97, 134, 148].

Крохмаль ідентифікували у водних витяжках за наявністю синього забарвлення після додавання розчину Люголя [97, 134, 148].

Амінокислоти виявляли у водних витяжках за допомогою реакції з 0,2 % розчином нінгідрину. Про наявність амінокислот свідчила поява фіолетового забарвлення розчину у пробірці [97, 134, 148].

Протеїни. Для виявлення протеїнів використовували водні витяжки з досліджуваної сировини. При проведенні ксантропротеїнової реакції тест вважався позитивним при появі жовтого забарвлення, при проведенні біуретової реакції – фіолетового [97, 134, 148].

Поліфенольні сполуки. За наявності в сировині шпинату городнього поліфенолів водні та 50 % етанольні витяжки каламутніли при додаванні 1 % розчину желатину та 1 % розчину хініну гідрохлориду, а також набували брудно-зеленого кольору при додаванні 30 % розчину феруму (III) амонію сульфату та 1 % розчину феруму (III) хлориду [134, 148, 97].

Флавоноїди. Виявлення флавоноїдів проводили у 50 % етанольних витяжках за появою бурого забарвлення з розчином феруму (III) хлориду та жовтого

забарвлення з 10 % розчином натрію гідроксиду та 2 % розчином алюмінію хлориду. При проведенні ціанідинової реакції в модифікації по Бріанту позитивним тест вважався, якщо спостерігали розділення забарвлення водної та органічної фаз [134, 148, 97].

Тритерпеноїди та стероїди. Виявлення тритерпенових та стероїдних сполук проводили у 50 % етанольних витяжках із досліджуваних видів сировини за появою зеленого забарвлення витяжки при проведенні реакції Лафона, а також за появою рожевого забарвлення у пробірці з витяжкою при проведенні реакцій Сальковського та Саньє [134, 148, 97].

Якісний аналіз методами планарної хроматографії

Хроматографічні дослідження проводили методами висхідної одно- та двовимірної хроматографії у рухомих фазах (співвідношення вказано в дужках):

- № 1 – 96 % етанол – хлороформ – аміак концентрований – вода (70 : 40 : 20 : 2);
- № 2 – н-бутанол – мурашина кислота – вода (30 : 5 : 10);
- № 3 – етилацетат – оцтова кислота льодяна – мурашина кислота – вода (100:11:11:25);
- № 4 – н-бутанол – оцтова кислота льодяна – вода (4 : 1 : 2);
- № 5 – оцтова кислота – пропанол – вода – 96 % етанол (1 : 1 : 1 : 2);
- № 6 – мурашина кислота безводна – вода – етилацетат (10 : 10 : 80);
- № 7 – 15 % розчин оцтової кислоти;
- № 8 – етилацетат – мурашина кислота безводна – вода (10 : 2 : 3);
- № 9 – мурашина кислота безводна – вода – метанол – етилацетат (2,5 : 4 : 4 : 50);
- № 10 – гексан – ацетон (8 : 2);
- № 11 – гексан – ацетон (8 : 4);
- № 12 – петролейний етер – бензен (2 : 1);
- № 13 – петролейний етер – хлороформ – ацетон (2 : 2 : 1);

- № 14 – хлороформ – метанол (2 : 1);
№ 15 – гексан – етилацетат (5 : 2);
№ 16 – гексан – хлороформ (1 : 1).

Ідентифікацію БАР проводили за кольором та флуоресценцією зон у денному та УФ-світлі до та після обробки проявляючими реактивами:

- А – 0,05% розчином бромтимолового синього;
Б – 0,05% розчином бромфенолового синього;
В – 0,05% розчином натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту;
Г – 0,2 % етанольним розчином нінгідрину;
Д – парами аміаку;
Е – 1 % розчином дифенілборної кислоти аміноетилового естеру в метанолі;
Ж – 5 % розчином макроголу 400 в метанолі;
К – 2 % етанольним розчином заліза (III) хлориду;
Л – 2 % етанольним розчином алюмінію (III) хлориду;
М – 2 % етанольним розчином *n*-диметиламінобензальдегіду.

При проведенні хроматографічного вивчення фенольних сполук методом ВЕРХ як рухому фазу А використовували 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти у воді, як рухому фазу Б – 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

Методики кількісного аналізу БАР

Полісахариди. Визначення кількісного вмісту полісахаридів проводили гравіметричним методом за методикою монографії «Алтеї трава^N» ДФУ 2.0.3 [19].

Фракційний склад полісахаридів вивчали методом гравіметрії. Для очищення сировини від спирторозчинних речовин 10,00 г знежиреної петролейним етером сировини екстрагували 80 % етанолом при нагріванні на киплячій водяній бані впродовж 2 год. Повітряно-сухий шрот, що залишився, двічі екстрагували 100 мл води протягом 2 год на киплячій водяній бані. Екстракцію проводили при

постійному перемішуванні. Отримані витяжки об'єднували та концентрували [25].

До одержаних концентратів додавали трикратний об'єм етанолу, отримані осад відфільтровували, промивали 96 % етанолом, етилацетатом і висушували до постійної маси [25]. ПР вилучали шляхом трикратної екстракції висушеного шроту рівними об'ємами 5 % розчину щавлевої кислоти та 0,5 % розчином амонію оксалату при температурі 80-85°C протягом 2 год. Одержані витяжки об'єднували та концентрували. ПР висаджували трикратною кількістю 96 % етанолу. Утворений осад відфільтровували, послідовно промивали 96 % етанолом та етилацетатом і висушували до постійної маси [25].

Повітряно-сухий шрот, що залишився після виділення ПР двічі екстрагували п'ятикратним об'ємом 7 % розчину натрію гідроксиду за кімнатної температури впродовж 12 год. Лужну витяжку відфільтровували, фільтрат підкисляли оцтовою кислотою льодяною до випадіння осаду ГЦ А, який в подальшому відфільтровували та висушували до постійної маси [25].

До фільтрату, що залишився після виділення ГЦ А, додавали двократну кількість 96 % етанолу і відфільтровували осад ГЦ Б, промиваючи його 96 % етанолом та етилацетатом. Одержаний осад висушували до постійної маси [25].

Вміст полісахаридних фракцій (X, %) вираховували за формулою:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 10000}{m \times (100 - W)}, \quad (2.1)$$

де m — маса наважки випробовуваної сировини, г;

m_1 — маса фільтра, г;

m_2 — маса фільтра із залишком, г;

W — втрата в масі при висушуванні, % [25].

Крохмаль. Кількісний вміст крохмалю визначали поляриметричним методом (за Еверсом). На аналітичних вагах зважували 5,00 г подрібненої сировини. Наважку переносили у колбу Кольрауша місткістю 100 мл та додавали 50 мл розчину 1 % хлористоводневої кислоти. Колбу занурювали у киплячу водяну баню.

Через 15 хв колбу виймали та додавали воду очищену до 90 мл та охолоджували до кімнатної температури. Для осадження білків до розчину додавали 4-5 мл 4 % розчину фосфорновольфрамової кислоти. Вміст колби перемішували, доводили водою очищеною до позначки та фільтрували, відкидаючи перші 10 мл порції фільтрату. Прозорий фільтрат поляризували у трубці завдовжки 200 мм. Допустима різниця між окремими показниками цукроміра складала до 0,1 мм [42].

Вміст крохмалю (X, %) в досліджуваній сировині визначали за формулою:

$$X = \frac{a \times K \times 100}{100}, \quad (2.2)$$

де а – середнє значення показника цукроміру;

К – коефіцієнт Еверса [42].

Клітковина. Кількісний вміст клітковини визначали гравіметричним методом [42]. Близько 3,00 г (точна наважка) повітряно-сухої сировини, переносили до хімічного стакану місткістю 500 мл і додавали 200 мл 1,25 % сірчаної кислоти. Рідину кип'ятили протягом 30 хв, періодично помішуючи і поступово додаючи нові порції води. Одержану витяжку відфільтровували. Коли майже всю рідину було видалено, у стакан наливали до позначки гарячу воду очищену, давали осісти осаду та знову відфільтровували. Обробку гарячою водою повторювали 2–3 рази до одержання нейтрального фільтрату за проби на лакмус. До залишку після промивання додавали 100 мл 2,5 % розчину натрію гідроксиду, рівень рідини доводили до позначки холодною водою очищеною і нагрівали до кипіння протягом 30 хв. Після нагрівання з лугом розчин охолоджували, фільтрували і знову осад тричі промивали гарячою водою. Потім додавали невелику порцію води, підкисленої сірчаною кислотою розбавленою. Осад гарячою водою переносили на заздалегідь висушений та доведений до постійної маси паперовий фільтр. Осад на фільтрі послідовно промивали гарячою водою, 96 % етанолом та діетиловим етером. Фільтр з осадом на лійці залишали на ніч у витяжній шафі, а вранці його переносили у той самий бюкс, у якому сушився

пустий фільтр, і висушували за температури 130°C протягом двох год. Бюкси з клітковиною охолоджували в ексікаторі і зважували. Різниця між масою фільтра з клітковиною і масою порожнього фільтра складала кількість сирої клітковини у взятій наважці [42].

Вміст сирої клітковини (X, %) в абсолютно сухій речовині розраховували за формулою:

$$X = \frac{a \times 100 \times 100}{b \times (100 - W)}, \quad (2.3)$$

де а – наважка повітряно-сухої сировини, г;

б – маса сирої клітковини, г;

W – втрата в масі при висушуванні, % [42].

Органічні кислоти. Вміст органічних кислот визначали методом алкаліметрії за методикою монографії «Шипшини плоди^N» ДФУ 2.1 [21].

Аскорбінова кислота. Визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти проводили методом абсорбційної спектрофотометрії за методикою, яка наведена у монографії «Шипшина» ДФУ 2.0.3 [19].

Щавлева кислота. Визначення кількісного вмісту вільної та зв'язаної щавлевої кислоти проводили методом перманганатометрії [2].

Близько 5,0 г сировини розтирали зі скляним піском, 5 мл 10 % сірчаної кислоти та невеликою кількістю 96 % етанолу. 1,0 г (точна наважка) шпинату городнього листя екстракту густого розчиняли у 5 мл 10 % сірчаної кислоти та невеликій кількості 96 % етанолу. Потім до суміші додавали 250 мл води, струшували і залишали на декілька годин. Вміст колби відфільтровували. До 50,0 мл фільтрату додавали аміак до тих пір, поки рН розчину не перевищило 7,0. Для запобігання осадження винної кислоти та її ізомерів до розчину додавали 1,0 г борної кислоти.

До утвореної суміші додавали 10,0 мл реактиву для осадження щавлевої кислоти, який складався з рівних об'ємів 5,0 % розчину кальцію хлориду в 50 %

оцтовій кислоті та 1 % розчину натрію ацетату, і залишали на 48 год при температурі не вище 7°C. Осад кальцію оксалату, що утворився, відфільтровували і промивали водою до негативної реакції з 1 % розчином аргентуму нітрату.

Осад кальцію оксалату змивали з фільтру водою, додавали гарячу 10 % сірчану кислоту через той же фільтр, щоб розчинити сліди оксалатів. Колбу із вмістом нагрівали до повного розчинення осаду, фільтр промивали гарячою водою.

Розчин титрували 0,1 н розчином калію перманганату до появи рожевого забарвлення. Вміст щавлевої кислоти (X, %) з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислювали за формулою:

$$X = \frac{V_{\text{KMnO}_4} \times T_{\text{KMnO}_4} \times 500 \times 100}{m \times 37 \times (100 - W)}, \quad (2.4)$$

де V_{KMnO_4} – об'єм калію перманганату, що пішов на титрування;

T_{KMnO_4} – титр калію перманганату за щавлевою кислотою;

m – маса наважки, г;

W – втрата в масі при висушуванні, %.

Жирні кислоти. Ідентифікацію та кількісний вміст жирних кислот визначали методом ГХ у ліпофільних фракціях після метилювання.

Метиллові естери жирних кислот отримували за модифікованою методикою Пейскера. Метилювання проводили сумішшю хлороформу з метанолом та сірчаною кислотою у співвідношенні 100 : 100 : 1. Від 30 до 50 мкл ліпофільної фракції змішували з 2,5 мл метилюючої суміші та запаювали в скляні ампули, які потім витримували в термостаті 3 год при температурі 105°C. Після закінчення метилювання ампули розкривали, вміст переносили в пробірку, додавали порошкоподібний цинку сульфат та по 2 мл води очищеної і гексану. Суміш збовтували, а після відстоювання гексанову витяжку відфільтровували [71, 169].

Для дослідження використовували хроматографічну колонку з нержавіючої сталі, яка мала такі параметри:

- довжина 2,5 м;

- внутрішній діаметр 4 мм;
- нерухома фаза – інертон, оброблений 10 % діетиленглікольсукцинатом (DEGS);
- температура термостата колонки 180°C;
- температура випарника 230°C;
- температура детектора 220°C;
- швидкість потоку газу носія (азот) 30 см³/хв;
- об'єм проби 2 мм³ розчину метилових естерів кислот у гексані [71, 169].

Метиліві естери жирних кислот ідентифікували за часом утримування у порівнянні зі референтними зразками насичених і ненасичених жирних кислот фірми «Sigma». Обчислення кількісного вмісту жирних кислот проводили методом нормалізації [71, 169].

Амінокислоти. Кількісний вміст суми вільних амінокислот у сировині шпинату городнього визначали методом абсорбційної спектрофотометрії.

Для проведення аналізу 1,0 г (точна наважка) сировини заливали 50 мл води і настоювали на водяній бані протягом 20 хв. Охолоджений та відфільтрований розчин доводили до позначки в мірній колбі місткістю 50 мл тим же розчинником [33, 34]. При визначенні цих БАР у шпинату городнього листя екстракті густому 0,2 г екстракту розчиняли у 40 % етанолу та доводили цим же розчинником до позначки 25,0 мл.

До 1мл одержаного розчину додавали 8 мл 0,2 % розчину нінгідрину в ізопропанолі і витримували 5 хв на водяній бані. Одержану витяжку кількісно переносили у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину до позначки ізопропанолом [33, 34].

Оптичну густину розчину вимірювали за довжини хвилі 573 нм. Як компенсаційний розчин використовували 8 мл 0,2 % розчину нінгідрину в ізопропанолі, доведеному до позначки ізопропанолом у мірній колбі об'ємом 25,0 мл [33, 34].

Кількісний вміст суми вільних амінокислот (X, %) у перерахунку на лейцин і абсолютно суху сировину обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \times 25 \times 100 \times 50}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \times 1 \times (100 - W)}, \quad (2.5)$$

де: A – оптична густина досліджуваного розчину за довжини хвилі 573 нм;

m – маса наважки випробовуваної сировини, г;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, %;

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання комплексу лейцину з нінгідрином в ізопропанолі за довжини хвилі 573 нм, який дорівнює 862 [33, 34].

Ідентифікацію та визначення кількісного вмісту індивідуальних амінокислот проводили методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії, заснованому на амфотерних властивостях амінокислот.

Амінокислотний склад вивчали в гідролізатах сировини шпинату городнього. Точну наважку сировини 1,0 г заливали 6 н розчином хлористоводневої кислоти. В подальшому розчин охолоджували у потоці рідкого азоту. Після замерзання вмісту пробірки з неї видаляли повітря під вакуумом для запобігання окиснення амінокислот. Пробірку запаювали, витримували добу в термостаті при температурі 106°C. Вміст пробірки охолоджували, хлористоводневу кислоту випарювали на водяній бані. До висушеного зразка додавали 3-4 мл деіонізованої води та продовжували упарювання. Одержаний зразок розчиняли у 0,3 н літій цитратному буфері з рН 2,2 і наносили на іонообмінну колонку аналізатора амінокислот, катіонообмінник якої попередньо врівноважували буферним розчином натрію цитрату або літію цитрату. Розділення амінокислот проводили на дрібнозернистих катіонообмінниках сферичної форми, виготовлених із стиролу і дивінілбензолу з функціональною сульфатною групою [122].

Принцип роботи автоматичного аналізатора амінокислот Т 339 полягає у проведенні всіх операцій аналізу в безупинному потоці елюенту. На виході з колонки за допомогою мікронасоса елюат безперервно змішувався з нінгідриновим реактивом (суміш нінгідрину, буферного розчину й олова хлориду в атмосфері аргону). Одержана суміш по капілярній трубці подавалась у реактор, нагрітий до 95 – 98°C. Далі вона надходила в проточну кювету для

фотоколориметричного вимірювання інтенсивності одержаного забарвлення за довжини хвилі 440 або 560 нм. Сигнали фотоелемента реєструвались самописним потенціометром у вигляді хроматограм. Площа піків на хроматограмах розраховувалась і порівнювалась з площею піків амінокислот з відомою концентрацією, на основі чого обчислювалась абсолютна кількість кожної амінокислоти в аналізованому зразку [122].

Вміст амінокислоти в мкМ (X_1) розраховували за формулою:

$$X_1 = S_1 / S_0, \quad (2.6)$$

де S_1 – площа піку амінокислоти в досліджуваному зразку;

S_0 – площа піку амінокислоти в розчині стандартних амінокислот, кількість кожної амінокислоти в якому відповідає 1 мкМ.

Для вираження вмісту у мг одержану кількість мкМ амінокислоти множили на відповідну їй молекулярну масу [122].

Протеїн. Кількісний вміст протеїну визначали методом К'ельдаля. Близько 0,50–0,75 г сировини поміщали у колбу К'ельдаля об'ємом 250 мл і дозатором доливали 10 мл сірчаної кислоти концентрованої (із розрахунку 12 мл на 1 г сировини) і близько 0,70 г каталізатора і спалювали на електричній плиті декілька годин. Спалювання закінчували, коли рідина набувала зелено-блакитного кольору, який зникав після охолодження. Потім в колбу додавали близько 60 мл води очищеної [42].

Аміак відганяли у тій самій колбі К'ельдаля, в якій спалювали органічну речовину. У прийомні колби з бюретки додавали 30 мл 0,1 н розчину сірчаної кислоти і 3–4 краплі метилового червоного. Потім колбу приєднували до холодильника апарату К'ельдаля і обережно доливали 40 мл натрію гідроксиду. При цьому виділявся аміак, який через трубку холодильника потрапляв у прийомну колбу з сірчаною кислотою, де утворювався сульфат амонію [42].

Кінець відгонки аміаку перевіряли за реактивом Несслера (додавали одну краплю до 0,5–1,0 мл рідини, що витікала із холодильника) або червоним лакмусовим папером [42]. Після закінчення відгонки аміаку, вміст прийомної колби титрували 0,1 н розчином натрію гідроксиду до переходу червоного

забарвлення в золотисто-жовте при використанні метилового червоного [42].

Кількісний вмісту протеїну (X, %) обраховували за формулою:

$$X = \frac{T \times (a \times b) \times 100}{m} \times 6,25, \quad (2.7)$$

де T – титр 0,1 н розчину натрію гідроксиду, мг;

a – кількість 0,1 н натрію гідроксиду, використаного на титрування, набраного у прийомну колбу об'єму 0,1 н сірчаної кислоти, мл;

b – кількість 0,1 н натрію гідроксиду, витраченого на титрування 0,1 н сірчаної кислоти, яка не вступила в реакцію з аміаком після його відгону, мл;

m – наважка абсолютно сухої сировини, мг;

6,25 – коефіцієнт перерахунку нітрогену на білок [42].

Поліфеноли. Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів проводили методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 760 нм у перерахунку на пірогалол за методикою загальної статті «Визначення танінів у лікарських засобах рослинного походження» ДФУ 2.0.1 [20]. Для аналізу використовували 1,0 г сировини або 0,2 г шпинату листя екстракту густого.

Гідроксикоричні кислоти. Кількісний вміст суми гідроксикоричних кислот визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 525 нм у перерахунку на хлорогенову кислоту за методикою, яка викладена в монографії «Кропиви листя» ДФУ 2.0.3 [19]. Для аналізу використовували 1,0 г сировини або 0,2 г шпинату листя екстракту густого.

Флавоноїди. Вміст флавоноїдів визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 410 нм у перерахунку на рутин за методикою монографії «Софори бутони» ДФУ 2.1 [21]. Для аналізу використовували 1,0 г сировини або 0,2 г шпинату листя екстракту густого.

Фенольні сполуки. Дослідження якісного складу та визначення кількісного вмісту індивідуальних сполук фенольної природи проводили методом ВЕРХ за методикою, узгодженою із методикою загальної статті «Рідинна хроматографія»

ДФУ 2.0.1 [20].

Для проведення хроматографічного аналізу 0,5 г подрібненої сировини (точна наважка) поміщали у колбу об'ємом 100 мл, приєднану до зворотного холодильника. До вмісту колби додавали 25 мл 50 % етанолу. Суміш витримували протягом 45 хв на водяній бані. Одержану витяжку охолоджували, фільтрували у мірну колбу місткістю 25 мл. Об'єм витяжки доводили до мітки 50 % етанолом [170]. При визначенні цих БАР у шпинату городнього листя екстракті густому 0,2 г екстракту розчиняли у 40 % етанолі та доводили цим же розчинником до позначки 25,0 мл.

Хроматографічне дослідження зразків проводили на рідинному хроматографі, обладнаному діодноматричним детектором, в наступних умовах:

- колонка Phenomenex Luna C 18 (2) довжиною 250 мм та діаметром 4,6 мм;
- зернистість колонки: становила 5 мкм;
- температура колонки: 35°C;
- довжина хвилі детектування: 330 нм;
- швидкість потоку рухомої фази: 1 мл/хв;
- об'єм проби, що вводився: 5 мкл;
- рухома фаза: елюент А (0,1 % розчин трифтороцтової кислоти у воді) та елюент Б (0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі) [170].
- градієнтний режим елюювання:

Час хроматографування, хв	Елюент А, %	Елюент Б, %
0-5	95	5
5-35	95→75	5→25
35-40	75	25
40-60	75→50	25→50
60-65	50→20	50→80
65-70	20	80
70-85	95	5

Фенольні компоненти ідентифікували за часом утримування відповідно до УФ-спектрів стандартів [170].

Хлорофіли та каротиноїди. Вміст хлорофілів та каротиноїдів визначали методом абсорбційної спектрофотометрії.

Для проведення аналізу до 0,50 г (точна наважка) сировини додавали магнію карбонат. Одержану суміш розтирали у ступці із 5 мл охолодженого 96 % етанолу. Витяжку зливали, фільтрували крізь скляний фільтр. Операцію проводили до моменту повного знебарвлення фільтрату. Фільтрати об'єднували у мірній колбі місткістю 25 мл і доводили 96 % етанолом до позначки [31, 32].

Оптичну густину витяжки, у порівнянні із 96 % етанолом, вимірювали за довжини хвилі 665, 649 та 441 нм, оскільки за таких значень спостерігали максимум поглинання хлорофілу а, хлорофілу b та каротиноїдів відповідно [31, 32].

Концентрацію хлорофілів а (С_{хл.а}, мг/л) і b (С_{хл.б}, мг/л) та каротиноїдів (С_{кар}, мг/л) обчислювали за формулами:

$$C_{\text{хл.а}} = 13,70 \cdot A_{665} - 5,76 \cdot A_{649}, \quad (2.8)$$

$$C_{\text{хл.б}} = 25,80 \cdot A_{649} - 7,60 \cdot A_{665}, \quad (2.9)$$

$$C_{\text{кар.}} = 4,695 \cdot A_{441} - 0,268 \cdot (C_{\text{хл.а}} + C_{\text{хл.б}}), \quad (2.10)$$

де A_{665} – оптична густина витяжки за довжини хвилі 665 нм;

A_{649} – оптична густина витяжки за довжини хвилі 649 нм.

A_{441} – оптична густина витяжки за довжини хвилі 441 нм;

$(C_{\text{хл.а}} + C_{\text{хл.б}})$ — сумарний вміст хлорофілів а і b у розчині, мг/л [31, 32].

Після встановлення концентрації хлорофілів та каротиноїдів у витяжках обчислювали їх кількісний вміст (X, мг/кг) за формулою:

$$X = \frac{V \cdot C \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \quad (2.11)$$

де V — об'єм 96 % етанольної витяжки, мл;

C — концентрація пігменту в 96 % етанольному розчині, мг/л;

m — наважка сировини, г;

W — втрата у масі при висушуванні сировини, % [31, 32].

Токоферолі. Аналіз ізомерного складу та загального вмісту токоферолів у зразках проводили методом ВЕРХ в ізократичному режимі нормально-фазового розділення відповідно ДСТУ EN 12822:2005 з використанням хроматографічної системи Smartline фірми Knauer (Німеччина).

Наважку близько 4,00 г сировини заливали 9 мл петролейного етеру. Екстракцію проводили протягом доби у темному місці, фільтрували і використовували для аналізу [67, 88].

Для аналізу використовували колонку Eurospher II 100 – 5 – Si 250 × 4 із такими характеристиками [67, 88]:

- рухома фаза: 0,5 % розчин ізопропанолу в н-гексані (LiChrosolv, Merck);
- температура колонки: 28°C;
- довжина хвилі при фотометруванні УФ-детектором: 295 нм;
- об'єм проби: 20 мкл;

Хроматографування проводили в трикратній повторюваності. Піки на хроматограмах ідентифікували за часом утримування з використанням набору стандартних зразків токоферолів (Merck). Вміст ізоформ токоферолу (X , мг/кг) розраховували за площею піків за допомогою програмного забезпечення ClarityChrom [67, 88].

Стероїдні сполуки. Визначення кількісного вмісту суми стероїдних сполук проводили методом абсорбційної спектрофотометрії [16, 35].

Для аналізу 1,00 г (точна наважка) сировини поміщали в колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл 96 % етанолу і нагрівали на водяній бані 1 год. Одержану витяжку охолоджували і фільтрували. При визначенні цих БАР у шпинату городнього листа екстракті густому 0,2 г екстракту розчиняли у 40 % етанолу та

доводили цим же розчинником до позначки 25,0 мл [16, 35].

Для приготування випробовуваного розчину у колбу зі шліфом поміщали 5,0 мл фільтрату й 5 мл 1 % розчину *n*-диметиламінобензальдегіду в 4 н етанольному розчині хлористоводневої кислоти. Паралельно готували розчин порівняння, який складався із 5 мл фільтрату і 5 мл 4 н етанольного розчину хлористоводневої кислоти. Обидва розчини витримували в термостаті ($t^{\circ} = 58 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) 2 год і в подальшому охолоджували до кімнатної температури [16, 35].

Оптичну густину розчину вимірювали за довжини хвилі 518 нм. Вміст суми стероїдних сполук (X, %) у перерахунку на абсолютно суху сировину обчислювали за формулою [16]:

$$X = \frac{a \cdot 0,0101 \cdot 50 \cdot F \cdot 100 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W)}, \quad (2.12)$$

де a – концентрація кобальту (II) хлориду за калібрувальним графіком;

0,0101 – коефіцієнт перерахунку;

F – коефіцієнт розведення;

m_1 – маса сировини, г;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, % [16].

Градувальний графік залежності оптичної густини і концентрації розчину кобальту хлориду наведено на рис. 2.1.

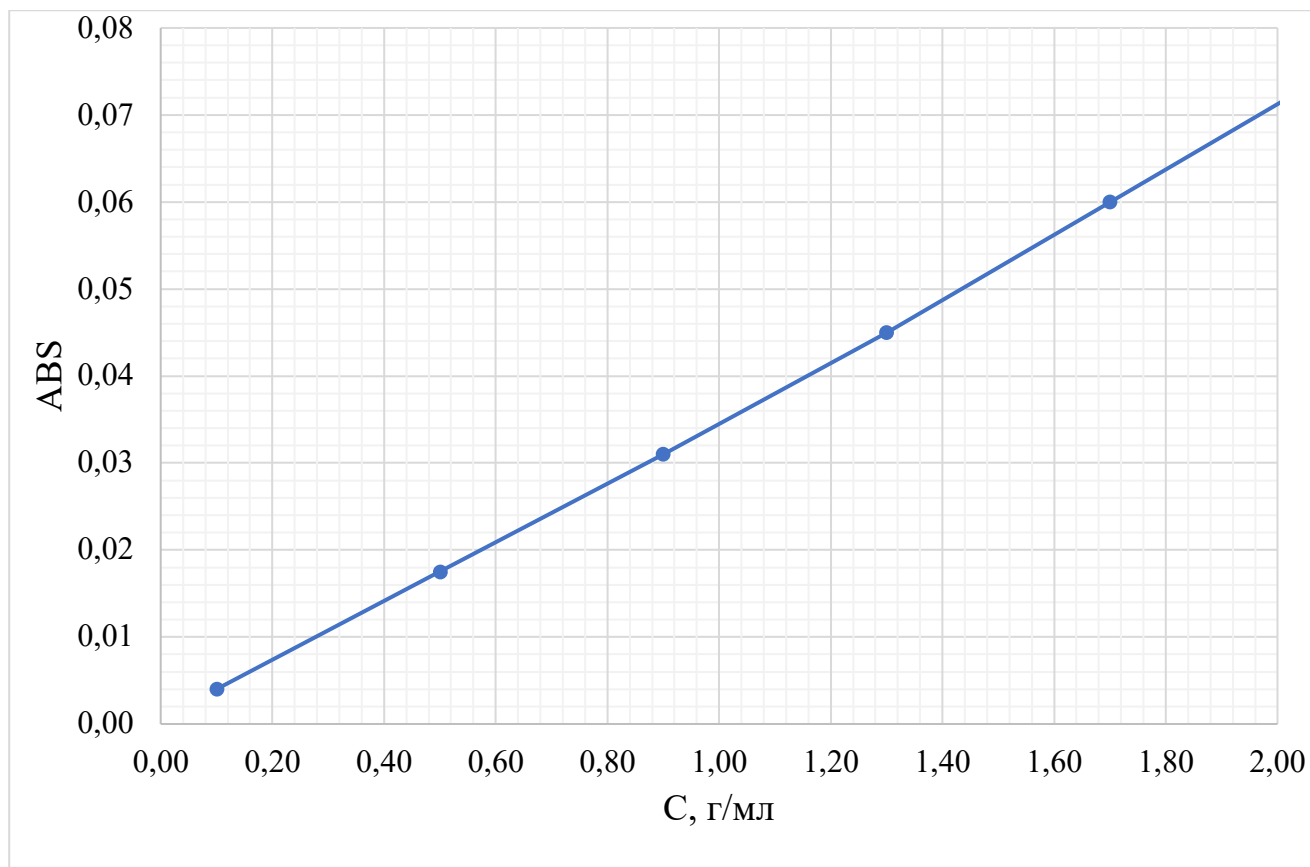


Рис. 2.1 Градувальний графік залежності оптичної густини і концентрації розчину кобальту хлориду

Мінеральні елементи. Якісний склад та кількісний вміст мінеральних елементів у сировині шпинату городнього визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії за методикою, узгодженою з положеннями загальної статті «Атомно-абсорбційна спектрометрія» ДФУ 2.0.1 (метод 1 – калібрувальної кривої) [20].

Дослідження мінерального складу проводили на базі відділу аналітичної хімії ім. А.Б. Бланка ДНУ НТК «Інститут монокристалів НАН України», під керівництвом О. В. Гришиної.

Пробу для аналізу готували шляхом обвуглювання її в муфельній печі (при температурі до 500°C) сірчаною кислотою розведеною 2,0 г (точна наважка) сировини або 0,5 г шпинату городнього листя екстракту густого. Зразки випаровували з графітових електродів, сила змінного струму у розряді дуги якого складала 16А, експозиція – 60 с [30, 123].

Спектри генерували за допомогою приладу ІВС-28, на якому встановлювали

такі параметри:

- тиск: 0,04 МПа;
- температура полум'я: 2250°C [30, 123].

Одержання та реєстрацію спектрів на фотоплівці проводили на спектрографі ДФС-8 із дифракційною решіткою 600 штр/мм і трилінзовою системою освітлення щілини. Інтенсивність спектрів вимірювали мікрофотометром МФ-1. На приладі були задані такі умови фотографування:

- фаза підпалювання: 60°C;
- ширина щілини спектрографа – 0,015 мм
- частота підпалювальних імпульсів: 100 розрядів за секунду;
- ділянка спектру: 230-347 нм [30, 123].

Градуювальні графіки в інтервалі вимірюваних концентрацій елементів будували за допомогою стандартних проб розчинів солей металів (ICORM-23-27). Для розчинення купруму використовували кислоту азотну, для аналізу інших елементів – реактиви кваліфікації х. ч. та двічі очищену воду [30, 123].

Для всіх елементів розраховували різниці почорніння лінії і фону ($S = S_{\text{л+ф}} - S_{\text{ф}}$) для спектрів проб ($S_{\text{ін}}$) та градуювальних зразків ($S_{\text{ГЗ}}$). На основі одержаних результатів будували градуювальний графік у координатах: середнє значення різниці почорніння фону (S) і фону ($S_{\text{ГЗ}}$) – логарифм вмісту елемента в градуювальному зразку ($\lg C$), де C виражено у відсотках до основи [30, 123].

Вміст мінерального елемента в золі (a , %) знаходили за графіком. У сировині вміст елемента (X , %) обчислювали за формулою:

$$X = \frac{a \cdot m_1}{m}, \quad (2.13)$$

де m_1 – маса золи, г;

m – маса сировини (сухого екстракту), г;

a – вміст елемента в золі, % [30, 123].

2.4 Методики визначення показників якості за вимогами ДФУ та технологічних параметрів сировини

Методики визначення показників якості шпинату городнього листя за вимогами ДФУ

Екстрактивні речовини. Визначення вмісту екстрактивних речовин проводили гравіметричним методом за методикою монографії «Полин гіркий^N» ДФУ 2.0.3 [19].

Зола загальна. Вміст загальної золи визначали гравіметричним методом за методикою загальної статті «Загальна зола» ДФУ 2.0.1 [20].

Зола, не розчинна в хлористоводневій кислоті. Вміст золи, не розчинної в хлористоводневій кислоті, визначали гравіметричним методом за методикою загальної статті «Зола, не розчинна в хлористоводневій кислоті» ДФУ 2.0.1 [20].

Втрата в масі при висушуванні. Визначення втрати в масі при висушуванні сировини проводили гравіметричним методом за методикою загальної статті «Втрата в масі при висушуванні» ДФУ 2.0.1 та за допомогою аналізатора вологості [20].

Методики визначення технологічних параметрів сировини

Питома маса. Питома масу визначали як відношення ваги сухої сировини до об'єму рослинної тканини [5, 26, 62]. Точну наважку сировини (близько 5,00 г) поміщали в пікнометр, заливали дві третини його об'єму дистильованою водою і витримували на водяній бані 2 год. Після охолодження витяжку доводили водою до мітки і зважували. Попередньо визначали вагу пікнометра з водою [5, 26, 62].

Питома масу (d_y , г/см³) розраховували за формулою:

$$d_y = \frac{P \times d_{\text{ж}}}{P + G - F}, \quad (2.14)$$

де P – вага абсолютно сухої подрібненої сировини, г;

G – вага пікнометра з водою, г;

F – вага пікнометра з водою і сировиною, г;

$d_{\text{ж}}$ – питома вага води, г/см³ ($d_{\text{ж}} = 0,9982$ г/см³) [5, 26, 62].

Об'ємна вага. Об'ємну вагу визначали співвідношенн не подрібненої сировини до її повного об'єму, з урахуванням пор, тріщин і капілярів, які заповнені повітрям [5, 26, 62]. Для аналізу фіксували об'єм води у циліндрі до і після занурення 10, 00 г (точна наважка) подрібненої сировини. Об'єм, який займає сировина, розраховували за різницею цих об'ємів [5, 26, 62].

Об'ємну вагу (d_0 , г/см³) обчислювали за формулою:

$$d_0 = \frac{P_0}{V_0}, \quad (2.15)$$

де P_0 – вага не подрібненої сировини, г;

V_0 – об'єм, який займає сировина, см³ [5, 26, 62].

Насипна маса. Насипну масу визначали як відношення ваги подрібненої сировини до зайнятого сировиною повного об'єму, який включає пори частинок і пустоти між ними [5, 26, 62]. Для визначення цього показника визначали повний об'єм, який займає у мірному циліндрі подрібнена і попередньо зважена сировина. [5, 26, 62].

Насипну масу (d_n , г/см³) розраховували за формулою:

$$d_n = \frac{P_n}{V_n}, \quad (2.16)$$

де P_n – вага не подрібненої сировини при загаданій вологості, г;

V_n – об'єм, який займає сировина, см³ [5, 26, 62].

Пористість. Пористість визначали відношенням різниці питомої ваги і об'ємної маси до питомої ваги [5, 26, 62].

Пористість сировини ($P_{ш}$, г/см³) обчислювали за формулою:

$$P_{ш} = \frac{d_y - d_0}{d_y}, \quad (2.17)$$

де d_y – питома маса сировини, г/см³;

d_0 – об’ємна вага сировини, г/см³ [5, 26, 62].

Порізність шару. Порізність шару визначали відношенням різниці між об’ємною вагою і насипною масами до об’ємної маси [5, 26, 62].

Порізність шару (P_c , г/см³) обчислювали за формулою:

$$P_c = \frac{d_0 - d_n}{d_0}, \quad (2.18)$$

де d_0 – об’ємна вага сировини, г/см³;

d_n – насипна маса сировини, г/см³ [5, 26, 62].

Вільний об’єм шару. Вільний об’єм шару визначали співвідношенням різниці питомої ваги і насипної маси до питомої ваги [5, 26, 62].

Вільний об’єм шару (V , г/см³) розраховували за формулою:

$$V = \frac{d_y - d_n}{d_y}, \quad (2.19)$$

де d_y – питома маса сировини, г/см³;

d_n – насипна маса сировини, г/см³ [5, 26, 62].

Коефіцієнт поглинання. Коефіцієнт поглинання обчислювали як різницю об’єму екстрагента, яким залили наважку сировини, та об’ємом, що отримали після зливу, віджавши шрот [5, 26, 62].

Розрахунок коефіцієнту поглинання (K_n) проводили за формулою:

$$K_n = \frac{V_n}{V_3}, \quad (2.20)$$

де, V_n – об’єм заливу, мл;

V_3 – об’єм, що отримали після зливу, мл [5, 26, 62].

2.5 Методики дослідження фармакологічної активності

Антибактеріальну та протигрибкову активність шпинату городнього листя екстракту густого визначали на базі ДУ «Інституту мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» під керівництвом с. н. с, канд. біол. наук Т. П. Осолодченко.

Дослідження проводили за рекомендаціями МОЗ, використовуючи музейні тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636 та *Candida albicans* ATCC 885/653 [4].

Вивчення протимікробної активності шпинату городнього листя екстракту густого проводили методом дифузії в агар у модифікації «колодязів». Мікробну суспензію готували за інструкцією інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій» [61, 160]. Мікробні культури синхронізували при 40°C, мікробне навантаження встановлювалось за стандартом McFarland, яке дорівнювало 10^7 мікроорганізмів на 1 см³ двошарового щільного поживного середовища (для бактерій – агар Мюллера-Хінтона, для грибків – агар Сабуро). Для аналізу використовували 18-24 годинну культуру мікроорганізмів [54, 61].

Нижній шар був підложкою «голодного агару» (агар-агар, вода, солі), на яку горизонтально встановлювали від 3 до 6 тонкостінних сталевих циліндрів діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали 14-16 мл попередньо гомогенізованого верхнього шару, який складався з розплавленого поживного агаризованого середовища та відповідного стандарту добової культури тестового мікроорганізму [54, 61]. Після застигання циліндри вилучали стерильним пінцетом, а в утворені лунки поміщали по 0,3 мл розчиненого в 40 % етанолі шпинату городнього листя екстракту густого [54, 61]. Чашки просушували півгодини при кімнатній температурі і залишали в термостаті на 18-24 год [54, 61]. Як референтний препарат використовували Хлорофіліпт.

Протимікробну активність шпинату городнього листа екстракту густого оцінювали за шкалою величини зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунки:

- до 10 мм – мікроорганізм не чутливий до цього лікарського засобу;
- 10-15 мм – низька чутливість штаму до лікарського засобу у досліджуваної концентрації;
- 15-25 мм – мікроорганізм чутливий до досліджуваного лікарського засобу;
- понад 25 мм – високу чутливість мікроорганізмів до антибактеріального засобу [54, 61].

Антирадикальну активність, як здатність до нейтралізації вільних радикалів, визначали методом абсорбційної спектрофотометрії з використанням стабільного радикалу 1,1-дифеніл-2-пікрилгіразилу (DPPH·) [77].

Близько 0,2 г екстракту поміщали у віалу і заливали 4,50 мл 80 % етанолу та витримували при розсіяному світлі та при температурі 20°C на ультразвуковій бані протягом 10 хв. Потім пробу центрифугували протягом 10 хв, надосадову рідину зливали в чисті віали.

Для приготування випробовуваного розчину до 4 мл 5 % розчину DPPH· у 80 % етанолі додавали 0,1 мл одержаного розчину екстракту кімнатної температури, швидко перемішували і протягом 2 хв після приготування вимірювали оптичну густину.

Як розчин порівняння використовували розчин, що складався із 4 мл 5% розчину DPPH· у 80 % етанолі та 0,1 мл 80 % етанолу.

Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 517 нм. Кількісно здатність досліджуваного екстракту нейтралізувати вільний радикал DPPH· (X, %) у еквіваленті хлорогенової кислоти обчислювали за формулою:

$$X = (1 - A) \times 100 \quad (2.21)$$

де A – оптична густина випробовуваного розчину [77].

Гепатопротекторна активність. Дослідження гепатопротекторної активності шпинату городнього листя екстракту густого проводили *in vivo* на базі Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського під керівництвом д. біол. н., проф. Л. С. Фіри.

Для експерименту використовували 60 білих самців щурів, які утримувались на стандартному раціоні віварію Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

При дослідженні гострої токсичності оцінювали загальний стан піддослідних тварин, динаміку приросту їх маси тіла та летальність у групі протягом 14 днів після введення 5000 мг/кг шпинату городнього листя екстракту густого. По закінченні експерименту щурів піддавали евтаназії тіопенталовим наркозом, візуально оглядали пошкоджені органи, визначали їх масу та розраховували масовий коефіцієнт внутрішніх органів [45, 56].

Визначення мінімальної ефективної дози проводили на моделі тетрахлорметанового гепатиту у щурів. Піддослідних тварин ділили на 6 груп. Перша група була контрольною. Тварини цієї групи отримували фізіологічний розчин. У 2-5 групах тварини вживали шпинату городнього листя екстракт густий у дозі від 50 до 200 мг/кг. До 6 групи були включені неліковані тварини з тетрахлорметановим ураженням печінки. Оцінку впливу обраних доз шпинату городнього листя екстракту густого на біохімічні маркери гепатиту в крові та печінці проводили на 4 добу від початку експерименту [39].

Вивчення гепатопротекторної активності проводили на моделі пошкодження клітин печінки тетрахлорметаном. Токсичну речовину у вигляді 50 % олійного розчину в дозі 1,0 мл/кг маси тіла тварин вводили двічі з інтервалом в одну добу. Як референтний препарат використовували гепатопротекторний засіб рослинного походження силімарин під торговою маркою Карсил («Sopharma», Болгарія), який щури отримували у вигляді 1 % крохмальної суспензії внутрішньошлунково у дозі 100 мг/кг маси тіла [43].

Для проведення експерименту тварин розділяли на чотири групи: 1-а – інтактний контроль (6 щурів); 2-а – щури, уражені тетрахлорметаном (18 щурів);

3-я – уражені тетрахлорметаном щури після застосування шпинату городнього листя екстракту густого (18 щурів); 4-а – уражені тетрахлорметаном щури після застосування силімарину (18 щурів) [43].

Евтаназію піддослідних тварин проводили через 3, 6 та 9 діб після початку експерименту, дотримуючись чинних постулатів Конвенції із захисту хребетних тварин [43].

Динаміку біохімічних показників спостерігали у сироватці крові та тканинах печінки. Кров із серця щурів центригували впродовж 30 хв, надосадову рідину використовували для подальшого аналізу. Проби печінки гомогенізували за допомогою магнітного гомогенізатора Silent Crusher S з фізіологічним розчином. Активність окиснювальних процесів та стан антиоксидантної системи після введення коригуючих чинників оцінювали за вмістом ТБК-АП, 2,4-ДНФГ, ЦП та активністю КТ [43].

Статистичну обробку здійснювали з використанням параметричних (Стьюдента) та непараметричних (Вілкоксона) методів аналізу. Вірогідними вважалися зміни при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БАР У СИРОВИНІ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО

3.1 Дослідження вуглеводів

За даними літератури полісахариди, у тому числі крохмаль та клітковина, мають широкий спектр фармакологічної активності. Цим БАР притаманна протизапальна, антибактеріальна, детоксикуюча, антиоксидантна, обволікаюча, імуностимулююча, відхаркувальна, гіпохолестеринемічна, кардіопротекторна та протипухлинна дія [25, 60, 85, 94, 146]. За результатами досліджень корейських вчених, рослинні полісахаридні комплекси зменшували у сироватці крові щурів біохімічні гепатотоксичні маркери (АлАТ, АсАТ, лужну фосфатазу), підвищували активність печінкових антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, глутатіонпероксидази) та покращували гістопатологічні зміни печінки (сповільнювали жирове переродження, проліферацію та некроз гепатоцитів), які були викликані токсичною дією тетрахлорметану [108, 111].

Полісахариди ідентифікували за реакцією з 96 % етанолом в усіх досліджуваних видах сировини шпинату городнього, крохмаль – з розчином Люголя у коренях та насінні обох аналізованих сортів. Кількісний вміст полісахаридів у сировині шпинату городнього визначали гравіметричним методом за методикою, наведеною у підрозділі 2.3. Результати експерименту наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Вміст полісахаридів у сировині шпинату городнього (m=5, P < 0,05)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		15,00 ± 0,69
Красень Полісся	Корені	12,48 ± 0,54
	Листя	19,52 ± 0,90
	Насіння	28,58 ± 1,34
Фантазія	Корені	10,07 ± 0,48
	Листя	17,52 ± 0,78
	Насіння	26,98 ± 1,30

За результатами аналізу встановлено, що вміст полісахаридів був однаково високим у насінні шпинату городнього обох досліджуваних сортів. Максимальне значення було відмічено в насінні сорту Красень Полісся – $(28,58 \pm 1,34) \%$. Вміст досліджуваних БАР у листі шпинату городнього відрізнявся не значно і був майже у 1,5 рази нижчим, ніж у насінні відповідних сортів. Найнижчий вміст полісахаридів зафіксовано у заморожених зразках листя шпинату городнього $(15,00 \pm 0,69) \%$, що було в 1,2-1,3 рази менше, ніж у висушеному листі. У коренях шпинату городнього сорту Фантазія вміст полісахаридів був найнижчим – $(10,07 \pm 0,48) \%$.

Вміст ПР, ГЦ А, ГЦ Б та клітковини визначали гравіметричним методом, крохмалю – поляриметричним за методиками, які наведено у підрозділі 2.3. Результати аналізу представлено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Вміст полісахаридних фракцій у сировині шпинату городнього (m=5,
P < 0,05)**

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, %				
		ПР	ГЦ А	ГЦ Б	Клітковина	Крохмаль
Заморожене листя		4,43 ± 0,21	5,12 ± 1,03	1,47 ± 0,07	7,37 ±0,33	сліди
Красень Полісся	Корені	2,15 ±0,09	6,44 ± 0,28	4,58 ± 0,19	12,86 ± 0,54	9,26 ± 0,43
	Листя	6,62 ± 0,30	4,91 ± 0,87	1,77 ± 0,41	7,15 ± 0,21	сліди
	Насіння	5,63 ±0,27	18,56 ± 0,61	2,01 ± 0,07	30,28 ± 0,61	28,41 ± 0,73
Фантазія	Корені	2,41 ±0,12	5,52 ± 0,24	3,11 ± 0,13	11,10 ± 0,53	7,85 ± 0,43
	Листя	4,18 ± 0,19	5,97 ±0,89	1,01 ± 0,42	8,10 ±0,24	сліди
	Насіння	5,44 ± 0,24	19,87 ± 0,76	2,33 ± 0,08	28,85 ± 0,86	25,21 ± 0,58

За результатами експерименту встановлено, що в усіх об'єктах кількісно переважала фракція ГЦ А, крім листя шпинату городнього, де ПР містилося більше. Вміст ПР досліджуваних зразках листя шпинату городнього був майже на одному рівні і коливався від $(4,18 \pm 0,19)$ до $(6,62 \pm 0,30) \%$. У насінні шпинату городнього, вміст ПР не перевищував $(5,63 \pm 0,27) \%$. Найменша кількість цих БАР містилася у

коренях шпинату городнього.

В усіх зразках сировини вміст ГЦ А переважав вміст ГЦ Б. У листі ГЦ А містилося від $(4,91 \pm 0,87) \%$ до $(6,44 \pm 0,28) \%$. Вміст ГЦ Б у цих об'єктах не перевищував $(1,77 \pm 0,41) \%$. У насінні та коренях ГЦ А містилося у 3-4 рази менше, ніж у листі. Найвищий вміст ГЦ Б відмічено у коренях досліджуваної рослини обох сортів. Максимальне значення цього показника спостерігали у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(4,58 \pm 0,19) \%$.

За вмістом клітковини аналогічні види сировини шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія відрізнялись не значно. Найвищий вміст клітковини був у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія – $(30,28 \pm 0,61) \%$ і $(28,85 \pm 0,86) \%$ відповідно. У коренях обох сортів шпинату городнього клітковини містилося майже втричі менше, ніж в насінні, а у листі – майже у 4 рази менше. Відмічено, що вміст клітковини у листі шпинату городнього досліджуваних сортів та замороженому листі знаходився майже на одному рівні [50].

Максимально високий вміст крохмалю був у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся $(30,28 \pm 0,61 \%)$. У насінні шпинату городнього сорту Фантазія крохмалю акумулювалось дещо менше – $(25,21 \pm 0,58) \%$. У коренях шпинату городнього обох сортів крохмалю містилось майже втричі менше. У листі досліджуваних рослин та замороженому листі шпинату городнього крохмаль виявлено у слідовій кількості [47].

3.2 Дослідження карбонових кислот

Карбонові кислоти в організмі людини виконують різноманітні функції. Вони є високоенергетичними проміжними продуктами, з яких шляхом численних біохімічних реакцій циклу Кребса синтезується АТФ [131, 152]. Крім того, ці сполуки проявляють протизапальну, антиоксидантну, імуностимулюючу, гіпохолестеринемічну активності [68, 113, 131, 152]. Єгипетські дослідники встановили, що терапія лимонною кислотою майже на 30 % знижувала рівень одного з кінцевих продуктів ПОЛ малоциальдегіду, знижувала рівень печінкових біомаркерів АлАТ, АсАТ, глутатіону, лужної фосфатази, лактатдегідрогенази,

параоксонази та білірубін у плазмі крові щурів, уражених малатіолом, зменшувала ступінь запальної інфільтрації, гальмувала некротичні процеси та утворення колагенових волокон в тканинах печінки [66, 113, 131]. Нігерійські вчені повідомляють, що аскорбінова кислота потенціює ферменти СОД, глутатіонпероксидазу та каталазу, нормалізує рівень білірубін, бере участь у багатьох біохімічних функціях як донор електронів, за рахунок чого попереджає мікросомальне перекисне окиснення ліпідів, фіброз та некроз печінки [68].

Поліненасичені жирні кислоти складають невід'ємну частину клітинної мембрани і незамінні для нормального обміну речовин [109]. Дослідження індійських науковців показали, що вживання комплексу ненасичених жирних кислот у дозі понад 300 мг/кг зменшувало кількість печінкових ферментів, зменшувало рівень альбуміну в сироватці крові, нормалізувало ліпідний профіль печінки, покращувало її функціональність на рівні силімарину у щурів з парацетамоловим типом гепатиту [95, 109]. Наведені факти зумовлюють доцільність дослідження карбонових кислот в сировині шпинату городнього.

Ідентифікація та кількісне визначення органічних кислот та аскорбінової кислоти.

Органічні кислоти ідентифікували у водних витяжках методом ПХ у рухомих фазах № 1 і 2, методом ТШХ у рухомій фазі № 3 за характерним забарвленням зон на синьому фоні при денному світлі після обробки реактивами А, Б та В у порівнянні зі стандартними зразками органічних кислот.

За результатами аналізу в усіх досліджуваних об'єктах було ідентифіковано яблучну та лимонну кислоти. Крім того, в усіх зразках листя шпинату городнього виявлено щавлеву та малонову кислоти, у листі та насінні обох сортів – аскорбінову кислоту.

Кількісний вміст органічних кислот визначали алкаліметричним методом за методикою, яка наведена у монографії «Шипшини плоди^N» ДФУ 2.1 [21]. Результати визначення вмісту органічних кислот у сировині шпинату городнього наведено у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Вміст органічних кислот у сировині шпинату городнього
(m = 5, P < 0,05)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на яблучну кислоту й абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		$1,66 \pm 0,03$
Красень Полісся	Корені	$1,36 \pm 0,06$
	Листя	$3,82 \pm 0,08$
	Насіння	$1,71 \pm 0,04$
Фантазія	Корені	$1,09 \pm 0,07$
	Листя	$3,95 \pm 0,09$
	Насіння	$1,52 \pm 0,03$

За результатами аналізу вміст органічних кислот в одноім'єнних органах шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія відрізнявся не значно. Кількісно органічні кислоти превалювали у листі шпинату городнього сортів Фантазія ($3,95 \pm 0,09$ %) і Красень Полісся ($3,82 \pm 0,08$ %). Встановлено, що вміст органічних кислот у замороженому листі досліджуваної рослини був у 2,3 рази нижчим, ніж у інших зразках листя шпинату городнього, і на одному рівні з їх вмістом у насінні. У насінні обох сортів акумулювалось у 2-2,5 рази менше органічних кислот у порівнянні з їх вмістом у листі. На мінімальному рівні ці БАР містилися у коренях обох сортів досліджуваної рослини, їх вміст не перевищував ($1,36 \pm 0,06$) % [7, 49].

Вміст аскорбінової кислоти визначали спектрофотометричним методом за методикою, наведеною в монографії «Шипшина» ДФУ 2.0.3 [19]. Одержані результати наведено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Вміст аскорбінової кислоти в сировині шпинату городнього
(m = 5, P < 0,05)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		$0,15 \pm 0,01$
Красень Полісся	Корені	сліди
	Листя	$0,18 \pm 0,01$
	Насіння	сліди
Фантазія	Корені	сліди
	Листя	$0,13 \pm 0,01$
	Насіння	сліди

Результати експерименту показали, що у коренях та насінні обох сортів аскорбінова кислота була присутня у слідовій кількості. Вміст цієї сполуки у листі шпинату городнього досліджуваних сортів та замороженому листі цієї рослини відрізнявся незначно і коливався від $(0,13 \pm 0,01)$ до $(0,18 \pm 0,01)$ % [49].

Кількісний вміст щавлевої кислоти у досліджуваних зразках коренів, листя та насіння шпинату городнього визначали методом перманганатометрії. Результати експерименту наведено у табл. 3.5.

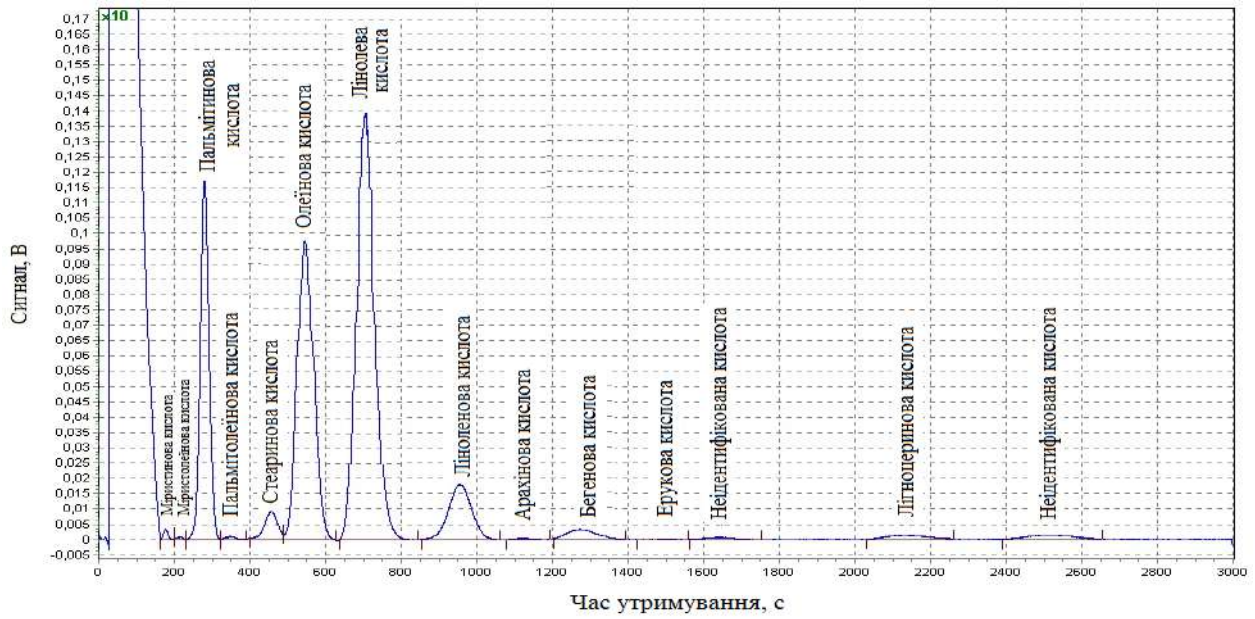
Таблиця 3.5

Вміст щавлевої кислоти в сировині шпинату городнього
(m = 5, P < 0,05)

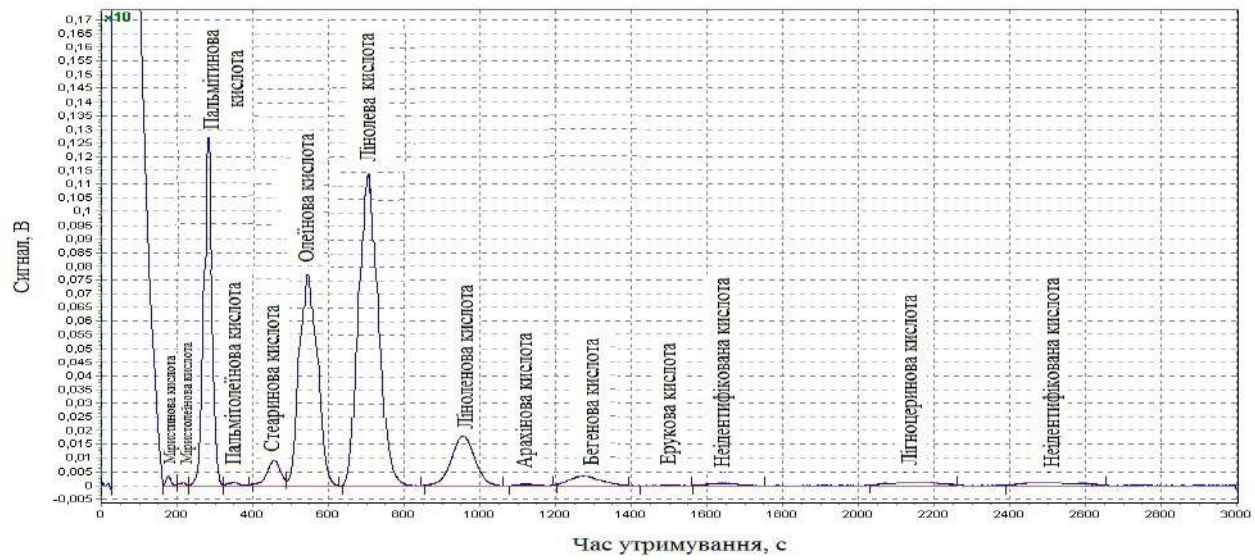
Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		$0,77 \pm 0,04$
Красень Полісся	Корені	сліди
	Листя	$0,93 \pm 0,04$
	Насіння	$0,08 \pm 0,01$
Фантазія	Корені	сліди
	Листя	$0,89 \pm 0,04$
	Насіння	$0,07 \pm 0,01$

За результатами експерименту, найвищий вміст щавлевої кислоти було відмічено у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся $(0,93 \pm 0,04)$ %. У листі шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі цієї рослини щавлевої кислоти містилося дещо менше – $(0,89 \pm 0,04)$ та $(0,77 \pm 0,04)$ % відповідно. Вміст щавлевої кислоти у насінні шпинату городнього був залежно від сорту у 11-13 разів нижчий, ніж у листі цієї рослини. У коренях шпинату городнього обох досліджуваних сортів щавлева кислота містилася у слідовій кількості.

Якісний склад та кількісний вміст жирних кислот у сировині шпинату городнього вивчали методом ГХ. Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту жирних кислот у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія методом ГХ, наведено на рис. 3.1, 3.2 та 3.3 відповідно. Якісний склад та кількісний вміст ідентифікованих жирних кислот у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія наведено у табл. 3.6.



А



Б

Рис. 3.1 Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту жирних кислот у коренях шпинату городнього сортів Красень Полісся (А) та Фантазія (Б) методом ГХ

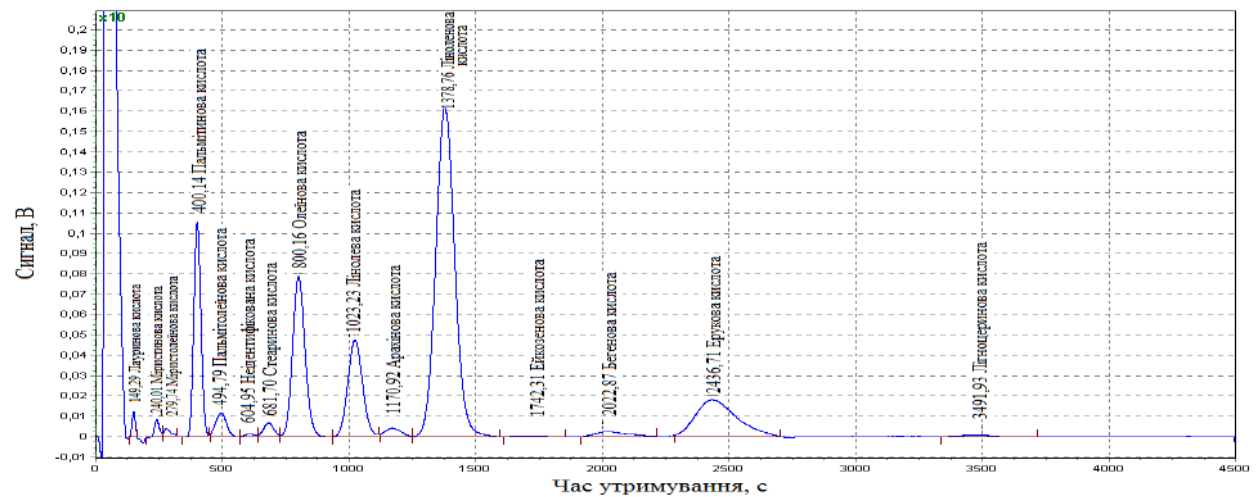
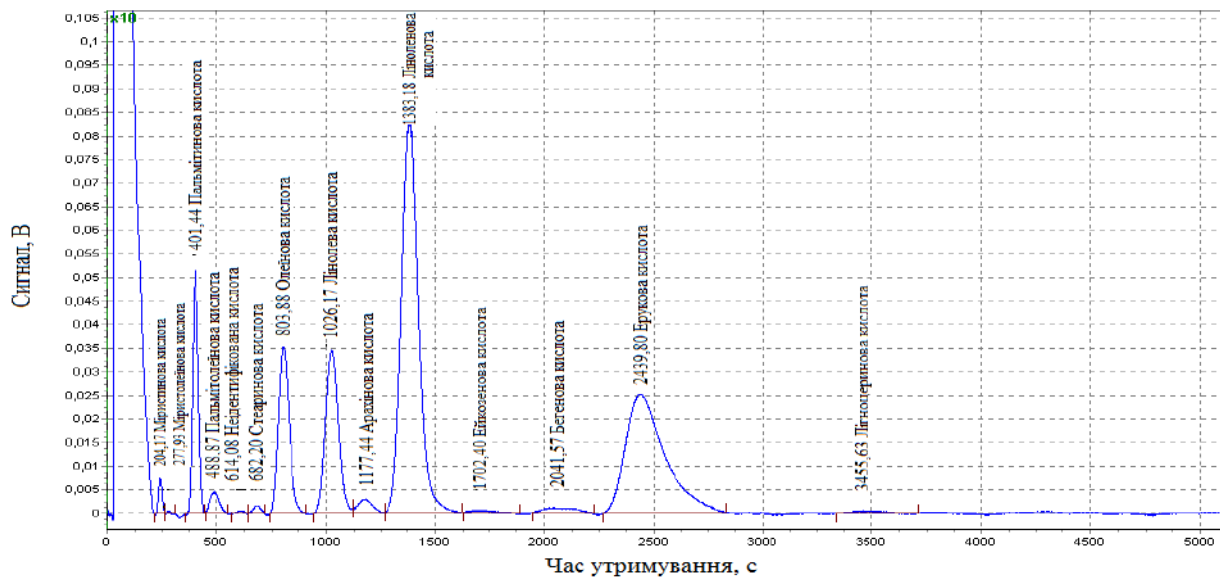
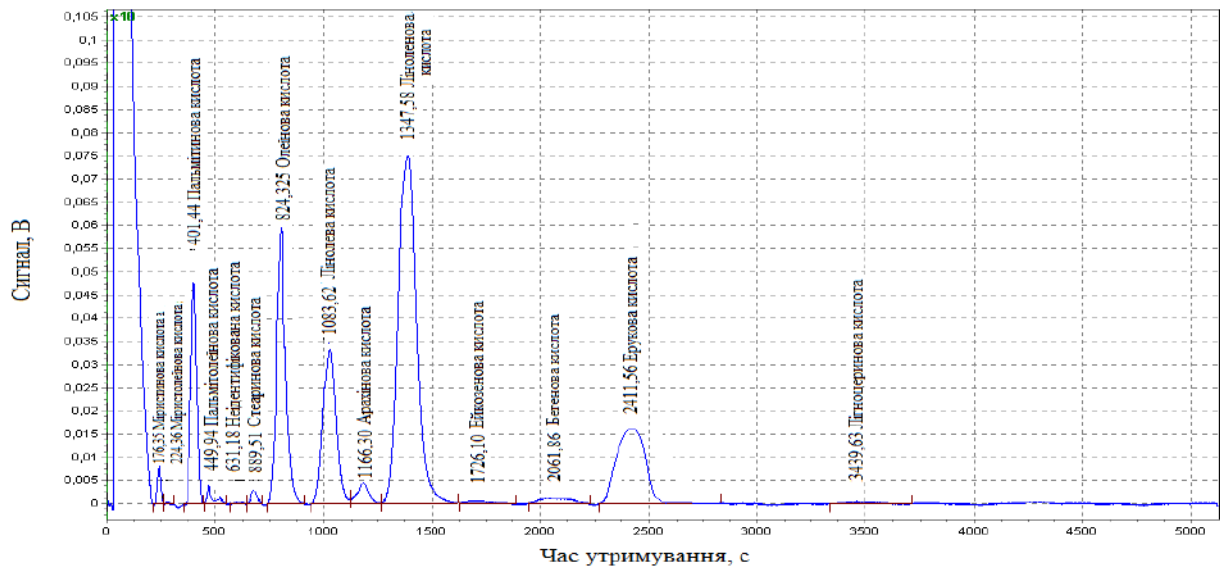


Рис. 3.2 Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту жирних кислот у замороженому листі шпинату городнього (А) та листі шпинату городнього сортів Красень Полісся (Б) та Фантазія (В) методом ГХ

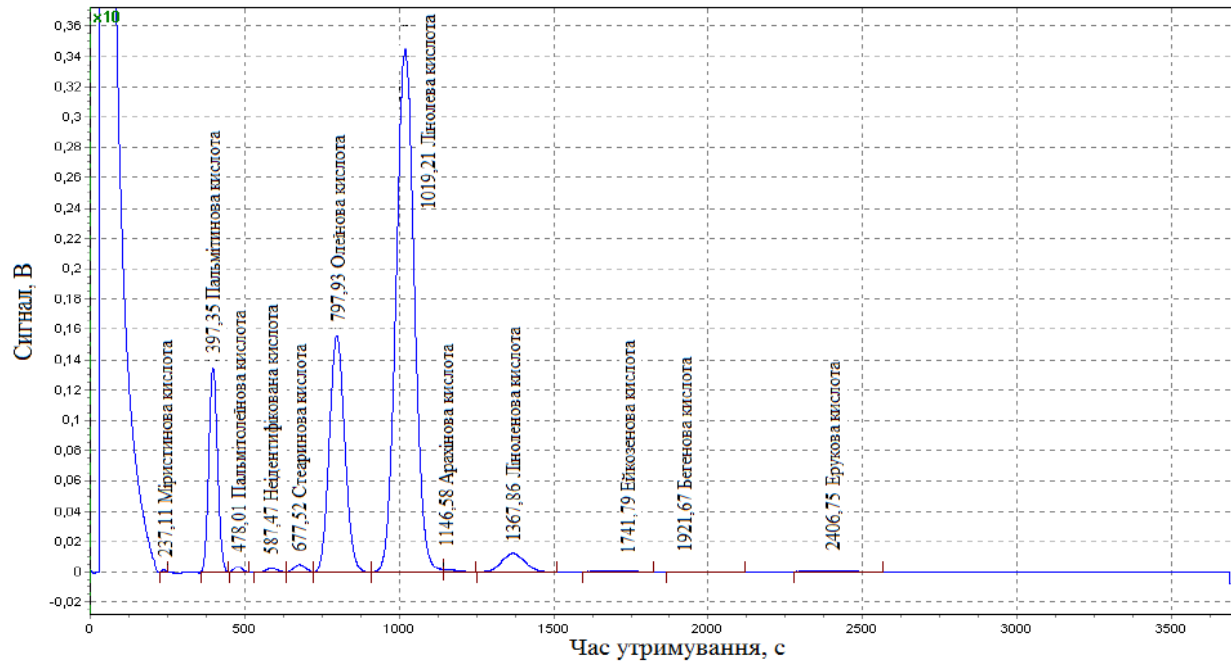
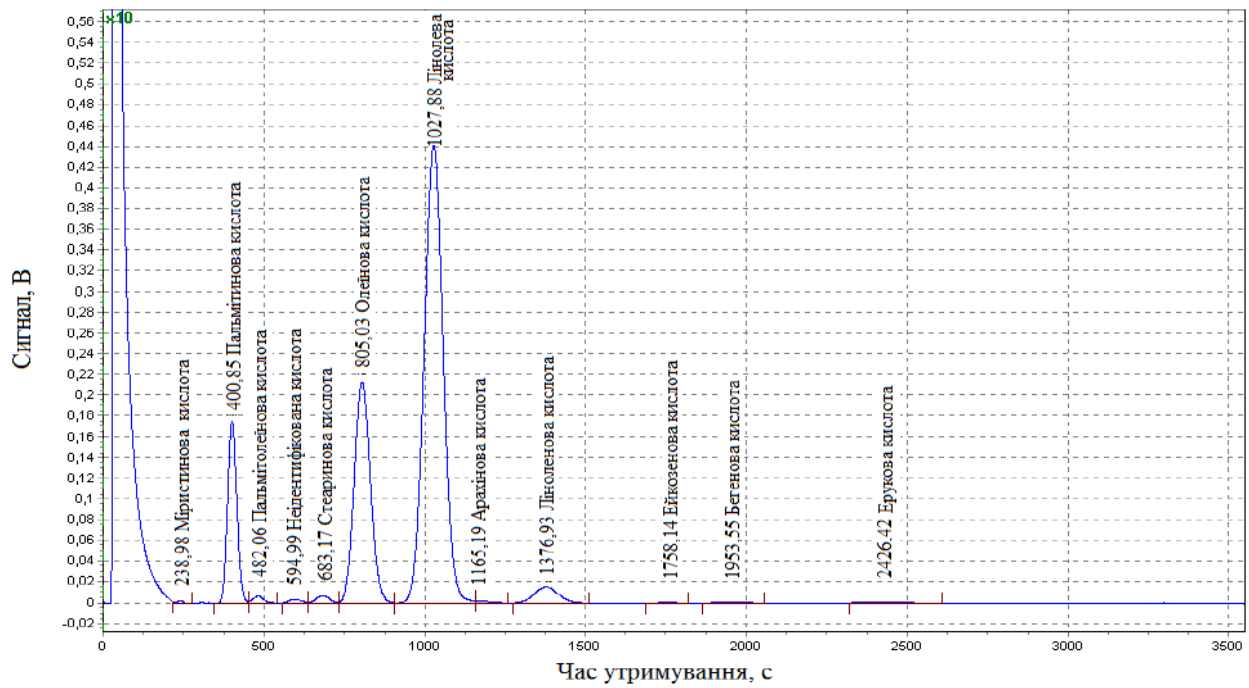


Рис. 3.3 Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту жирних кислот у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся (А) та Фантазія (Б) методом ГХ

Таблиця 3.6

Вміст жирних кислот у сировині шпинату городнього (m = 5, P < 0,05)

Кислота	Вміст жирних кислот у перерахунку на абсолютно суху сировину, %						
	корені		листя			насіння	
	Красень Полісся	Фантазія	заморожене	Красень Полісся	Фантазія	Красень Полісся	Фантазія
Насичені жирні кислоти							
Лауринова	—	—	—	—	0,60 ± 0,02	—	—
Міристинова	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,83 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,58 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Пальмітинова	10,34 ± 0,25	12,04 ± 0,30	8,45 ± 0,21	8,76 ± 0,22	11,34 ± 0,28	11,58 ± 0,29	11,50 ± 0,29
Стеаринова	2,15 ± 0,05	1,98 ± 0,05	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,01	1,05 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,55 ± 0,01
Арахінова	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01	1,26 ± 0,03	1,20 ± 0,03	1,02 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Бегенова	1,48 ± 0,04	1,40 ± 0,04	1,24 ± 0,03	1,18 ± 0,03	1,10 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Лігноцеринова	1,20 ± 0,03	1,22 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,32 ± 0,01	—	—
Сума насичених кислот	15,81 ± 0,40	17,39 ± 0,43	12,24 ± 0,31	12,41 ± 0,31	16,01 ± 0,40	12,53 ± 0,31	12,38 ± 0,30
Ненасичені жирні кислоти							
Міристолеїнова	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,1	0,07 ± 0,01	0,35 ± 0,01	—	—
Пальмітолеїнова	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	1,42 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,95 ± 0,05	0,45 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Олеїнова	25,43 ± 0,64	24,35 ± 0,61	11,69 ± 0,29	10,72 ± 0,27	14,55 ± 0,36	24,55 ± 0,61	23,40 ± 0,59
Лінолева	47,05 ± 1,18	45,50 ± 1,14	13,55 ± 0,34	12,32 ± 0,31	10,47 ± 0,26	59,40 ± 1,49	60,68 ± 1,52
Ліноленова	10,15 ± 0,25	11,20 ± 0,28	38,71 ± 0,97	37,45 ± 0,94	45,45 ± 1,14	2,52 ± 0,06	2,72 ± 0,07
Гондоїнова	—	—	0,22 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,03
Ерукова	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	21,59 ± 0,54	25,40 ± 0,64	10,93 ± 0,27	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Сума ненасичених кислот	82,99 ± 2,07	81,46 ± 2,04	87,28 ± 2,18	87,49 ± 2,19	83,80 ± 2,10	87,17 ± 2,18	87,37 ± 2,18
Сума неідентифікованих кислот	1,20 ± 0,03	1,15 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,25 ± 0,01

У ході дослідження встановлено, що за якісним складом та кількісним вмістом жирних кислот одноіменна сировина досліджуваних сортів відрізнялась незначно.

За результатами експерименту, в насінні шпинату городнього обох досліджуваних сортів ідентифіковано по 11 жирних кислот, у коренях – 12, у замороженому листі шпинату городнього та листі цієї рослини сорту Красень Полісся – 13, у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 14 жирних кислот. Серед ідентифікованих у коренях та насінні шпинату городнього обох сортів містилося по 6, в усіх зразках листя цієї рослини – по 7 ненасичених жирних кислот.

За вмістом в усіх досліджуваних зразках переважали ненасичені жирні кислоти. Найменша кількість ненасичених жирних кислот накопичувалася у коренях шпинату городнього досліджуваних сортів та листі цієї рослини сорту Фантазія і була у межах $(81,46 \pm 2,04)$ до $(83,80 \pm 2,10)$ %. У інших зразках сировини досліджуваних рослин вміст цих сполук був дещо вищий, проте не перевищував $(87,49 \pm 2,19)$ %. Насичених жирних кислот у коренях шпинату городнього обох сортів та листі цієї рослини сорту Фантазія містилося майже у 5 разів менше, ніж ненасичених, у насінні аналізованих рослин, замороженому листі та листі шпинату городнього сорту Фантазія – майже у 7 разів менше. Найвищий вміст насичених жирних кислот відмічено у коренях шпинату городнього сорту Фантазія – $(17,39 \pm 0,43)$ %. Мінімальна кількість цих сполук накопичувалась у замороженому листі шпинату городнього – $(12,24 \pm 0,31)$ %.

Серед насичених жирних кислот в усіх досліджуваних об'єктах домінувала пальмітинова кислота. Найвищий вміст цієї сполуки був у коренях шпинату городнього сорту Фантазія $(12,04 \pm 0,30)$ %, найнижчий – у замороженому листі шпинату городнього – $(8,45 \pm 0,21)$ %. Найвища кількість стеаринової $(2,15 \pm 0,05)$ % та бегенової $(1,48 \pm 0,04)$ % кислот була у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся, арахінової – у листі цієї рослини, лігноцеринової кислоти – у замороженому листі шпинату городнього. Лауринову кислоту ідентифіковано лише у листі шпинату городнього сорту Фантазія $(0,60 \pm 0,02)$ %.

Серед ненасичених жирних кислот в усіх зразках коренів та насіння превалювала лінолева кислота, крім листя шпинату городнього, де більше накопичувалося ліноленової кислоти. Однаково високий вміст даної кислоти зафіксовано у насінні шпинату городнього досліджуваних сортів – 59,40 – 60,68 %. Дещо менше цієї сполуки містилося у коренях досліджуваних рослин, її вміст не перевищував $(25,43 \pm 0,64)$ %. У замороженому листі $(13,55 \pm 0,34 \%)$ лінолевої кислоти містилося у 4,5 рази, ніж у насінні, у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся $(12,32 \pm 0,31 \%)$ та Фантазія $(10,47 \pm 0,26 \%)$ – у 5-6 разів менше.

На максимальному рівні ліноленова кислота містилася у листі шпинату городнього сорту Фантазія $(45,45 \pm 1,14 \%)$. У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся $(38,71 \pm 0,97 \%)$ та замороженому листі $(37,45 \pm 0,94 \%)$ шпинату городнього ліноленової кислоти містилося дещо менше. У коренях шпинату городнього цієї сполуки накопичувалося майже у 4-4,5 рази менше у порівнянні з її максимальним вмістом у листі шпинату городнього сорту Фантазія. У насінні досліджуваних рослин вміст ліноленової кислоти не перевищував $(2,72 \pm 0,07) \%$.

Олеїнової кислоти у коренях і насінні рослини містилася майже однакова кількість і була в межах від $(23,40 \pm 0,59) \%$ до $(25,43 \pm 0,64) \%$. Вміст цієї сполуки у листі шпинату городнього обох сортів та замороженому листі відрізнявся незначно і був майже вдвічі нижчим, ніж у коренях досліджуваної рослини, де її містилося найбільше.

В усіх зразках листя шпинату городнього відмічено високий вміст ерукової кислоти. На максимальному рівні вона містилася у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(25,40 \pm 0,64) \%$. У замороженому листі цієї сполуки накопичувалося дещо менше – $(21,59 \pm 0,54) \%$, у листі шпинату городнього сорту Фантазія $(10,93 \pm 0,27 \%)$ ерукової кислоти містилося майже у 2,5 рази менше, ніж у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся.

Міристинової кислоти в усіх досліджуваних об'єктах, стеаринової та гондоїнової кислот у листі та насінні, лігноцеринової у листі, міристолеїнової в коренях і листі, арахінової, пальмітолеїнової та ерукової кислот у коренях і насінні шпинату городнього обох досліджуваних сортів накопичувалося менше 1 % [12, 15].

3.3 Дослідження нітрогенвмісних сполук

У природі існує понад 700 видів амінокислот, але для утворення білків використовується лише близько 20 з них. Печінка є важливим органом, в якому відбуваються процеси синтезу та катаболізму білків і знешкодження токсичних сполук. Без амінокислот, зокрема аланіну, аспартату, глутамату, гліцину, серину, гістидину та треоніну не можуть відбуватися процеси клітинного метаболізму, синтезу нуклеотидів, регенерації клітинних стінок, у тому числі гепатоцитів [124]. Введення мишам з алкогольним гепатитом сульфурвмісних амінокислот цистеїну та метіоніну сприяло сповільненню росту гепатоцелюлярної карциноми, пришвидшувало процеси детоксикації організму [121]. Корейськими дослідниками встановлено, що збагачені лейцином, лізином та аргініном гідролізати протеїнів зменшують рівень ензимів АлАТ, АсАТ, глутамінової оксалооцтової трансамінази та загального холестерину в плазмі крові мишей з етанольною формою гепатиту [117].

Наявність нітрогенвмісних сполук (амінокислот та протеїнів) у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія було попередньо підтверджено за допомогою хімічних реакцій з 0,2 % розчином нінгідрину, ксантопротеїнової та біуретової реакцій.

Ідентифікація та визначення кількісного вмісту амінокислот в сировині шпинату городнього

Методом ПХ у рухомій фазі № 4 та методом ТШХ у рухомій фазі № 5 у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженому листі цієї рослини ідентифіковано по 11, у коренях та насінні – по 8 амінокислот, які ідентифікували за синім та синьо-фіолетовим забарвленням зон у денному світлі. В усіх об'єктах було виявлено лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин та аргінін, що за кольором та розташуванням на хроматограмах відповідали стандартним зразкам амінокислот. Крім того, у листі обох досліджуваних рослин та замороженому листі шпинату городнього виявлено гліцин, у листі та коренях досліджуваних сортів – фенілаланін та серин, у листі та насінні – треонін та цистеїн.

Кількісний вміст суми вільних амінокислот у сировині шпинату городнього визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методикою, яка викладена у підрозділі 2.3. Спектри поглинання водних витяжок із сировини шпинату городнього з 0,2 % розчином нінгідрину в ізопропанолі у видимій ділянці світла в діапазоні 520-630 нм наведено на рис. 3.4.

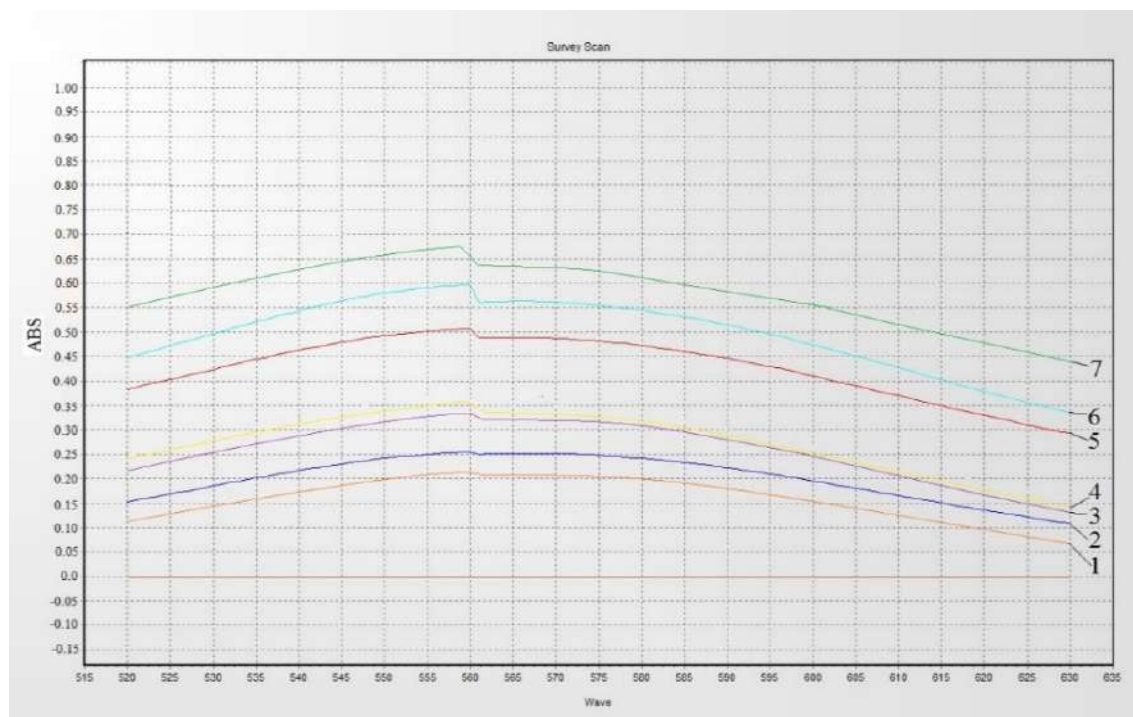


Рис. 3.4 Спектри поглинання у видимій ділянці світла водних витяжок з 0,2 % розчином нінгідрину в ізопропанолі у діапазоні 520-630 нм: 1 – насіння шпинату городнього сорту Красень Полісся; 2 – насіння шпинату городнього сорту Фантазія; 3 – корені шпинату городнього сорту Красень Полісся; 4 – корені шпинату городнього сорту Фантазія; 5 – заморожене листя шпинату городнього; 6 – листя шпинату городнього сорту Красень Полісся; 7 – листя шпинату городнього сорту Фантазія

Результати визначення кількісного вмісту суми вільних амінокислот у коренях, листі та насінні шпинату городнього наведено у табл. 3.7.

Вміст суми вільних амінокислот в сировині шпинату городнього
(m = 5, P < 0,05)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на лейцин й абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		2,63 ± 0,07
Красень Полісся	Корені	1,16 ± 0,03
	Листя	3,00 ± 0,08
	Насіння	0,04 ± 0,01
Фантазія	Корені	1,29 ± 0,03
	Листя	3,21 ± 0,08
	Насіння	0,06 ± 0,01

За результатами аналізу максимальний вміст суми вільних амінокислот був у листі шпинату городнього сорту Фантазія – (3,21 ± 0,08) %. У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся та замороженому листі цієї рослини вміст даної групи БАР відрізнявся незначно і становив (3,00 ± 0,08) та (2,63 ± 0,07) % відповідно.

У коренях шпинату городнього аналізованих сортів містилося у 2,5-2,8 рази менше суми вільних амінокислот, ніж у листі шпинату городнього сорту Фантазія із найвищим їх вмістом. У насінні шпинату городнього амінокислот містилося найменше: (0,04 ± 0,01) % у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся, (0,06 ± 0,01) % у насінні шпинату городнього сорту Фантазія [46].

Дослідження амінокислотного складу коренів, листя та насіння шпинату городнього проводили методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії за методикою, яка наведена у розділі 2.3.

Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту амінокислот у коренях шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії, наведено на рис. 3.5.

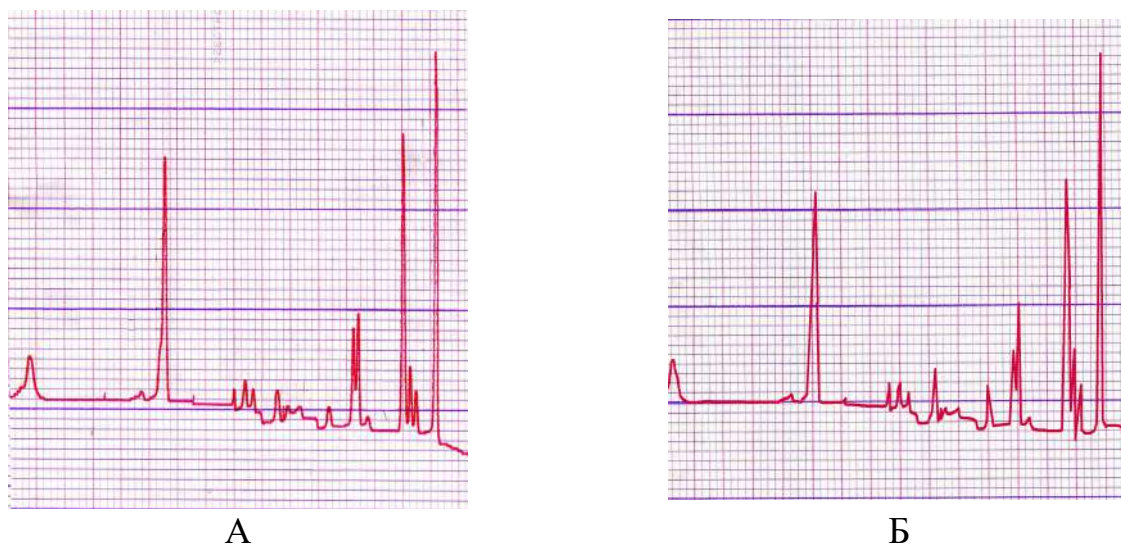


Рис. 3.4 Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту амінокислот у коренях шпинату городнього сортів Красень Полісся (А) та Фантазія (Б) методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії

Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту амінокислот у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся і Фантазія та замороженому листі шпинату городнього наведено на рис. 3.6-3.7 відповідно.

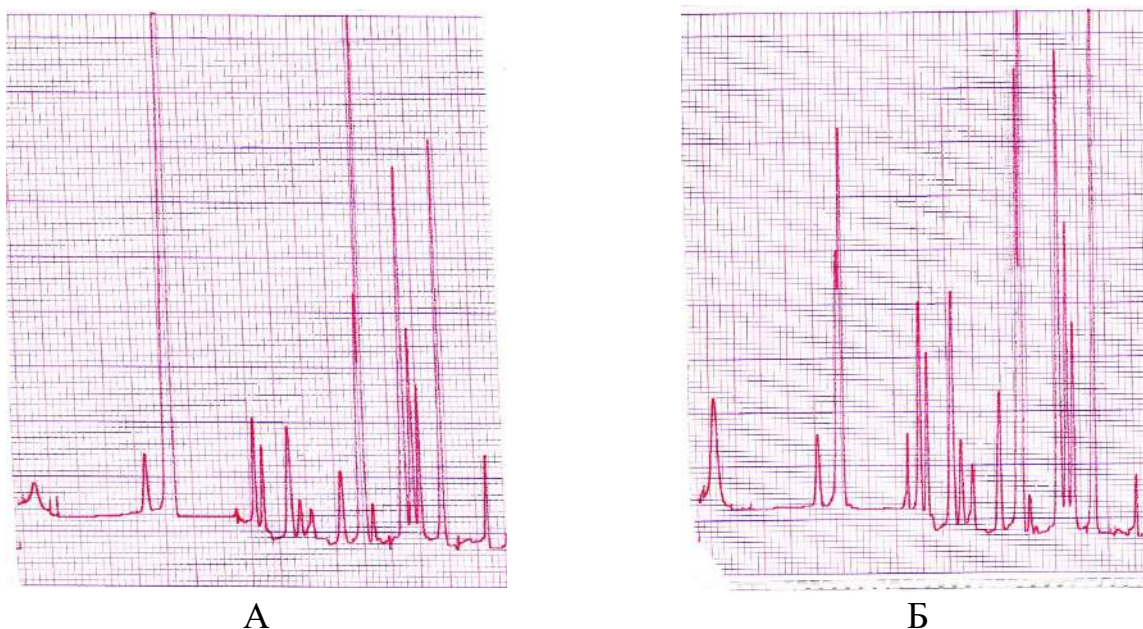


Рис. 3.6 Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту амінокислот у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся (А) і Фантазія (Б) та замороженому листі шпинату городнього методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії

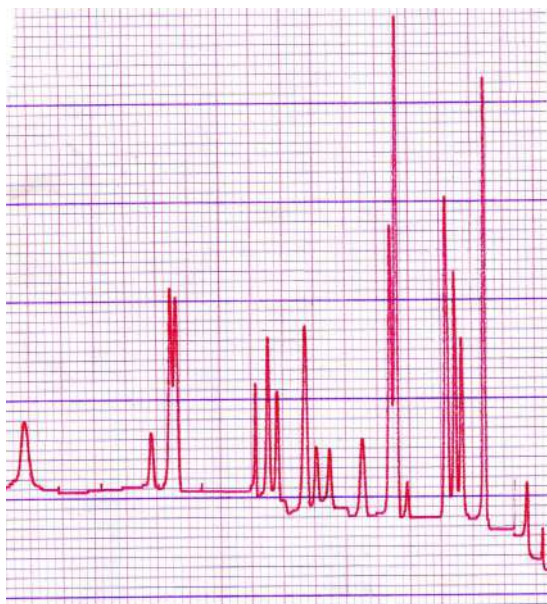
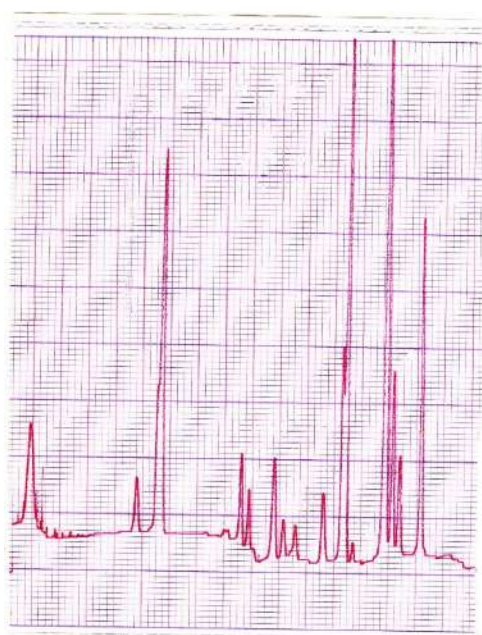
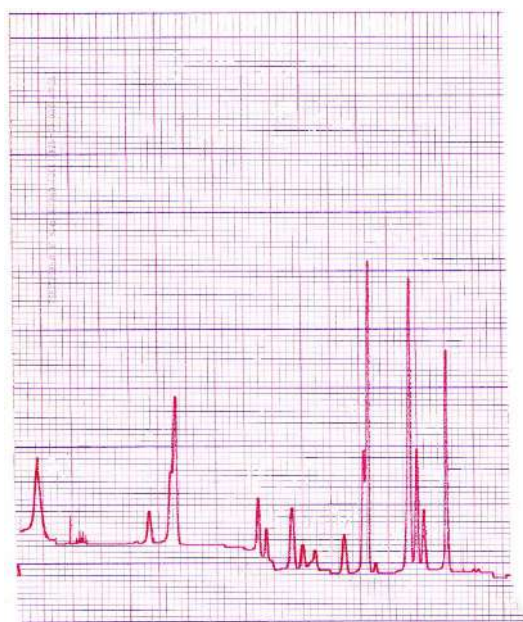


Рис. 3.7 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту амінокислот у замороженому листі шпинату городнього методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії

Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту амінокислот у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, наведено на рис. 3.8.



А



Б

Рис. 3.8 Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту амінокислот у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся (А) та Фантазія (Б) методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії

Якісний склад та кількісний вміст ідентифікованих сполук наведено у табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Вміст амінокислот у сировині шпинату городнього (m = 5, P < 0,05)

Кислота	Вміст амінокислот у перерахунку на абсолютно суху сировину, мг/кг						
	корені		листя			насіння	
	Красень Полісся	Фантазія	заморожене	Красень Полісся	Фантазія	Красень Полісся	Фантазія
Замінні амінокислоти							
ГАМК	1,06 ± 0,03	2,08 ± 0,05	1,05 ± 0,03	0,27 ± 0,01	1,26 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Аспарагінова кислота	3,03 ± 0,08	5,08 ± 0,13	14,35 ± 0,36	17,87 ± 0,45	14,04 ± 0,35	10,95 ± 0,27	9,26 ± 0,23
Серин	1,59 ± 0,04	2,63 ± 0,07	6,79 ± 0,15	8,78 ± 0,22	7,43 ± 0,19	5,66 ± 0,14	4,74 ± 0,12
Глутамінова кислота	9,95 ± 0,25	8,71 ± 0,09	23,22 ± 0,58	29,03 ± 0,73	21,45 ± 0,54	30,96 ± 0,77	21,54 ± 0,54
Пролін	2,72 ± 0,07	5,36 ± 0,13	12,15 ± 0,30	15,22 ± 0,38	8,67 ± 0,22	5,72 ± 0,14	3,34 ± 0,08
Гліцин	1,15 ± 0,03	2,30 ± 0,06	11,83 ± 0,30	13,25 ± 0,33	7,88 ± 0,20	10,17 ± 0,25	7,17 ± 0,18
Аланін	2,65 ± 0,07	1,61 ± 0,04	7,69 ± 0,19	9,60 ± 0,24	10,38 ± 0,26	6,01 ± 0,15	4,41 ± 0,11
Цистеїн	0,60 ± 0,02	1,04 ± 0,03	1,43 ± 0,04	2,22 ± 0,06	2,38 ± 0,06	1,88 ± 0,05	1,67 ± 0,04
Тирозин	0,66 ± 0,02	0,72 ± 0,02	5,86 ± 0,15	5,46 ± 0,14	6,14 ± 0,15	2,70 ± 0,07	1,80 ± 0,05
Сума замінних кислот	23,41 ± 0,59	29,53 ± 0,61	83,66 ± 2,09	101,70 ± 2,54	79,63 ± 1,99	74,22 ± 1,86	54,06 ± 1,35
Незамінні амінокислоти							
Лізин	1,37 ± 0,03	2,44 ± 0,06	6,69 ± 0,17	11,90 ± 0,30	8,07 ± 0,20	5,74 ± 0,14	3,76 ± 0,09
Гістидин	0,65 ± 0,02	0,38 ± 0,01	3,93 ± 0,10	4,23 ± 0,11	3,04 ± 0,08	3,05 ± 0,08	2,21 ± 0,06
Аргінін	1,24 ± 0,03	1,06 ± 0,03	5,15 ± 0,13	3,87 ± 0,10	10,05 ± 0,25	12,23 ± 0,31	9,90 ± 0,25
Треонін	1,20 ± 0,03	2,12 ± 0,05	5,88 ± 0,15	7,69 ± 0,19	5,99 ± 0,15	3,62 ± 0,09	2,88 ± 0,07
Валін	2,23 ± 0,06	1,38 ± 0,03	3,86 ± 0,10	3,62 ± 0,09	4,09 ± 0,10	2,54 ± 0,06	1,87 ± 0,05
Метіонін	0,36 ± 0,01	0,74 ± 0,02	2,40 ± 0,06	1,90 ± 0,05	2,42 ± 0,06	1,54 ± 0,04	1,17 ± 0,03
Ізолейцин	1,66 ± 0,04	0,91 ± 0,02	3,59 ± 0,09	3,41 ± 0,09	4,32 ± 0,11	2,42 ± 0,06	1,90 ± 0,05
Лейцин	1,69 ± 0,04	2,75 ± 0,07	13,62 ± 0,34	9,53 ± 0,24	11,75 ± 0,29	6,28 ± 0,16	4,87 ± 0,12
Фенілаланін	1,55 ± 0,04	0,80 ± 0,02	8,11 ± 0,20	7,24 ± 0,18	8,35 ± 0,21	4,43 ± 0,11	3,51 ± 0,09
Сума незамінних кислот	11,95 ± 0,30	12,58 ± 0,31	53,23 ± 1,33	53,39 ± 1,33	58,08 ± 1,45	41,85 ± 1,05	32,07 ± 0,80
Сума ідентифікованих кислот	35,36 ± 0,88	42,11 ± 0,93	136,89 ± 3,42	155,09 ± 3,88	137,71 ± 3,44	116,07 ± 2,90	86,13 ± 2,15

Дослідження амінокислотного складу коренів, листя та насіння шпинату городнього показало, що суттєвої різниці у якісному складі та кількісному вмісті цих сполук в аналогічних видах сировини даної рослини не існує.

За результатами експерименту в усіх досліджуваних об'єктах було ідентифіковано по 18 амінокислот, із яких 9 – це незамінні амінокислоти.

Найбільше амінокислот накопичувалося у листі шпинату городнього. Максимальний вміст цих сполук був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(155,09 \pm 3,88)$ мг/кг. У листі шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі цієї рослини вміст амінокислот був майже на одному рівні й становив $(137,71 \pm 3,44)$ і $(136,89 \pm 3,42)$ мг/кг. У насінні шпинату городнього сумарний вміст ідентифікованих амінокислот був у 1,3-1,8 рази і не перевищував $(116,07 \pm 2,90)$ мг/кг. У коренях цієї рослини амінокислот містилося майже в 4 рази менше і знаходилося в межах $(35,36 \pm 0,88)$ – $(42,11 \pm 0,93)$ мг/кг.

В усіх досліджуваних об'єктах близько третини від сумарного вмісту припадало на незамінні амінокислоти. Найбільше їх спостерігалось у листі шпинату городнього сорту Фантазія $(58,08 \pm 1,45)$ мг/кг) і дещо менше – у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся та замороженому листі цієї рослини – $(53,39 \pm 1,33)$ та $(53,23 \pm 1,33)$ мг/кг відповідно. У насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся $(41,85 \pm 1,05)$ мг/кг) та Фантазія $(32,07 \pm 0,80)$ мг/кг) вміст амінокислот був у 1,4 та 1,8 разів відповідно нижчим. У коренях рослини незамінних амінокислот накопичувалося у 4,6-5 разів менше у порівнянні з їх максимальним вмістом у листі шпинату городнього сорту Фантазія.

Замінних амінокислот найбільше акумулювалось у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(101,70 \pm 2,54)$ мг/кг. У листі шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі цієї рослини вміст цих сполук становив $(83,66 \pm 2,09)$ та $(79,63 \pm 1,99)$ мг/кг. У насінні шпинату городнього вміст замінних амінокислот не перевищував $(74,22 \pm 1,86)$ мг/кг, у коренях – $(29,53 \pm 0,61)$ мг/кг.

Серед замінних амінокислот в усіх досліджуваних видах сировини превалювали глютамінова та аспарагінова кислоти. Крім того, у коренях та листі

шпинату городнього у значній кількості містився пролін, у насінні – гліцин.

Найвищий вміст глютамінової кислоти було відмічено у листі та насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(30,96 \pm 0,77)$ і $(29,03 \pm 0,73)$ мг/кг відповідно, що складало близько 19 та 27 % відповідно від загального вмісту амінокислот у цій сировині. У листі та насінні шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі цієї рослини містилося у 1,5 рази менше цієї амінокислоти – від $(21,45 \pm 0,45)$ до $(23,22 \pm 0,58)$ мг/кг. Найменше глютамінової кислоти накопичувалося у коренях шпинату городнього сорту Фантазія $(8,71 \pm 0,09)$ мг/кг.

Аспарагінової кислоти у коренях та насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся містилося майже у 3 рази менше, у коренях та насінні шпинату городнього сорту Фантазія – у 2 рази менше, в усіх зразках листя цієї рослини – майже в 1,5 рази менше, ніж глютамінової кислоти у цих об'єктах.

Гліцину в насінні досліджуваної рослини обох сортів містилося майже втричі менше, ніж глютамінової кислоти. Вміст проліну в усіх зразках листя шпинату городнього був у межах від $(8,67 \pm 0,22)$ до $(15,22 \pm 0,38)$ мг/кг, що складало майже половину від вмісту глютамінової кислоти у цій сировині.

Серед незамінних амінокислот у коренях та листі шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі цієї рослини домінував лейцин. На максимальному рівні ця сполука містилася у замороженому листі шпинату городнього – $(13,62 \pm 0,34)$ мг/кг. У коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся превалював валін $(2,23 \pm 0,06)$ мг/кг, у листі цієї рослини – лізин $(11,90 \pm 0,30)$ мг/кг. У насінні шпинату городнього обох досліджуваних сортів мажоритарною амінокислотою був аргінін, вміст якого не перевищував $(12,23 \pm 0,31)$ мг/кг.

У ході дослідження відмічено, що незамінні амінокислоти гістидин $(4,23 \pm 0,11)$ мг/кг та треонін $(7,69 \pm 0,19)$ мг/кг у максимальній кількості накопичувались у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся, валін $(4,09 \pm 0,10)$ мг/кг, метіонін $(2,42 \pm 0,06)$ мг/кг та ізолейцин $(4,32 \pm 0,11)$ мг/кг – у листі сорту Фантазія [140].

Визначення кількісного вмісту протеїну

Кількісний вміст протеїну у сировині шпинату городнього визначали методом К'ельдаля за загальним вмістом нітрогену за методикою, яка наведена у підрозділі 2.3.

Результати проведеного аналізу наведено у табл. 3.9.

Таблиця 3.9.

Вміст протеїну в сировині шпинату городнього (m = 5, P < 0,05)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на загальний нітроген й абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		26,11 ± 0,65
Красень Полісся	Корені	2,80 ± 0,07
	Листя	29,82 ± 0,89
	Насіння	12,75 ± 0,38
Фантазія	Корені	3,00 ± 0,08
	Листя	33,10 ± 0,99
	Насіння	14,48 ± 0,58

Результати дослідження показали, що вміст протеїну в ідентичних органах шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія майже не відрізнявся.

Однаково високий вміст протеїну, за результатами експерименту, відмічено в усіх зразках листя досліджуваної рослини. Максимальне значення цього показника було у листі шпинату городнього сорту Фантазія – (33,10 ± 0,99) %. Вміст протеїну в листі шпинату городнього сорту Красень Полісся та замороженому листі цієї рослини був дещо нижчим – (29,82 ± 0,89) та (26,11 ± 0,65) % відповідно.

У насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся (12,75 ± 0,38 %) та Фантазія (14,48 ± 0,58 %) протеїну накопичувалося у 2,3 рази менше, ніж у листі цих рослин. Найнижчий вміст досліджуваної групи БАР був в коренях шпинату городнього аналізованих сортів і не перевищував (3,00 ± 0,08) % [50].

3.4 Дослідження фенольних сполук

Фенольні сполуки – обширна та неоднорідна за хімічним складом група БАР

[154], які проявляють багатовекторну направленість терапевтичної дії, у тому числі антибактеріальну, протизапальну, капілярозміцнювальну, гіпотензивну, противиразкову, цитотоксичну, діуретичну тощо [156].

Відомо, що фенольні сполуки здатні інгібувати утворення та експресію запальних цитокінів, а також виступають донорами гідрогену та електронів і за рахунок цього сприяють стабілізації клітинних мембран при їх ушкодженні в процесі перекисного окиснення ліпідів [154].

За даними індійських науковців кофейна та ферулова кислоти знешкоджують в організмі вільні радикали нітроксидів та пероксидів, попереджають холестаз, стеатогенез та фібриногенез печінки [154]. Румунські дослідники стверджують, що хлорогенова кислота підвищує активність ферментів, регулює обмін жирних кислот та тригліцеридів печінки, індукує ендogenous антиоксидантну систему [110]. Дослідження антиоксидантної та протипухлинної активності показало, що розчини хлорогенової кислоти та кверцетину у дозі 10-25 мкг/мл нормалізують роботу печінки, знижують інфільтрацію пошкоджених гепатоцитів, підвищують загальний рівень білка та лужної фосфатази у сироватці крові щурів з алоксан-індукованим гепатитом [96, 106, 110]. Флавоноїд гіперозид, за даними літератури, підсилює експресію ендogenous антиоксидантних ферментів, сповільнює перебіг вільнорадикальних ланцюгових реакцій, спровокованих метаболізмом ксенобіотиків у печінці [154]. Китайські вчені у досліджах *in vivo* встановили, що апігенін інгібує активність печінкових біомаркерів АлАТ, АсАТ у сироватці крові, підвищує рівень СОД, зменшує вміст глутатіону, глутатіонпероксидази, каталази та малодіальдегіду, а також сповільнює запальні та некротичні процеси у тканинах печінки [105]. Хорватські вчені встановили, що терапія рутином у мишей з алкогольною формою гепатиту знижує активність трансаміназ у плазмі крові тварин, а також виявляє протизапальний, антиоксидантний та фібринолітичний потенціал [91]. Зважаючи на це, доцільно було дослідити якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук у сировині шпинату городнього.

Виявлення та визначення кількісного вмісту поліфенолів

Попередньо наявність поліфенольних сполук в досліджуваній сировині було

підтверджено за допомогою хімічних реакцій з 1 % розчином желатину, 1 % розчином хініну гідрохлориду, 30 % розчином феруму (III) амонію сульфату та 1 % розчином феруму (III) хлориду.

Виявлення фенольних сполук проводили методом ПХ та ТШХ у рухомих фазах № 3, 4, 6–9 за характерною флуоресценцією зон в УФ-світлі, яка посилювалась після обробки проявляючими реактивами Д, Е, Ж, а також у денному світлі за буро-зеленим та жовтим забарвленням зон після обробки реактивами К та Л відповідно. За результатами експерименту, на хроматограмах витяжок усіх аналізованих зразків листя шпинату городнього проявлялось не менше 11 сполук, із насіння – не менше 10 сполук, із коренів – не менше 7 сполук, які було віднесено до фенольних речовин.

Кількісний вміст суми поліфенольних сполук визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за уніфікованою методикою, яка наведена у підрозділі 2.3 [20]. Результати проведеного аналізу представлено у табл. 3.10.

Таблиця 3.10

**Вміст суми поліфенольних сполук в сировині шпинату городнього
(m = 5, P < 0,05)**

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на на пірогалол й абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		10,03 ± 0,03
Красень Полісся	Корені	2,54 ± 0,06
	Листя	10,90 ± 0,03
	Насіння	3,00 ± 0,01
Фантазія	Корені	2,78 ± 0,07
	Листя	11,30 ± 0,03
	Насіння	3,20 ± 0,01

Результати експерименту показали, що поліфенольних сполук в ідентичних видах сировини шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія накопичувалася майже однакова кількість. Найвищий їх вміст було відмічено у листі шпинату городнього сорту Фантазія – (11,30 ± 0,03) %.

У коренях та насінні досліджуваних рослин вміст поліфенолів накопичувався майже на одному рівні та був у 3,5-4,3 рази нижчий, ніж у листі. Вміст поліфенолів

у коренях шпинату городнього не перевищував ($2,78 \pm 0,07$) %. У насінні вміст цих сполук коливався від ($3,00 \pm 0,01$) до ($3,20 \pm 0,01$) % [6].

Ідентифікація та визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот

Гідроксикоричні кислоти ідентифікували методом ПХ у рухомих фазах № 7, 8 та методом ТШХ у рухомих фазах № 3, 6, 9 у порівнянні з ФСЗДФУ гідроксикоричних кислот. На хроматограмах гідроксикоричні кислоти ідентифікували за блакитною флуоресценцією зон в УФ-світлі, яка ставала інтенсивнішою при обробці хромогенними реактивами Д, Е, Ж або змінювала свій колір на фіолетовий. При обробці хроматограм реактивом К у денному світлі зони набували темно-зеленого кольору. В усіх досліджуваних зразках сировини були ідентифіковані хлорогенова та кофейна кислоти, які за кольором флуоресценції в УФ-світлі та розташуванням на хроматограмах відповідали зонам ФСЗДФУ.

Вміст суми гідроксикоричних кислот у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методикою, яка викладена в підрозділі 2.3 [19]. Результати визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот наведено у табл. 3.11.

Таблиця 3.11

Вміст суми гідроксикоричних кислот у сировині шпинату городнього ($m = 5$, $P < 0,05$)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на хлорогенову кислоту й абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		$1,17 \pm 0,04$
Красень Полісся	Корені	$0,60 \pm 0,02$
	Листя	$2,60 \pm 0,08$
	Насіння	$0,18 \pm 0,01$
Фантазія	Корені	$0,75 \pm 0,02$
	Листя	$2,27 \pm 0,07$
	Насіння	$0,24 \pm 0,01$

Результати дослідження показали, що вміст гідроксикоричних кислот в одноіменній сировині шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія був майже на одному рівні.

Однаково високий вміст гідроксикоричних кислот був у листі шпинату

городнього сортів Красень Полісся та Фантазія і становив $(2,60 \pm 0,08)$ та $(2,27 \pm 0,07)$ % відповідно. У замороженому листі шпинату городнього цих БАР містилося майже вдвічі менше – $(1,17 \pm 0,04)$ %.

У коренях шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія гідроксикоричних кислот накопичувалося майже у 4 та 3 рази менше, ніж у листі цих рослин. Вміст гідроксикоричних кислот у коренях шпинату городнього коливався в межах від $(0,60 \pm 0,02)$ до $(0,75 \pm 0,02)$ %.

Мінімальна кількість досліджуваної групи БАР акумулювалась у насінні шпинату городнього і не перевищувала $(0,24 \pm 0,01)$ % [8, 48].

Ідентифікація та визначення вмісту флавоноїдів

Попередньо наявність флавоноїдів у досліджуваній сировині було підтверджено за позитивними результатами хімічних реакцій з розчином феруму (III) хлориду, 10 % розчином натрію гідроксиду, 2 % розчином алюмінію хлориду та ціанідинової реакції в модифікації по Бріанту.

Якісний склад флавоноїдів вивчали методами ПХ та ТШХ у рухомих фазах № 3, 4, 7 та 9 у порівнянні з ФСЗДФУ флавоноїдів. На хроматограмах досліджувані БАР проявлялись у вигляді зон, які мали жовту, жовто-зелену та жовто-коричневу флуоресценцію в УФ-світлі. При обробці хроматограм хромогенними реактивами Д, Е, Ж інтенсивність флуоресценції посилювалась. При обробці хроматограм реактивами К та Л зони набували темно-зеленого та жовтого забарвлення відповідно у денному світлі. Ідентифікацію флавоноїдів проводили за відповідністю кольору флуоресценції та розташування на хроматограмах зон досліджуваних витяжок та ФСЗДФУ флавоноїдів.

За результатами експерименту в усіх досліджуваних зразках було ідентифіковано лютеолін. Крім того, на хроматограмах витяжок усіх взятих для аналізу зразків листя та насіння шпинату городнього проявлялись зони, які відповідали зонам рутину та апігеніну ФСЗДФУ.

Кількісний вміст суми флавоноїдів у сировині шпинату городнього визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методикою, яка викладена у підрозділі 2.3 [21]. Результати проведеного аналізу наведено в табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Вміст суми флавоноїдів у сировині шпинату городнього (m = 5, P < 0,05)

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на рутин й абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		$2,89 \pm 0,11$
Красень Полісся	Корені	$0,18 \pm 0,01$
	Листя	$4,02 \pm 0,13$
	Насіння	$0,17 \pm 0,01$
Фантазія	Корені	$0,19 \pm 0,01$
	Листя	$3,77 \pm 0,11$
	Насіння	$0,19 \pm 0,01$

Результати експерименту показали, що за вмістом флавоноїдів аналогічні види сировини шпинату городнього досліджуваних сортів відрізнялися незначно.

Максимальний вміст флавоноїдів було зафіксовано у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(4,02 \pm 0,13) \%$. Вміст цих БАР у листі шпинату городнього сорту Фантазія був дещо нижчим – $(3,77 \pm 0,11) \%$. У замороженому листі містилося майже в 1,4 та 1,3 рази менше флавоноїдів, ніж у висушеному листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія відповідно.

У коренях та насінні досліджуваних рослин накопичувалася майже однакова кількість флавоноїдів, яка була в межах від $(0,17 \pm 0,01)$ до $(0,19 \pm 0,01) \%$ [10, 48].

Дослідження якісного складу та визначення кількісного вмісту індивідуальних компонентів фенольної природи

Ідентифікацією та визначення кількісного вмісту індивідуальних фенольних компонентів проводили методом ВЕРХ за методикою, яка викладена у підрозділі 2.3.

Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у коренях шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія методом ВЕРХ, наведено на рис. 3.9-3.10 відповідно; у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія і замороженому листі цієї рослини – на рис. 3.11 -3.13; у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія – на рис. 3.14 та 3.15 відповідно.

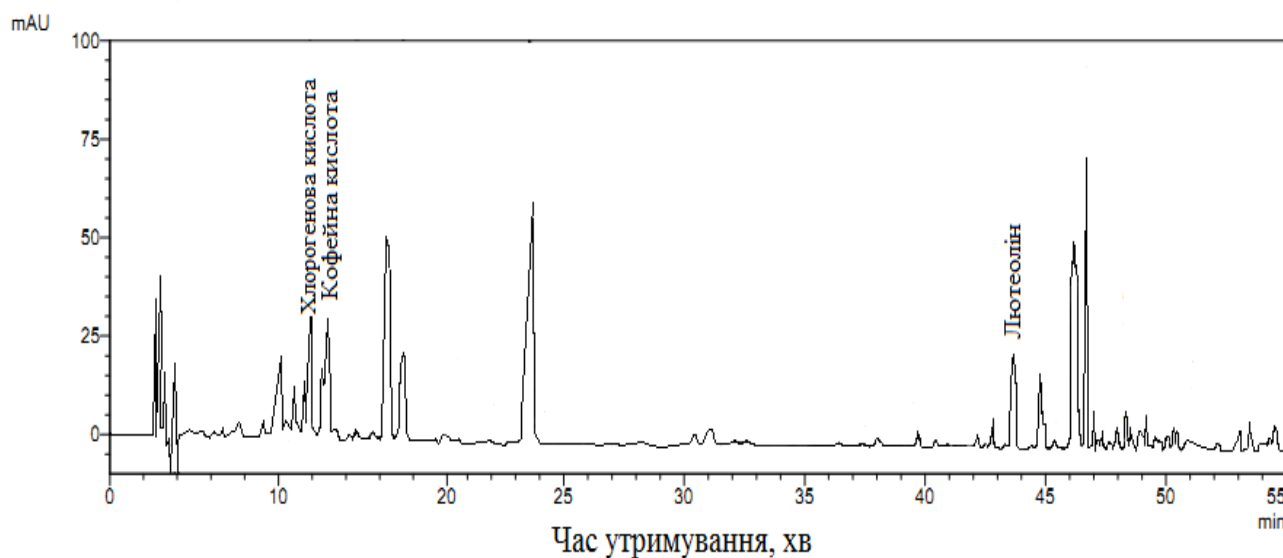


Рис. 3.9 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся методом ВЕРХ

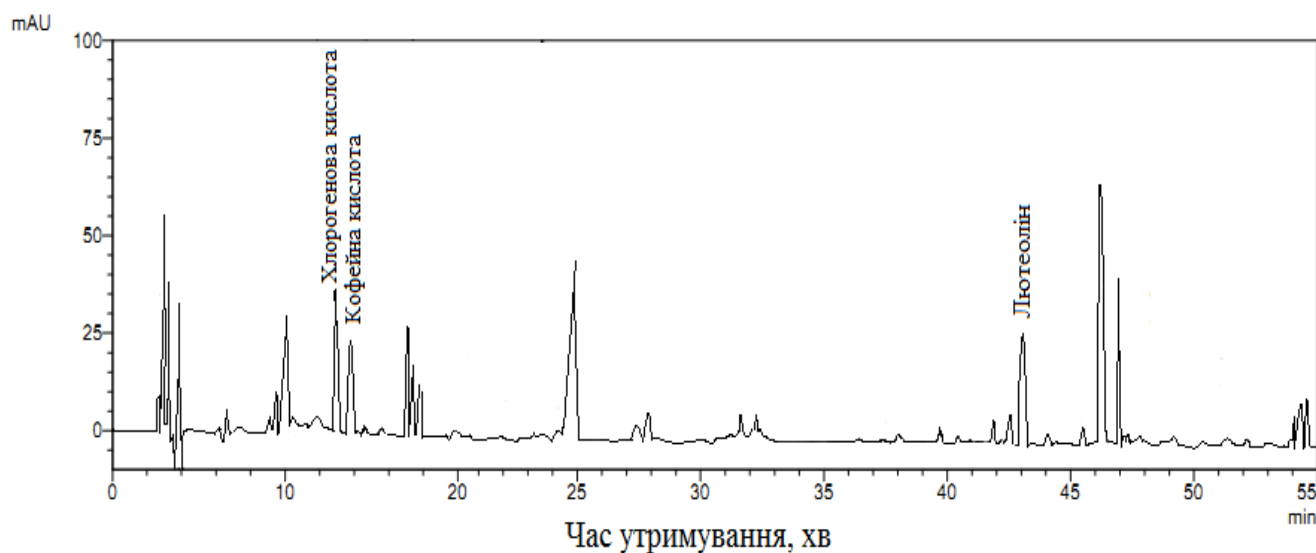


Рис. 3.10 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у коренях шпинату городнього сорту Фантазія методом ВЕРХ

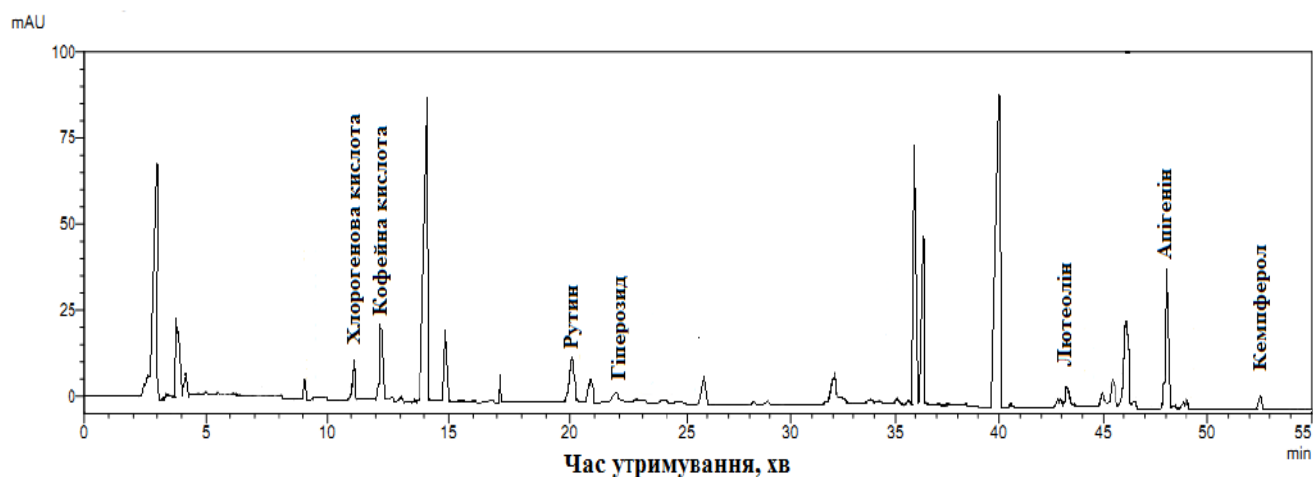


Рис. 3.11 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся методом ВЕРХ

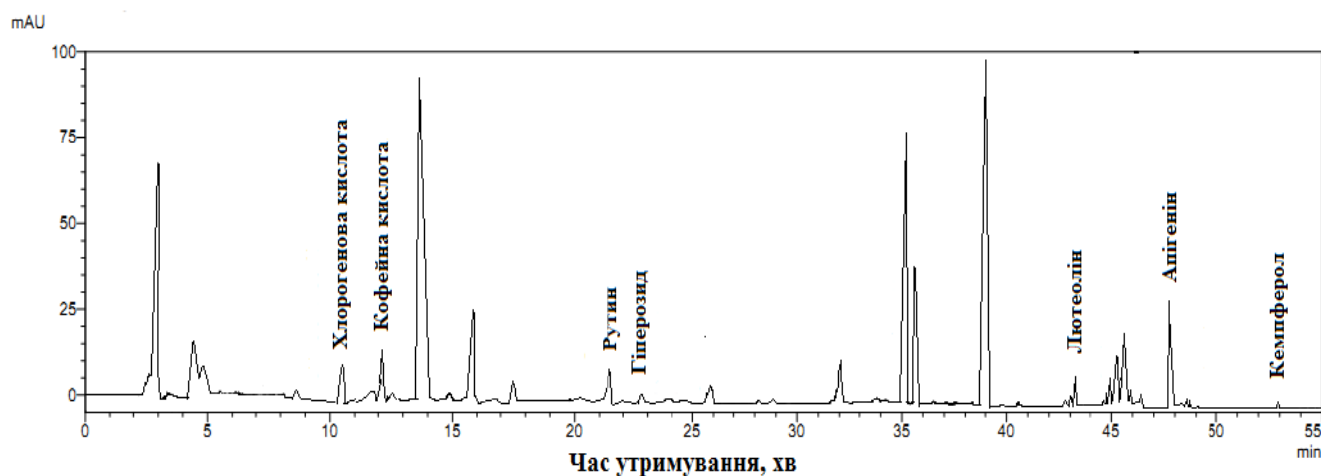


Рис. 3.12 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у листі шпинату городнього сорту Фантазія методом ВЕРХ

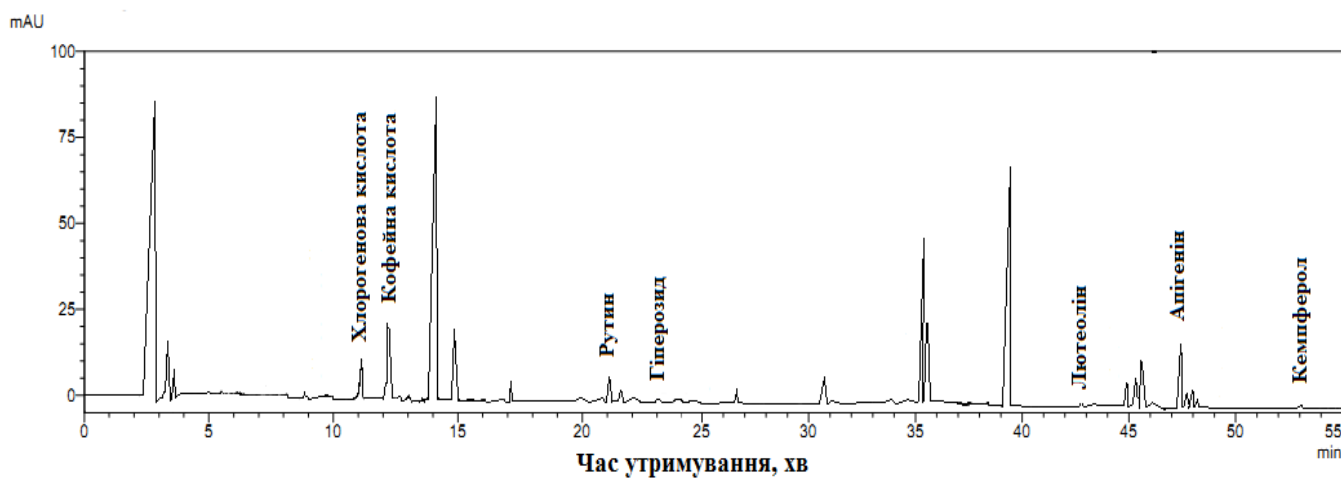


Рис. 3.13 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у замороженому листі шпинату городнього методом ВЕРХ

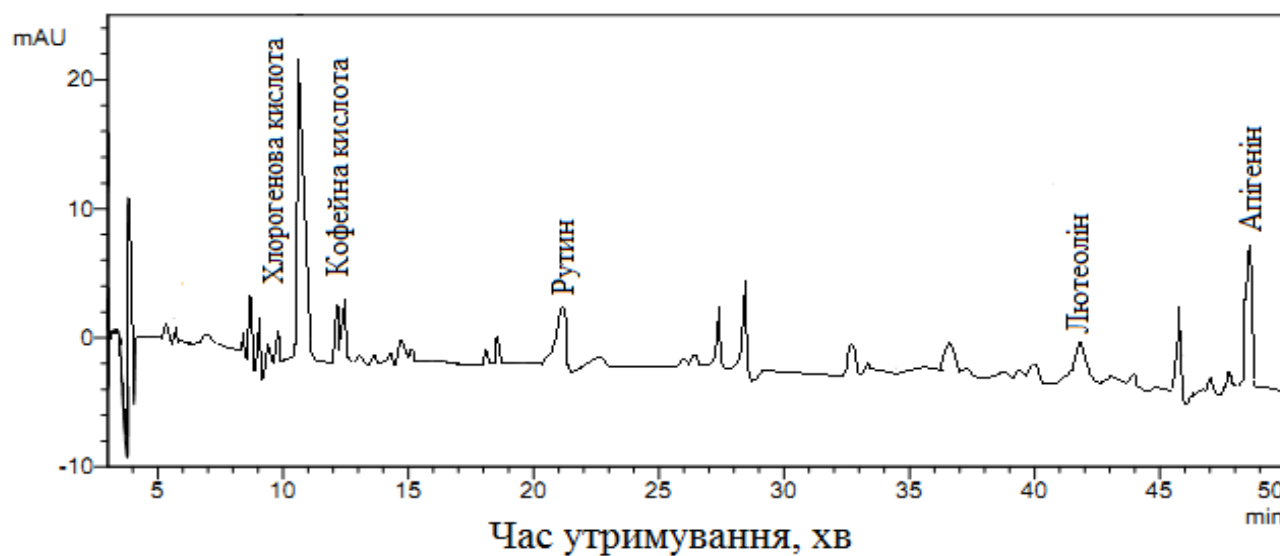


Рис. 3.14 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся методом ВЕРХ

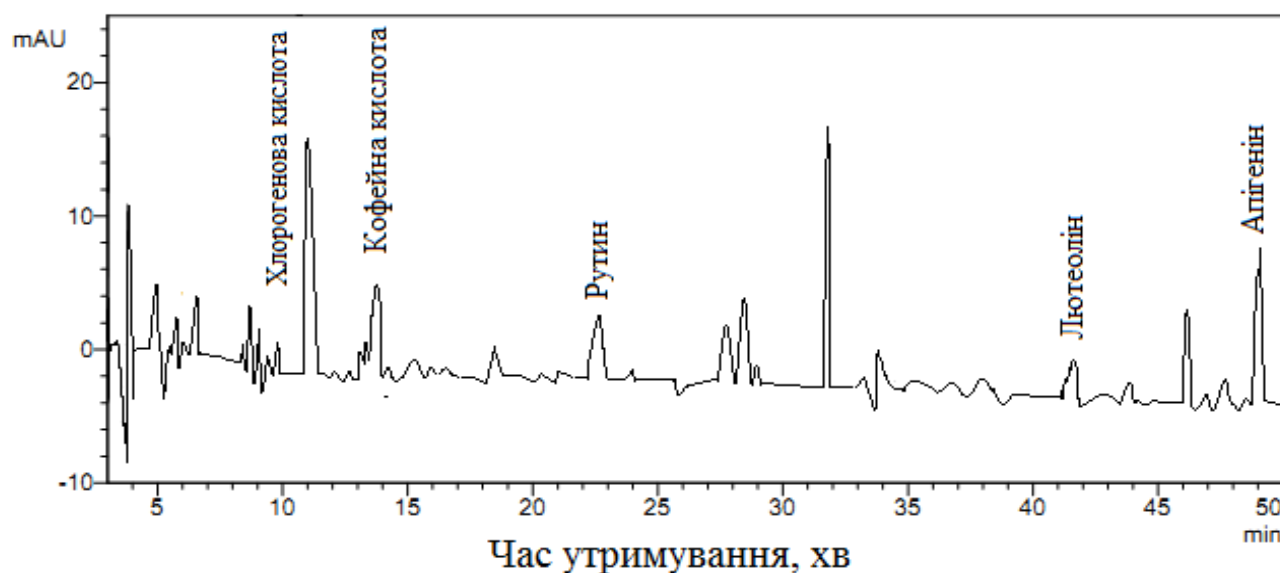


Рис. 3.15 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у насінні шпинату городнього сорту Фантазія методом ВЕРХ

За результатами експерименту у коренях шпинату городнього обох досліджуваних сортів було ідентифіковано по 3 фенольні сполуки. У листі шпинату городнього обох сортів та замороженому листі цієї рослини ідентифіковано по 7 сполук фенольної природи. У насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія – по 5 фенольних речовин. Серед ідентифікованих сполук в усіх зразках сировини було виявлено по 2 гідроксикоричні кислоти. В усіх досліджуваних об'єктах було ідентифіковано хлорогенову та кофейну гідроксикоричні кислоти, а також флавоноїд лютеолін. В усіх зразках листя та насіння шпинату городнього, взятих для аналізу було ідентифіковано рутин та апігенін. Крім того, у листі шпинату городнього обох сортів та замороженому листі цієї рослини містилися гіперозид та кемпферол.

Результати вивчення якісного складу та визначення кількісного вмісту фенольних сполук у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія методом ВЕРХ наведено у табл. 3.13.

За результатами експерименту встановлено, що за якісним складом та кількісним вмістом фенольних сполук ідентичні види сировини шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія відрізнялись незначно.

Максимальний вміст суми ідентифікованих фенольних сполук був у листі шпинату городнього сорту Фантазія ($1650,03 \pm 41,25$ мг/кг). У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся цих сполук містилося дещо менше – ($1599,77 \pm 39,99$) мг/кг. У замороженому листі шпинату городнього ($966,73 \pm 73$ мг/кг) цих БАР містилося в 1,7 рази менше, ніж у листі шпинату городнього сорту Фантазія. У коренях досліджуваної рослини фенольних сполук накопичувалося майже в 5 разів менше, у насінні – у 3,5 – 4 рази менше, ніж у листі.

Максимальна сумарна кількість гідроксикоричних кислот ($560,93 \pm 14,02$ мг/кг) та флавоноїдів ($1089,10 \pm 27,23$ мг/кг) накопичувалась у листі шпинату городнього сорту Фантазія. У листі шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі цієї рослини вміст гідроксикоричних кислот був майже на одному рівні та складав близько половини від загального вмісту фенольних сполук у цих зразках сировини.

Таблиця 3.13

Якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук сировини шпинату городнього (n = 5, P < 0,05)

Сполука	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, мг/кг					
	листя					
	заморожене		Красень Полісся		Фантазія	
	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг
1	2	3	4	5	6	7
Хлорогенова кислота	10,94	180,87 ± 4,52	11,28	183,62 ± 4,59	10,59	220,08 ± 5,50
Кофейна кислота	12,35	344,99 ± 8,62	12,63	351,50 ± 8,79	13,62	340,85 ± 8,52
Загалом гідроксикоричних кислот	—	525,86 ± 13,15	—	535,12 ± 13,38	—	560,93 ± 14,02
Рутин	21,01	132,61 ± 3,32	20,74	313,92 ± 7,85	21,27	323,43 ± 8,09
Гіперозид	23,11	5,42 ± 0,14	22,97	46,53 ± 1,16	22,84	53,20 ± 1,33
Лютеолін	42,92	4,59 ± 0,11	43,41	75,24 ± 1,88	43,20	69,46 ± 1,74
Апігенін	42,33	296,60 ± 7,42	43,09	596,61 ± 14,92	42,79	617,92 ± 15,45
Кемпферол	53,05	1,65 ± 0,04	52,72	32,35 ± 0,81	51,75	25,09 ± 0,63
Загалом флавоноїдів	—	440,87 ± 11,02	—	1064,65 ± 26,62	—	1089,10 ± 27,23
Загалом	—	966,73 ± 24,17	—	1599,77 ± 39,99	—	1650,03 ± 41,25

Сполука	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, мг/кг							
	корені				насіння			
	Красень Полісся		Фантазія		Красень Полісся		Фантазія	
	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг
1	8	9	10	11	12	13	14	15
Хлорогенова кислота	10,90	88,80 ± 2,22	11,27	70,50 ± 1,76	10,42	233,77 ± 5,84	11,12	191,79 ± 4,79
Кофейна кислота	11,69	137,33 ± 3,43	11,83	146,78 ± 3,67	12,63	23,66 ± 0,59	13,59	41,17 ± 1,03
Загалом гідроксикоричних кислот	—	226,13 ± 5,65	—	217,28 ± 5,43	—	257,43 ± 6,44	—	232,96 ± 5,824
Рутин	—	—	—	—	20,77	75,95 ± 1,90	22,30	72,84 ± 1,95
Гіперозид	—	—	—	—	—	—	—	—
Лютеолін	43,72	90,19 ± 2,25	43,31	80,51 ± 2,01	42,84	45,91 ± 1,15	41,92	21,48 ± 0,53
Апігенін	—	—	—	—	49,90	86,42 ± 2,16	50,05	77,85 ± 1,82
Кемпферол	—	—	—	—	—	—	—	—
Загалом флавоноїдів	—	90,19 ± 2,25	—	80,51 ± 2,01	—	208,28 ± 5,21	—	172,17 ± 4,30
Загалом	—	317,32 ± 7,93	—	297,79 ± 7,44	—	465,71 ± 11,64	—	405,13 ± 10,12

У коренях та насінні шпинату городнього обох сортів вміст гідроксикоричних кислот був майже однаковий і знаходився в межах від $(217,28 \pm 5,43)$ до $(257,43 \pm 6,44)$ мг/кг.

У замороженому листі шпинату городнього вміст флавоноїдів був у 2,5 рази нижчий, ніж у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(440,87 \pm 11,02)$ мг/кг. На вміст флавоноїдів у коренях шпинату городнього обох сортів припадало близько третини від сумарного вмісту фенольних сполук у цих об'єктах. У коренях шпинату городнього акумулювалось від $(80,51 \pm 2,01)$ до $(90,19 \pm 2,25)$ мг/кг флавоноїдів. У насінні шпинату городнього флавоноїдів містилося майже вдвічі більше, ніж у коренях рослини. При цьому сумарний вміст флавоноїдів у насінні шпинату городнього не перевищував $(208,28 \pm 5,21)$ мг/кг.

Домінуючою гідроксикоричною кислотою в усіх досліджуваних об'єктах була кофейна кислота, окрім насіння шпинату городнього сорту Фантазія, де більше накопичувалося хлорогенової кислоти $(191,73 \pm 4,79)$ мг/кг. При цьому, максимальний вміст хлорогенової та кофейної кислот було відмічено у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(233,77 \pm 5,84)$ та $(623,66 \pm 0,59)$ мг/кг.

Серед флавоноїдів в усіх досліджуваних зразках листя та насіння шпинату городнього превалював апігенін. На максимальному рівні ця сполука містилася у листі шпинату городнього сорту Фантазія – $(617,92 \pm 15,45)$ мг/кг. Вміст апігеніну в листі шпинату городнього був майже на тому ж рівні $(596,61 \pm 14,92)$ мг/кг. У замороженому листі цієї рослини його містилося майже вдвічі менше – $(296,60 \pm 7,42)$ мг/кг. Вміст апігеніну в насінні досліджуваної рослини залежно від сорту був у 7 – 8 разів нижчим, ніж у листі.

Рутину у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія накопичувалося майже однакова кількість, яка становила $(313,92 \pm 7,85)$ та $(323,43 \pm 8,09)$ мг/кг відповідно, що було майже вдвічі менше у порівнянні із вмістом апігеніну в цій сировині. У замороженому листі шпинату городнього рутину містилося у майже 2,5 рази менше, ніж у листі шпинату городнього сорту Фантазія із максимальним зафіксованим вмістом цієї сполуки. Вміст рутину в насінні шпинату городнього був майже у 4 рази нижчий, ніж у листі цих рослин і

коливався в межах від $(72,84 \pm 1,95)$ до $(75,95 \pm 1,90)$ мг/кг.

Лютеолін у максимальній кількості містився у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(90,19 \pm 2,25)$ мг/кг, що становило майже третину від вмісту фенольних сполук у цій сировині. Максимальний вміст гіперозиду зафіксовано у листі шпинату городнього сорту Фантазія $(53,20 \pm 1,33)$ мг/кг), кемпферолу – у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся $(32,35 \pm 0,81)$ мг/кг).

3.5 Дослідження ізопренових сполук

Терпенові сполуки складають одну з найбільших груп природних сполук, що характеризується надзвичайно широким розповсюдженням, великим різноманіттям хімічної будови і широким спектром фармакологічної дії [82, 127, 164, 171].

У ході досліджень *in vivo* та *in vitro* встановили, що ізопреноїди мають антимікробну, протизапальну, гіпотензивну, знеболювальну, протипухлинну та мембраностабілізуючу активність тощо [82, 127, 164, 171]. Встановлено, що терпеноїди нормалізують рівень печінкових біомаркерів в сироватці крові щурів з ураженою тетрахлорметаном печінкою, проявляють мембраностабілізуючу та цитотоксичну дію на гепатокарциному [104, 164].

Незалежні наукові дослідження *in vivo* та *in vitro*, проведені вченими з Китаю та Єгипту, показали, що хлорофільні комплекси пригнічують процеси перекисного окиснення ліпідів, знижують гепатотоксичні прояви тетрахлорметану та афлотоксину шляхом послаблення активності АЛАТ, АсАТ, зменшення утворення малодіальдегіду, відновлення активності СОД, каталази та глутатіонпероксидази [84, 107]. Терапія β -каротином у дозі 10 мг/кг нейтралізує шкідливий вплив ацетамінофену на печінку щурів, інгібує виділення у кров тварин біомаркерів ураження печінки: глутамат-оксалат трансамінази, глутумат-піруват трансамінази, лужної фосфатази та малодіальдегіду [76]. Разом з тим, ця сполука посилює активність антиоксидантних ферментів: СОД, відновленого глутатіону та каталази [76, 177].

Стероїдні сполуки в природі утворюються з ізопренових попередників [168]. Ці сполуки мають полівекторну активність, зокрема, протизапальну, антибактеріальну,

імуномодуючу, гіпохолестеринемічну, гіпоглікемічну, протипухлинну, нейро-, кардіо- та простатопротекторну тощо [35, 64, 161, 166, 168]. За інформацією індійських науковців, фітостероїд стигмастирол зменшував прояви перекисного окислення ліпідів печінки за рахунок підвищення активності каталази, СОД та глутатіону [161]. Наукові дослідження нігерійських вчених показали, що 24-епібрасиноїд та брасиностероїд модулювали активність ензимів СОД, каталази та глутатіонпероксидази, які беруть участь в знешкодженні вільних радикалів [64]. Результати досліджень єгипетських науковців показали, що ліпопротеїнові комплекси β -ситостеролу в дозі 400 мг/кг активували печінкові ферменти АЛАТ, АсАТ, зменшували експресію розщепленої каспази-3, нормалізували концентрацію маркерів перекисного окислення ліпідів (каталази, малодіальдегіду, загального білірубіну та альбуміну) у сироватці крові щурів з тетрахлорметановою формою гепатиту [78].

Турецькі дослідники стверджують, що токоферол та мелатонін посилюють антиоксидантну систему захисту, пригнічуючи окиснення білків та посилюючи активність антиоксидантних ферментів СОД, каталази, глутатіонпероксидази та протеїну карбонілу [163]. Вчені з Єгипту та Саудівської Аравії у експерименті на уражених малатіоном тваринах встановили, що терапія α -токоферолом протягом 45 днів знижувала прояви оксидативного стресу, викликала дозозалежне підвищення активності ацетилхолінестерази, відновленого глутатіону, глутатіонпероксидази, СОД та каталази, а також знижували дегенеративні та некротичні ураження гепатоцитів [112, 147]. Таким чином викладена інформація спонукала до проведення досліджень ізопренових сполук сировини шпинату городнього.

Виявлення та визначення кількісного вмісту хлорофілів та каротиноїдів

Хлорофіли та каротиноїди виявляли методами ПХ та ТШХ у рухомих фазах № 10-13. На хроматограмах хлорофіли ідентифікували за зеленим забарвленням зон у денному світлі та червоною флуоресценцією в УФ-світлі. Каротиноїди на хроматограмах у денному світлі проявлялись у вигляді жовтих зон, які після обробки реактивом М забарвлювались у рожевий колір.

За результатами якісного аналізу на хроматограмах витяжок з коренів та насіння шпинату городнього обох досліджуваних сортів проявлялось не менше 6

та 7 зон відповідно, які у видимому світлі мали жовтий колір до обробки проявляючим реактивом та набували рожевого забарвлення після обробки реактивом М. Ці речовини було віднесено до каротиноїдів. На хроматограмах витяжок із листя шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія проявлялось не менше 9 зон, на хроматограмах витяжок із замороженого листя цієї рослини – не менше 7 зон, із яких по 3 за зеленим забарвленням у денному світлі та червоною флуоресценцією було віднесено до хлорофілів.

Хроматограму, одержану при дослідженні якісного складу хлорофілів та каротиноїдів у коренях, листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженому листі цієї рослини методом ТШХ, наведено на рис. 3.16.

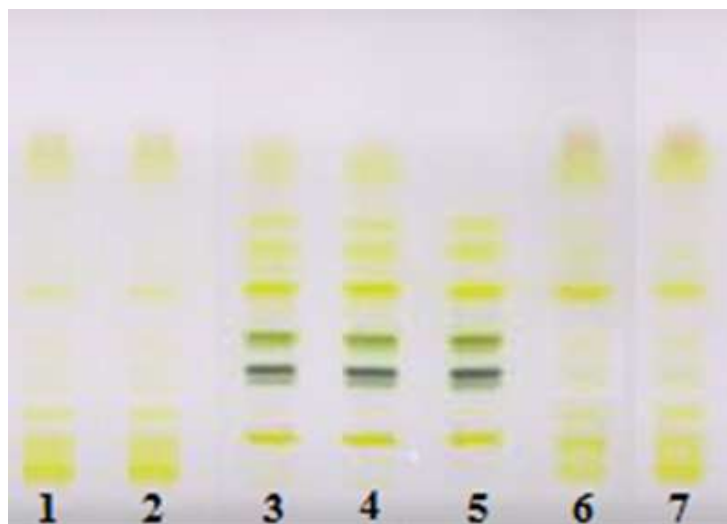


Рис. 3.16 Хроматограма, одержана при дослідженні якісного складу хлорофілів та каротиноїдів у сировині шпинату городнього методом ТШХ у рухомій фазі гексан – ацетон (8 : 2) при перегляді у денному світлі: 1 – витяжка з коренів шпинату городнього сорту Красень Полісся; 2 – витяжка з коренів шпинату городнього сорту Фантазія; 3 – витяжка з листя шпинату городнього сорту Красень Полісся; 4 – витяжка з листя шпинату городнього сорту Фантазія; 5 – витяжка із замороженого листя шпинату городнього; 6 – витяжка з насіння шпинату городнього сорту Красень Полісся; 7 – витяжка з насіння шпинату городнього сорту Фантазія

Кількісний вміст хлорофілів та каротиноїдів у сировині шпинату городнього визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методикою, яка викладена

у підрозділі 2.3. Результати експерименту наведено у табл. 3.14.

Таблиця 3.14

**Вміст хлорофілів та каротиноїдів у сировині шпинату городнього (m=5,
P < 0,05)**

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, мг/100 г		
		хлорофіл а	хлорофіл b	каротиноїди
Заморожене листя		104,00 ± 2,60	46,00 ± 1,15	39,00 ± 0,98
Красень Полісся	Корені	Сліди	Сліди	Сліди
	Листя	344,79 ± 9,61	578,36 ± 17,35	122,58 ± 3,06
	Насіння	Сліди	Сліди	12,44 ± 0,31
Фантазія	Корені	Сліди	Сліди	Сліди
	Листя	366,41 ± 9,16	670,89 ± 26,77	250,86 ± 6,27
	Насіння	Сліди	Сліди	16,31 ± 0,40

За результатами аналізу в коренях обох сортів рослини хлорофіли та каротиноїди містилися у слідових кількостях. У їх насінні виявлено сліди хлорофілів.

У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся та Фантазія накопичувалася майже однакова кількість хлорофілів, у замороженому листі цих сполук було у 6 – 7 разів менше. Вміст каротиноїдів у листі шпинату городнього сорту Фантазія та замороженому листі каротиноїдів містилося майже у 4 рази менше, ніж хлорофілів. У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся співвідношення хлорофілів та каротиноїдів складало 7 : 1. У листі шпинату городнього сортів Красень Полісся (578,36 ± 17,35 мг/100 г) та Фантазія (670,89 ± 26,77 мг/100 г) кількісно переважав хлорофіл b, на вміст якого припадало 63-65 % залежно від сорту. Вміст хлорофілу а у листі досліджуваних сортів майже не відрізнявся. У замороженому листі шпинату городнього вміст хлорофілу а (104,00 ± 2,60 мг/100 г) був майже у 3,5 рази нижчий, ніж у листі сорту Фантазія із максимальним його вмістом. Хлорофілу b у цьому об'єкті містилося у 2,3 рази менше – (46,00 ± 1,15) мг/100 г. Максимальний вміст каротиноїдів відмічено у листі шпинату городнього сорту Фантазія – (250,86 ± 6,27) мг/100 г. У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся цих речовин було майже вдвічі менше, у замороженому листі – у 6 разів менше. Вміст каротиноїдів у насінні шпинату городнього був майже на одному рівні й не перевищував (16,31 ± 0,40) мг/100 г.

Спектри поглинання 96 % етанольних витяжок з листя шпинату городнього в УФ та видимій ділянці світла в діапазоні 360-700 нм наведено на рис. 3.17 [9, 11].

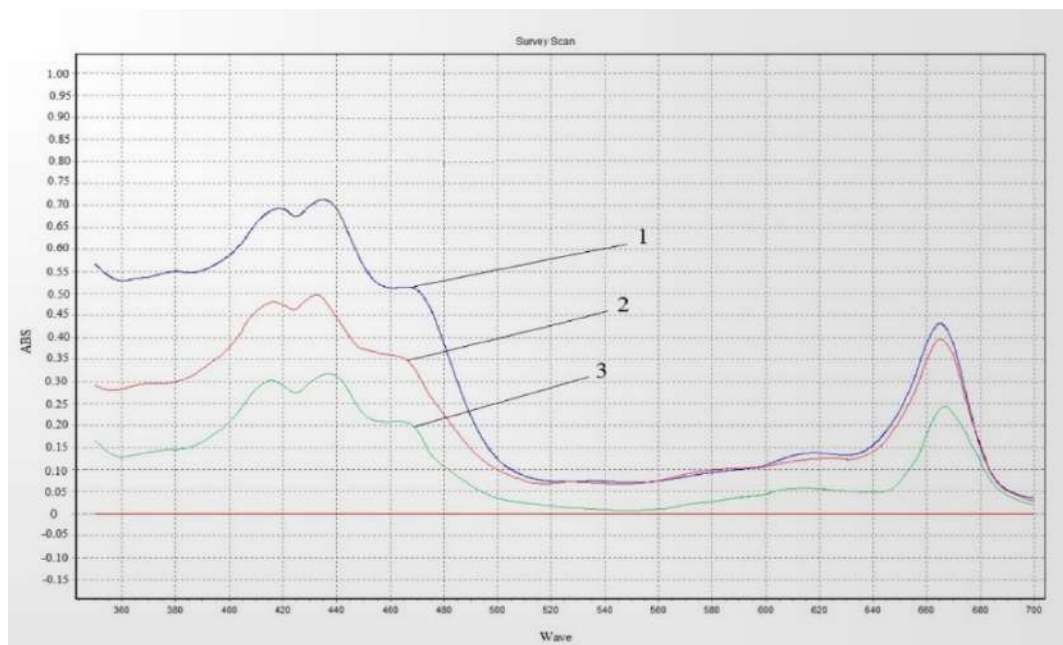


Рис. 3.17 Спектри поглинання в УФ та видимій ділянці світла 96 % етанольних витяжок з листя шпинату городнього сортів Фантазія (1), Красень Полісся (2) та замороженого (3) листя цієї рослини у діапазоні 360-700 нм

Виявлення стероїдних сполук та визначення їх кількісного вмісту

Наявність тритерпенових та стероїдних сполук у сировині шпинату городнього було попередньо підтверджено за допомогою хімічних реакцій Лафона, Сальковського та Саньє.

Сполуки стероїдної природи у сировині шпинату городнього виявляли методом ТШХ за рожевим забарвленням зон у денному світлі після хроматографування у рухомій фазі № 14 та обробки хромогенним реактивом М.

За результатами якісного аналізу на хроматограмах витяжок із коренів і замороженого листя шпинату городнього проявлялось не менше 3, у листі шпинату городнього сортів красень Полісся та Фантазія – не менше 5, у насінні цих рослин – не менше 6 речовин, які було віднесено до фітостероїдів.

Кількісний вміст суми стероїдних сполук у досліджуваних об'єктах визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методикою, яка наведена у підрозділі 2.3. Спектри поглинання 96 % етанольних витяжок із сировини шпинату городнього з 1%

розчином *n*-диметиламінобензальдегіду в 4 н етанольному розчині хлористоводневої кислоти у видимій ділянці світла в діапазоні 450-600 нм наведено на рис. 3.18.

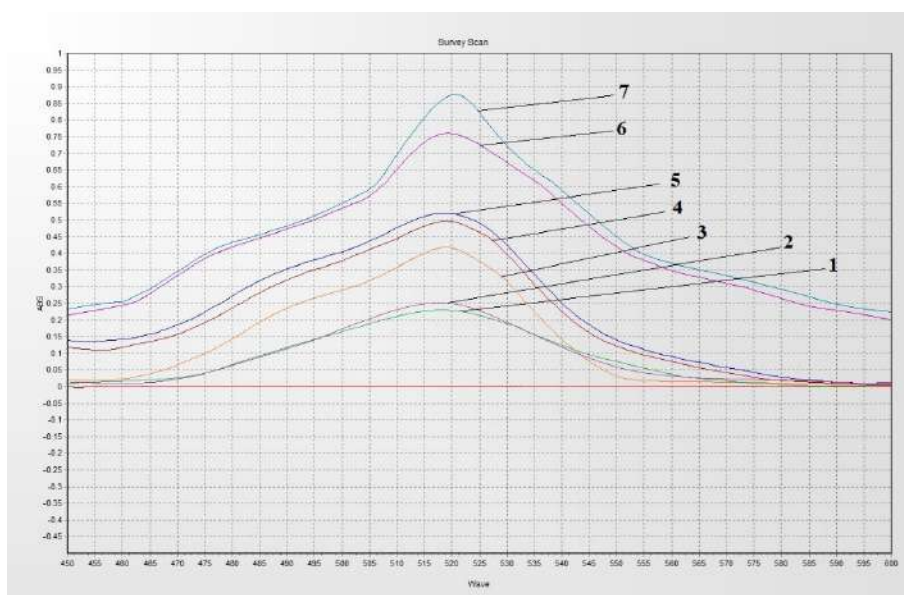


Рис. 3.18 Спектри поглинання у видимій ділянці світла 96 % етанольних витяжок з 1% розчином *n*-диметиламінобензальдегіду в 4 н етанольному розчині хлористоводневої кислоти у діапазоні 450-600 нм: 1 – корені шпинату городнього сорту Красень Полісся; 2 – корені шпинату городнього сорту Фантазія; 3 – заморожене листя шпинату городнього; 4 – листя шпинату городнього сорту Красень Полісся; 5 – листя шпинату городнього сорту Фантазія; 6 – насіння шпинату городнього сорту Красень Полісся; 7 – насіння шпинату городнього сорту Фантазія

Результати дослідження наведено у табл. 3.15.

Таблиця 3.15

**Вміст суми стероїдних сполук у сировині шпинату городнього
($m = 5$, $P < 0,05$)**

Сорт	Сировина	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, %
Заморожене листя		$0,33 \pm 0,01$
Красень Полісся	Корені	$0,11 \pm 0,01$
	Листя	$0,64 \pm 0,02$
	Насіння	$0,82 \pm 0,02$
Фантазія	Корені	$0,15 \pm 0,01$
	Листя	$0,70 \pm 0,02$
	Насіння	$0,96 \pm 0,02$

У ході експерименту встановлено, що в аналогічних видах сировини шпинату городнього досліджуваних сортів вміст суми стероїдних сполук був майже на одному рівні. Максимальне його значення було зафіксовано у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся ($0,82 \pm 0,02$ %) та Фантазія ($0,96 \pm 0,02$ %). У листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія вміст фітостероїдів коливався від ($0,64 \pm 0,02$) до ($0,70 \pm 0,02$) %. При цьому, у замороженому листі цієї рослини суми стероїдних сполук містилося майже вдвічі менше – ($0,33 \pm 0,01$) %. У коренях шпинату городнього вміст цих БАР не перевищував ($0,15 \pm 0,01$) %.

Виявлення та визначення кількісного вмісту токоферолів

Виявлення токоферолу проводили методом ТШХ у рухомих фазах № 15, 16. За результатами аналізу в коренях шпинату городнього токоферолу не виявлено. На хроматограмах витяжок з листя та насіння цієї рослини токоферол було ідентифіковано за червоним забарвленням зон у денному світлі після обробки реактивом К.

Ідентифікацію та визначення кількісного вмісту токоферолів у сировині шпинату городнього проводили методом ВЕРХ за методикою, наведеною у підрозділі 2.3.

Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту токоферолів у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся, Фантазія та замороженому листі цієї рослини методом ВЕРХ, наведено на рис. 3.19-3.21.

Хроматограми, одержані при визначенні кількісного вмісту токоферолів у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія методом ВЕРХ наведено на рис. 3.22-3.23.

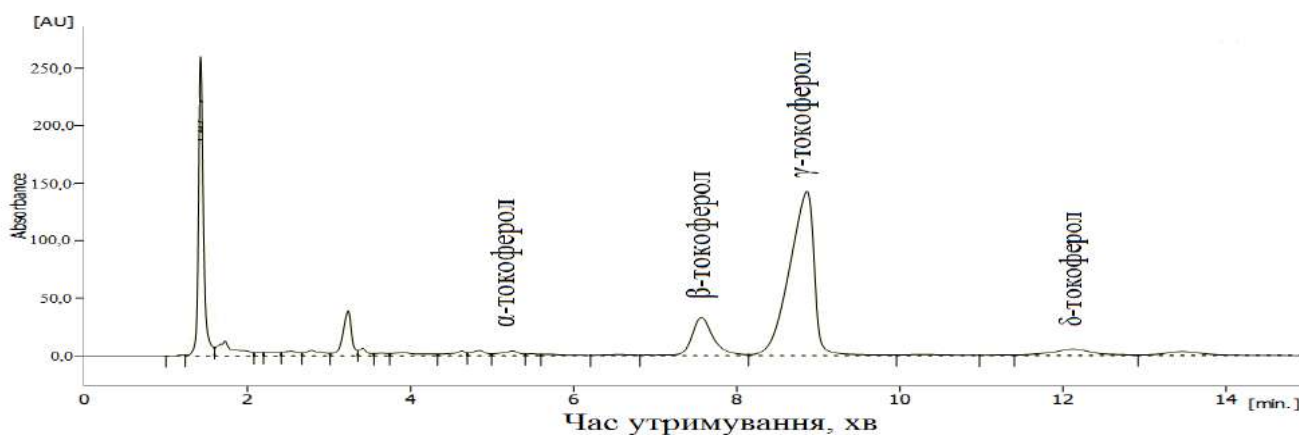


Рис. 3.19 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту токоферолів у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся методом ВЕРХ

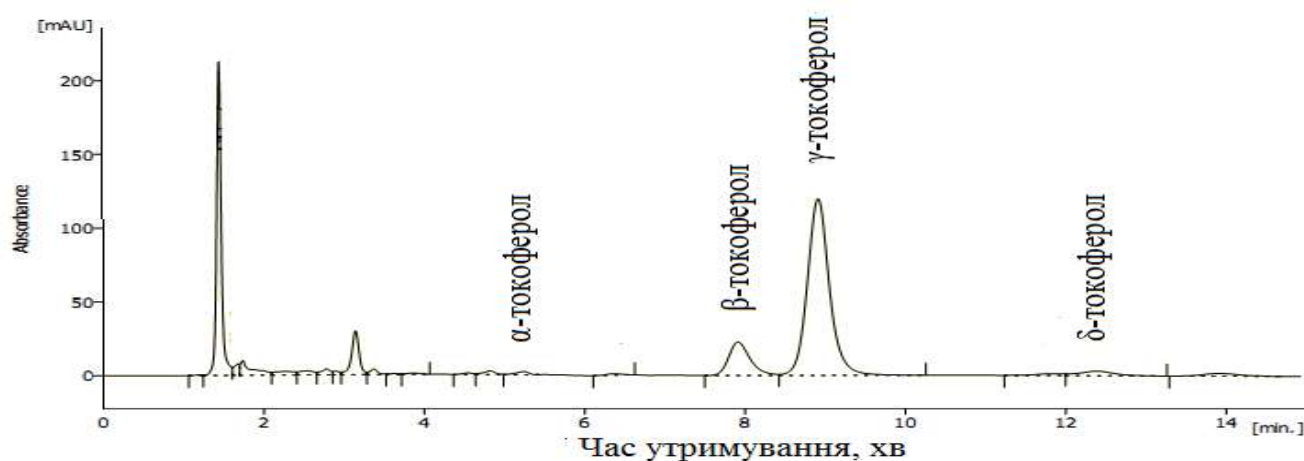


Рис. 3.20 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту токоферолів у листі шпинату городнього сорту Фантазія методом ВЕРХ



Рис. 3.21 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту токоферолів у замороженому листі шпинату городнього методом ВЕРХ

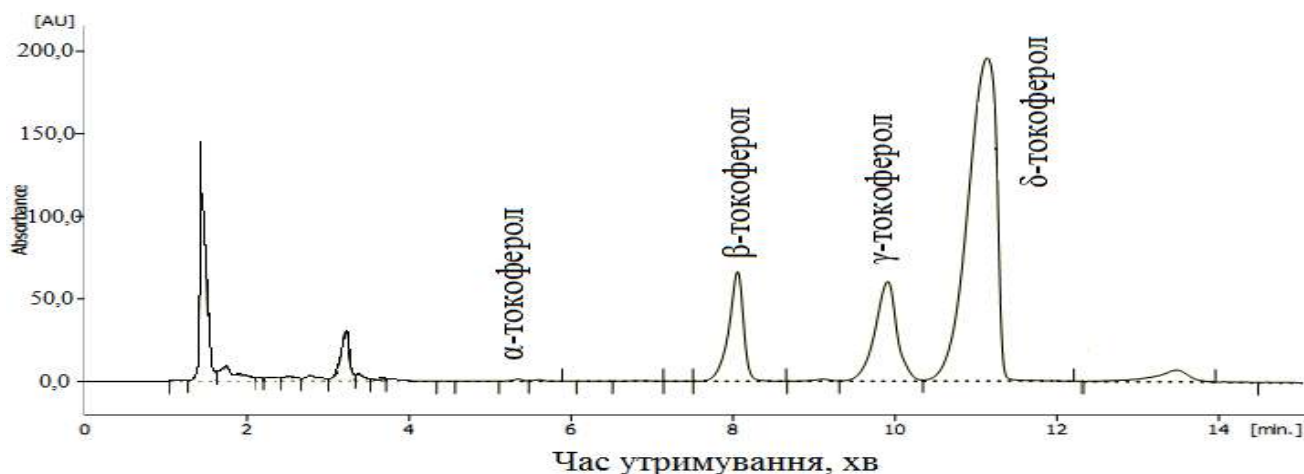


Рис. 3.22 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту токоферолів у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся методом ВЕРХ

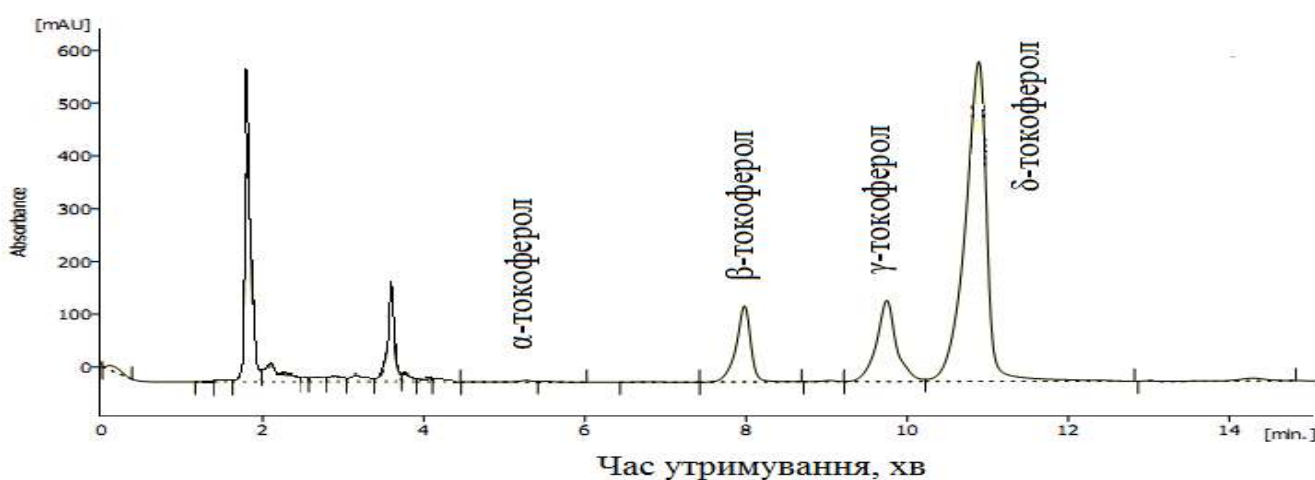


Рис. 3.23 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту токоферолів у насінні шпинату городнього сорту Фантазія методом ВЕРХ

За результатами експерименту в усіх зразках листя та насіння шпинату городнього було ідентифіковано по 4 сполуки: α -, β -, γ - та δ -токофероли.

Кількісний вміст ідентифікованих токоферолів у листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся, Фантазія та замороженому листі цієї рослини наведено у табл. 3.16.

Таблиця 3.16

Вміст токоферолів у сировині шпинату городнього (m = 5, P < 0,05)

Сполука	Вміст у перерахунку на абсолютно суху сировину, мг/кг									
	листя						насіння			
	заморожене		Красень Полісся		Фантазія		Красень Полісся		Фантазія	
	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг	Час утр., хв	Вміст, мг/кг
α-Токоферол	5,26	0,60 ± 0,02	5,25	0,70 ± 0,02	5,39	0,50 ± 0,01	5,32	0,30 ± 0,01	5,27	0,20 ± 0,01
β-Токоферол	8,72	1,80 ± 0,05	7,57	6,10 ± 0,15	7,91	5,20 ± 0,13	8,06	14,90 ± 0,37	7,98	11,40 ± 0,27
γ-Токоферол	9,61	9,30 ± 0,23	8,86	26,40 ± 0,66	8,91	27,10 ± 0,62	9,91	13,50 ± 0,34	9,75	12,20 ± 0,33
δ-Токоферол	13,13	0,30 ± 0,01	12,13	1,00 ± 0,03	12,39	0,70 ± 0,02	11,14	43,90 ± 1,10	10,89	48,20 ± 1,16
Загалом	—	12,00 ± 0,31	—	34,20 ± 0,86	—	33,50 ± 0,80	—	72,60 ± 1,74	—	72,00 ± 1,87

Експериментальні дані показали, що за якісним складом та кількісним вмістом токоферолів аналогічні види сировини шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія відрізнялися незначно.

У максимальній кількості токоферолі накопичувались у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся ($72,60 \pm 1,74$ мг/кг) та Фантазія ($72,00 \pm 1,87$ мг/кг). У листі цих рослин вміст токоферолів був майже вдвічі нижчий і становив ($34,20 \pm 0,86$) та ($33,50 \pm 0,80$) мг/кг відповідно. Найменше токоферолів містилося у замороженому листі шпинату городнього – $12,00 \pm 0,31$ мг/кг.

В усіх зразках листя шпинату городнього превалював γ -токоферол, на вміст якого припадало 76 – 80 % від сумарного вмісту токоферолів. У листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія містилося γ -токоферолу ($26,40 \pm 0,66$) та ($27,10 \pm 0,62$) мг/кг відповідно. У замороженому листі цієї рослини γ -токоферолу містилося майже втричі менше – ($9,30 \pm 0,23$) мг/кг, у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся ($13,50 \pm 0,34$ мг/кг) та Фантазія ($12,20 \pm 0,33$ мг/кг) – майже вдвічі менше.

Домінуючою сполукою у насінні обох сортів був δ -токоферол. Вміст цієї сполуки складав 2/3 вмісту суми токоферолів. Найбільше його містилося у насінні шпинату городнього сорту Фантазія – ($43,90 \pm 1,10$) мг/кг. У листі шпинату городнього вміст цієї сполуки не перевищував ($1,00 \pm 0,03$) мг/кг.

Найвищий вміст α -токоферолу був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – ($0,70 \pm 0,02$) мг/кг. У листі шпинату городнього сорту Фантазія ($0,50 \pm 0,01$ мг/кг) та замороженому листі ($0,60 \pm 0,02$ мг/кг) цієї рослини α -токоферолу містилося дещо менше. Вміст α -токоферолу у насінні шпинату городнього не перевищував ($0,30 \pm 0,01$) мг/кг.

На вміст β -токоферолу у листі насінні шпинату городнього припадало від 15 до 20 % сумарного вмісту токоферолів. У максимальній кількості β -токоферол накопичувався у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся – ($14,90 \pm 0,37$) мг/кг. У насінні шпинату городнього сорту Фантазія вміст цієї сполуки був майже у 1,3 рази нижчий. Відмічено, що у листі шпинату городнього досліджуваних сортів β -токоферолу накопичувалося у 2 - 2,5 рази менше, ніж у

насінні цих рослин. Найменше β -токоферолу містилося у замороженому листі шпинату городнього – $(1,80 \pm 0,05)$ мг/кг.

3.6 Дослідження мінерального складу

Мінеральні елементи відіграють ключову роль в протіканні усіх біохімічних процесів в організмі, оскільки є структурними складовими гормонів та ферментів [75, 178]. Зокрема, відомо, що манган та цинк є кофакторами лігаз, гідролаз, кіназ, трансфераз, декарбоксилаз. Поряд з тим, в організмі функціонують різні форми антиоксидантних ензимів печінки СОД, до складу яких входять купрум, цинк, магній та манган [162]. За результатами дослідів нігерійських вчених кальцій та магній нормалізують біохімічні параметри, зокрема, рівень глутамат-піруват та глутамат-оксалоацетат трансаміназ, загального білка та альбуміну в плазмі крові щурів з індукованим солями важких металів гепатитом [87]. Селен функціонує в біологічних системах у зв'язаному з амінокислотами стані (селеноцистеїн і селенометионін), з яких синтезуються білки селенопротеїни, у тому числі й глутатіонпероксидази [112, 147, 162]. Молібден входить до складу ксантинових та сульфатних оксидаз, які беруть участь у реакціях окисної редукції [162]. Німецькі вчені *in vitro* встановили, що сполуки ванадію пригнічують проліферацію клітин раку печінки [151].

Однак, у надмірній кількості деякі мінеральні елементи (ферум, купрум, цинк, алюміній, літій) та, особливо, важкі метали (плюмбум, арсен, кадмій, станум, меркурій) проявляють токсичний вплив на органи і системи, у тому числі й печінку [100, 162]. Хронічне отруєння кадмієм у дослідях *in vitro* спричиняло гепатоцелюлярний некроз, запальну інфільтрацію, зумовлювало розвиток фіброзу та стенозу печінки [100, 126, 162]. Дослідження мексиканських вчених показало, що надмірне накопичення арсену провокувало розвиток гепатоцелюлярної карциноми [100].

Японські вчені при дослідженні гострої гепатотоксичності кадмію спостерігали прямопропорційне збільшення зони запалення, фіброзу, гемосидерозу та стеатозу з підвищеним рівнем кадмію в тканинах печінки [167]. Проведені у

США наукові дослідження показали, що хронічне передозування солями хрому викликає анемію, тромбоцитопенію, ниркову недостатність та дисфункцію печінки, що приводить до збільшення втричі концентрації білірубіну в крові [86]. Вищесказана інформація дала підставу для вивчення мінеральних елементів сировини шпинату городнього.

Дослідження якісного складу та визначення кількісного вміст макро- та мікроелементів

Ідентифікацію та визначення вмісту мінеральних елементів у сировині шпинату городнього проводили методом ААС за методикою, яка наведена у підрозділі 2.3. Результати досліджень наведено у табл. 3.17.

У ході експерименту в усіх досліджуваних видах сировини шпинату городнього було ідентифіковано по 19 мінеральних елементів. Встановлено, що за якісним складом та кількісним вмістом мінеральних елементів аналогічні види сировини шпинату городнього відрізнялися незначно.

Аналіз показав, що найбільше мінеральних елементів накопичувалося у листі, дещо менше – у коренях, найменше – у насінні шпинату городнього, що характерно для обох досліджуваних сортів.

Найбільша кількість мінеральних елементів накопичувалася у листів шпинату городнього сорту Фантазія – $(11675,72 \pm 291,89)$ мкг/100 г. При цьому, максимальний сумарний вміст мікроелементів було зафіксовано у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся – $(134,72 \pm 3,37)$ мкг/100 г. На вміст суми мікроелементів у сировині шпинату городнього припадало 0,6 – 2,6 % від загального вмісту мінеральних елементів у відповідній сировині.

Серед макроелементів в усіх досліджуваних видах сировини домінував калій, найвищий вміст якого відмічено у листі шпинату городнього сорту Фантазія $(790,00 \pm 197,50)$ мкг/100 г). Крім того, у значній кількості в усіх зразках коренів, листя та насіння шпинату городнього накопичувались кальцій, натрій та магній. Однак, у коренях та насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся вміст силіцію переважав над вмістом магнію. Серед мікроелементів в усіх досліджуваних об'єктах превалювали алюміній, ферум, цинк та манган.

Таблиця 3.17

Вміст макро- та мікроелементів у сировині шпинату городнього у перерахунку на абсолютно суху сировину (m = 5, P < 0,05)

Елемент	Вміст макро- та мікроелементів у перерахунку на абсолютно суху сировину, мкг/100 г						
	корені		листя			насіння	
	Красень Полісся	Фантазія	заморожене	Красень Полісся	Фантазія	Красень Полісся	Фантазія
Макроелементи							
Силіцій	545,00 ± 13,63	470,00 ± 11,75	238,00 ± 5,95	385,00 ± 9,63	210,00 ± 5,25	315,00 ± 7,88	40,00 ± 1,00
Фосфор	270,00 ± 6,75	375,00 ± 9,38	558,00 ± 13,95	260,00 ± 6,50	340,00 ± 8,50	155,00 ± 3,88	160,00 ± 4,00
Магній	430,00 ± 10,75	370,00 ± 9,25	861,32 ± 21,53	525,00 ± 13,13	790,00 ± 19,75	145,00 ± 3,63	180,00 ± 4,50
Кальцій	430,00 ± 10,75	660,00 ± 16,50	941,70 ± 23,54	875,00 ± 21,88	1315,00 ± 32,88	315,00 ± 7,88	360,00 ± 9,00
Натрій	560,00 ± 14,00	565,00 ± 14,13	875,00 ± 21,88	700,00 ± 17,50	1050,00 ± 26,25	45,00 ± 1,13	20,00 ± 0,50
Калій	4290,00 ± 107,25	5450,00 ± 136,25	6613,00 ± 215,33	5250,00 ± 131,25	7900,00 ± 197,50	1260,00 ± 31,50	1200,00 ± 30,00
Загалом макроелементів	6525,00 ± 163,13	7890,00 ± 197,25	10087,02 ± 252,18	7995,00 ± 199,88	11605,00 ± 290,13	2235,00 ± 55,88	1960,00 ± 49,00
Мікроелементи							
Ферум	42,90 ± 1,07	22,50 ± 0,56	12,60 ± 0,32	31,50 ± 0,79	2,10 ± 0,05	12,60 ± 0,32	8,80 ± 0,22
Алюміній	78,60 ± 1,97	41,30 ± 1,03	42,77 ± 1,07	52,50 ± 1,31	50,20 ± 1,26	20,20 ± 0,51	20,00 ± 0,50
Манган	1,80 ± 0,05	0,70 ± 0,02	2,59 ± 0,06	4,20 ± 0,11	3,90 ± 0,10	6,70 ± 0,17	16,00 ± 0,40
Нікол	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Молібден	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Купрум	0,86 ± 0,02	1,40 ± 0,04	1,40 ± 0,04	1,10 ± 0,03	2,00 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,36 ± 0,01
Цинк	9,30 ± 0,23	16,90 ± 0,42	10,50 ± 0,26	9,60 ± 0,24	10,50 ± 0,26	4,50 ± 0,11	4,80 ± 0,12
Стронцій	1,10 ± 0,03	0,90 ± 0,02	2,12 ± 0,05	1,10 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,10 ± 0,03	3,40 ± 0,09
Загалом мікроелементів	134,72 ± 3,37	83,88 ± 2,10	72,24 ± 1,81	100,28 ± 2,51	70,72 ± 1,77	45,53 ± 1,14	53,43 ± 1,34
Сума мінеральних елементів	6659,72 ± 166,49	7978,88 ± 199,35	10159,30 ± 253,98	8094,98 ± 202,38	11675,72 ± 291,89	2280,53 ± 57,01	2013,43 ± 50,34
Вміст токсичних елементів							
Плюмбум	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Кобальт	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Кадмій	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Арсен	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Меркурій	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Встановлено, що в максимальній кількості силіцій ($545,00 \pm 13,63$ мкг/100 г), ферум ($42,90 \pm 1,07$ мкг/100 г) та алюміній ($78,60 \pm 1,97$ мг/кг) накопичувались у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся. Кальцію ($1315,00 \pm 32,88$ мкг/100 г), натрію ($1050,00 \pm 26,25$ мкг/100 г), калію ($7900,00 \pm 197,50$ мкг/100 г) та купруму ($2,00 \pm 0,05$ мкг/100 г) найбільше було у листі шпинату городнього сорту Фантазія. Максимальний вміст цинку ($16,90 \pm 0,42$ мкг/кг) та мангану ($16,00 \pm 0,40$ мкг/100 г) зафіксовано у коренях та насінні цієї рослини відповідно. Зі свого боку, фосфору ($558,00 \pm 13,95$ мкг/100 г), магнію ($861,32 \pm 21,53$ мкг/г) та стронцію ($2,12 \pm 0,05$ мкг/100 г) найбільше містилося у замороженому листі шпинату городнього.

Результати експерименту показали, що в усіх зразках сировини шпинату городнього вміст важких металів знаходився в межах допустимої норми для лікарської рослинної сировини за вимогами ДФУ [20, 139].

Висновки до розділу 3

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

В усіх досліджуваних видах сировини ідентифіковано яблучну, лимонну, хлорогенову та кофейну кислоти, лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин, аргінін, лютеолін. Крім, того у листі шпинату городнього досліджуваних сортів містилися щавлева, малонова кислоти, гліцин, фенілаланін, серин, треонін, цистеїн, рутин та апігенін.

2. Методом ВЕРХ у коренях шпинату городнього обох сортів було ідентифіковано 3, в усіх зразках листя цієї рослини – 7, у насінні обох рослин 5 фенольних сполук та визначено їх кількісний вміст. Максимальна кількість фенольних сполук ($1650,03$ мг/кг), а також гідроксикоричних кислот ($560,93$ мг/кг)

та флавоноїдів (1089,10 мг/кг) була у листі шпинату городнього сорту Фантазія. Серед гідроксикоричних кислот в усіх зразках коренів та листя шпинату городнього домінувала кофейна, у насінні – хлорогенова кислота. При цьому, найбільший вміст кофейної кислоти (351,50 мг/кг) був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся, хлорогенової (233,77 мг/кг) – у насінні цієї рослини. Серед флавоноїдів у коренях шпинату городнього кількісно переважав лютеолін, найвищий вміст якого був у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся (90,19 мг/кг). У листі та насінні домінував апігенін. Найбільше цієї сполуки накопичувалося у листі шпинату городнього сорту Фантазія (617,92 мг/кг). Крім того, в усіх зразках листя досліджуваної рослини відмічено значний вміст рутину – від 132,61 до 323,43 мг/кг.

Методом ВЕРХ в усіх зразках листя та насіння шпинату городнього ідентифіковано α -, β -, γ - та δ -токофероли, найвищий сумарний вміст яких був у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся – 72,60 мг/кг. В усіх зразках домінував γ -токоферол. У максимальній кількості ця сполука містилася у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 27,10 мг/кг.

3. Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії в усіх зразках сировини шпинату городнього ідентифіковано та визначено кількісний вміст 18 амінокислот. На вміст незамінних амінокислот припадало близько третини від загального вмісту цих сполук. Максимальний сумарний вміст амінокислот (155,09 мг/кг) було відмічено у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся. Проте, незамінних амінокислот найбільше містилося у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 58,08 %. Превалюючими незамінними амінокислотами в усіх зразках листя шпинату городнього були лейцин, лізин та фенілаланін.

4. Методом ГХ у сировині шпинату городнього ідентифіковано від 12 до 14 жирних кислот та визначено їх вміст. В усіх зразках кількісно переважали ненасичені жирні кислоти, найбільше яких містилося у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся (87,49 %). Серед ненасичених жирних кислот у коренях та насінні досліджуваних рослин переважала лінолева, в усіх зразках листя шпинату городнього – ліноленова кислота.

5. Вміст мінеральних елементів досліджували методом ААС. В усіх досліджуваних об'єктах ідентифіковано 19 мінеральних елементів, найвищий сумарний вміст яких був у листі шпинату городнього сорту Фантазія (11675,72 мкг/100 г). Серед макроелементів в усіх зразках сировини превалювали калій, кальцій та натрій, серед мікроелементів – алюміній, ферум, цинк та манган. Вміст важких металів знаходився в межах норми, встановленої ДФУ для лікарської рослинної сировини.

6. Методом абсорбційної спектрофотометрії визначено кількісний вміст аскорбінової кислоти, суми вільних амінокислот, поліфенольних, стероїдних сполук, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, хлорофілів а і b, каротиноїдів у сировині шпинату городнього. За результатами аналізу найвищий вміст аскорбінової кислоти (0,18 %), гідроксикоричних кислот (2,60 %) та флавоноїдів (4,02 %) відмічено у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся. В той же час, суми вільних амінокислот (3,21 %), хлорофілу а (366,41 мг/100 г), хлорофілу b (670,89 мг/100 г), каротиноїдів (250,86 мг/100 г), суми поліфенольних (11,30 %) та стероїдних сполук (0,70 %) найбільше містилося у листі шпинату городнього сорту Фантазія.

7. Гравіметричним методом у досліджуваній сировині шпинату городнього визначено кількісний вміст суми полісахаридів, ПР, ГЦ А, ГЦ Б та клітковини. Найвищий вміст водорозчинних полісахаридних комплексів та клітковини відмічено у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся (28,58 % та 30,28 % відповідно), ПР (6,62 %) та ГЦ Б (4,58 %) – у листі та коренях цієї рослини відповідно. Найбільше ГЦ А накопичувалося у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 19,87 %.

Поляриметричним методом визначено вміст крохмалю. Найбільше його містилося у насінні шпинату городнього сорту Фантазія – 28,41 %.

Титриметричним методом у досліджуваній сировині визначено вміст органічних кислот, найвище значення якого був у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 3,95 %. Вміст щавлевої кислоти у сировині шпинату городнього

визначали методом перманганатометрії. Найвищий вміст цієї сполуки був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – 0,93 %.

Кількісний вміст протеїну у сировині шпинату городнього визначали методом К'ельдаля за загальним вмістом нітрогену. Найвище його значення спостерігалось у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 33,10 %.

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у таких публікаціях:

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

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

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

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

результатів).

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

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

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

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

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

10. Гриненко У. В. Количественное определение фенольных соединений в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Роль молодежи в развитии*

медицинской науки: мат. XII научн.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году молодежи», г. Душанбе, 28 апреля 2017 г. Душанбе. 2017. С. 292-293.

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

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

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

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

15. Петровська У. В., Журавель І. О. Кількісний вміст органічних кислот, аскорбінової кислоти та гідроксикоричних кислот в сировині шпинату городнього сорту Красень Полісся та Фантазія. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : мат. II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 11 березня 2020 р. Харків. 2020. С. 129.

РОЗДІЛ 4

СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО ТА ОДЕРЖАНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ, ОБГОВОРЕННЯ ЙОГО ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

У ході проведення якісного та кількісного аналізу коренів, листя та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія встановлено ідентичність хімічного складу однакових видів сировини досліджуваних рослин. У листі шпинату городнього обох досліджуваних сортів зафіксовано порівняно вищий вміст майже усіх груп досліджуваних БАР. Вміст БАР у замороженому листі досліджуваної рослини був на тому ж рівні, що й у висушеному листі обох сортів, проте деяких БАР у цій сировині містилося у 2-3 рази менше. Тому, для подальших досліджень, пов'язаних з розробкою лікарських засобів, було обрано висушене листя шпинату городнього без надання переваги будь-якому з досліджуваних сортів.

Необхідною умовою розробки і виготовлення в подальшому лікарських рослинних засобів є використання стандартизованої за вимогами ДФУ сировини [19-21, 23, 38, 53]. Основним документом, який регламентує якість сировини є монографія ДФУ.

Формат монографії передбачає встановлення макро- та мікроскопічних ботанічних діагностичних ознак та типові випробування, які включають визначення втрати в масі при висушуванні, вмісту загальної золи та золи, не розчинної в хлористоводневій кислоті, а також дослідження якісного складу та визначення кількісного вмісту БАР [19-21, 36, 37].

Однією з передумов забезпечення належної якості лікарських рослинних засобів є підбір оптимального екстрагента і відповідного обладнання, що забезпечить максимально повну екстракцію БАР. При цьому, основними критеріями вибору оптимальної апаратури є технологічні параметри сировини [5, 62]. Тому подальшим етапом роботи було визначення числових показників якості, технологічних параметрів шпинату городнього листя та дослідження його морфолого-анатомічної будови.

4.1 Визначення числових показників якості та технологічних параметрів

Визначення числових показників якості за вимогами ДФУ

Числові показники якості шпинату городнього листя за вимогами ДФУ визначали гравіметричним методом за відповідними методиками ДФУ, які наведено у підрозділі 2.4. Результати аналізу наведено у табл. 4.1.

За результатами експерименту встановлено, що втрата в масі при висушуванні шпинату городнього складала $(7,76 \pm 0,37) \%$. Вміст загальної золи та золи, не розчинної в хлористоводневій кислоті, становив $(16,17 \pm 0,82) \%$ та $(1,45 \pm 0,07) \%$ відповідно [13].

Таблиця 4.1

Числові показники якості шпинату городнього листя ($m = 5$, $P < 0,05$)

Показник якості	Значення, %
Втрата в масі при висушуванні	$7,76 \pm 0,37$
Загальна зола	$16,17 \pm 0,82$
Зола, не розчинна в хлористоводневій кислоті	$1,45 \pm 0,07$

Підбір оптимального екстрагента, який вилучатиме максимальну кількість БАР із шпинату городнього листя здійснювали шляхом визначення вмісту екстрактивних речовин, поліфенольних сполук, флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у витяжках, одержаних при екстракції водою, 40, 70 та 96 % етанолом.

Визначення вмісту екстрактивних речовин проводили гравіметричним методом за методикою монографії «Полин гіркий^N» ДФУ 2.0.3 [19]. Кількісний вміст суми поліфенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів у одержаних витяжках визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методиками ДФУ, які наведено у підрозділі 2.3. Результати проведених експериментів наведено в табл. 4.2.

**Вміст екстрактивних речовин та деяких груп БАР у витяжках шпинату
городнього листя при екстракції водою та водно-етанольними сумішами
($m = 5$, $P < 0,05$)**

Екстрагент	Вміст, %			
	Екстрактивні речовини	Поліфеноли	Гідроксикоричні кислоти	Флавоноїди
Вода	$25,72 \pm 0,77$	$10,43 \pm 0,26$	$2,34 \pm 0,06$	$3,16 \pm 0,09$
40 % етанол	$24,73 \pm 0,98$	$10,68 \pm 0,27$	$2,77 \pm 0,07$	$4,20 \pm 0,11$
70 % етанол	$22,06 \pm 0,66$	$6,31 \pm 0,16$	$1,96 \pm 0,05$	$3,89 \pm 0,10$
96 % етанол	$10,78 \pm 0,54$	$2,52 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,03$	$2,21 \pm 0,06$

Як видно з даних таблиці, водою та 40 % етанолом екстрагувалась майже однакова кількість екстрактивних речовин, суми поліфенольних сполук та гідроксикоричних кислот. При чому вміст цих сполук в обох витяжках був на максимально високому рівні. Попри це, найбільша кількість флавоноїдів містилася у витяжках, одержаних екстракцією 40 та 70 % етанолом – ($4,20 \pm 0,11$) та ($3,89 \pm 0,10$) % відповідно. Зважаючи на це, оптимальним екстрагентом для одержання лікарських рослинних засобів зі шпинату городнього листя було обрано 40 % етанол [101].

Визначення технологічних параметрів сировини шпинату городнього

Визначення технологічних параметрів шпинату городнього листя проводили за загальноприйнятими методиками, які наведено у підрозділі 2.4. Результати дослідження наведено у табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Технологічні параметри шпинату городнього листя ($m = 5$, $P < 0,05$)

Технологічні параметри	Результат визначення
Насипна маса($\text{г}/\text{см}^3$)	$0,16 \pm 0,01$
Об'ємна вага ($\text{г}/\text{см}^3$)	$0,56 \pm 0,03$
Питома маса ($\text{г}/\text{см}^3$)	$1,30 \pm 0,08$
Пористість сировини ($\text{г}/\text{см}^3$)	$0,61 \pm 0,02$
Порізність сировини($\text{г}/\text{см}^3$)	$0,71 \pm 0,03$
Вільний об'єм шару ($\text{г}/\text{см}^3$)	$0,87 \pm 0,04$
Коефіцієнт поглинання 40 % етанолу	$2,71 \pm 0,12$

У ході дослідження було встановлено основні технологічні параметри шпинату городнього листя. За результатами аналізу коефіцієнт поглинання 40 % етанолу для подрібненого шпинату городнього листя складав $(2,71 \pm 0,12)$ [14].

4.2 Дослідження макро- та мікроскопічних ознак шпинату городнього листя

Дослідження морфологічної будови

Неподрібнена сировина шпинату городнього листя являє собою суміш цілих або частково подрібнених цілокраїх, неопушених листків овальної, округлої або яйцеподібної форми розміром до 5 см з перистим жилкуванням. Основа листка переважно клиноподібна, іноді стріло- або списоподібна, верхівка округла або злегка загострена. Черешки довгі, жолобчасті або трубчасті, крилаті, при основі мають піхвоподібні розширення. Листкова пластинка та черешки забарвлені у зелений колір. Зовнішній вигляд шпинату городнього листя представлено на рис. 4.1.

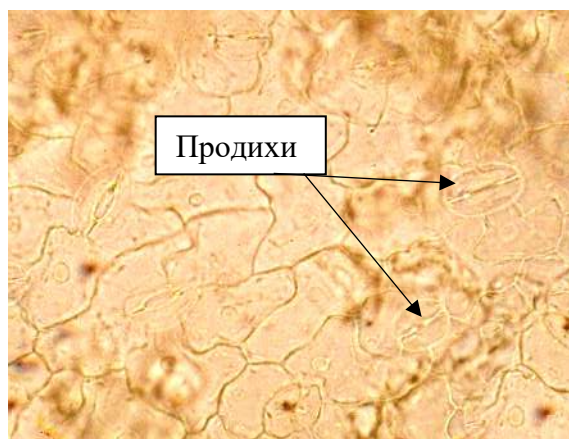


Рис. 4.1 Зовнішній вигляд шпинату городнього листя

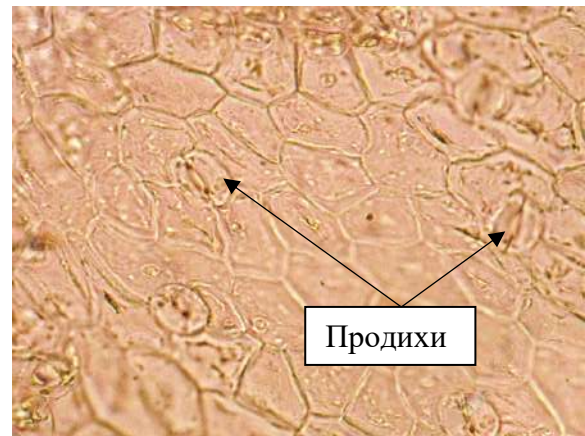
Дослідження анатомічної будови

На просвітлених мікропрепаратах з поверхні листкової пластинки чітко розпізнається епідерма, мезофіл, головна та бічні жилки.

Клітини нижньої епідерми (рис. 4.2 А) листка шпинату городнього злегка видовжені, мають тонкі звивисті стінки. Для верхньої епідерми (рис. 4.2 Б) характерні багатокутні або майже овальні клітини з прямими та потовщеними оболонками. Кутикула зовнішніх оболонок клітин тонка й гладка. Аномоцитні продихи мають 4-5 навколопродихових клітин, зустрічаються з обох боків листкової пластинки, розміщуються рівномірно і нещільно. Трихоми на нижній та верхній епідермі листка відсутні.



А



Б

Рис. 4.2 Фрагмент епідерми листя шпинату городнього (1×100): А – нижня;
Б – верхня

Мезофіл листка ізолатерального типу, диференціюється слабо. У мезофілі листка зустрічаються великі безбарвні ідіобласти з кристалами кальцію оксалату (рис. 4.3) характерного вигляду. Кристали змінюють форму і розмір по мірі старіння листків. На початку вегетації кристали поодинокі кубічної або таблитчастої форми, які поступово зростаються і перетворюються на численні друзи. Провідні жилки листкової пластинки утворені тонкими судинами з щільними або розтягненими спіральними потовщеннями.

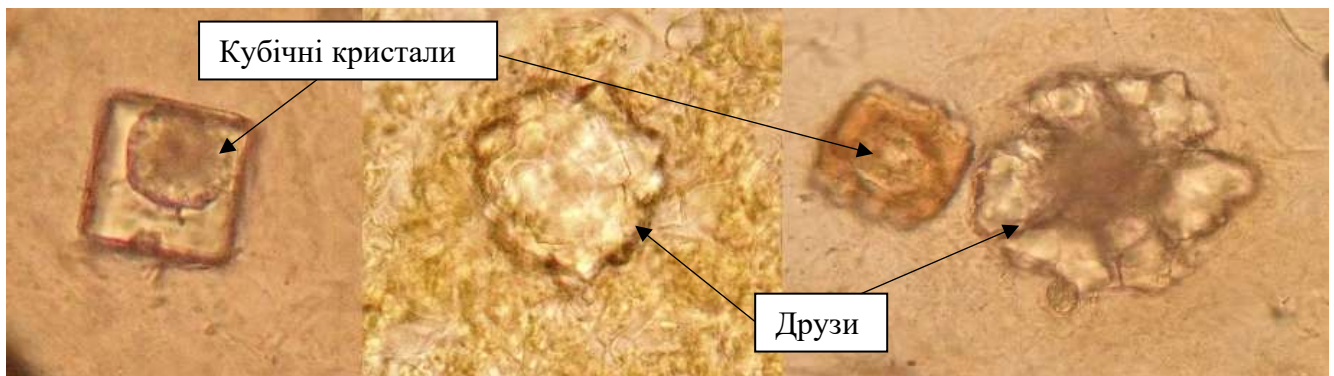
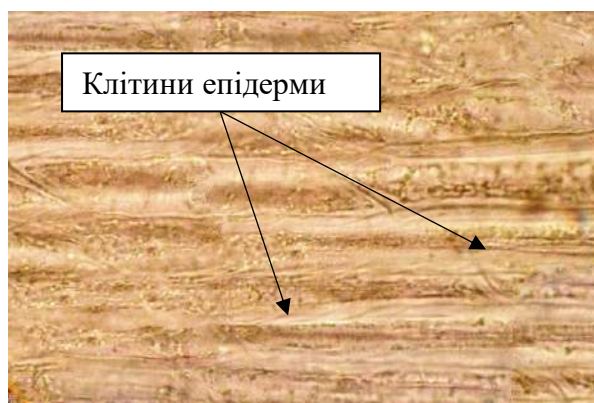
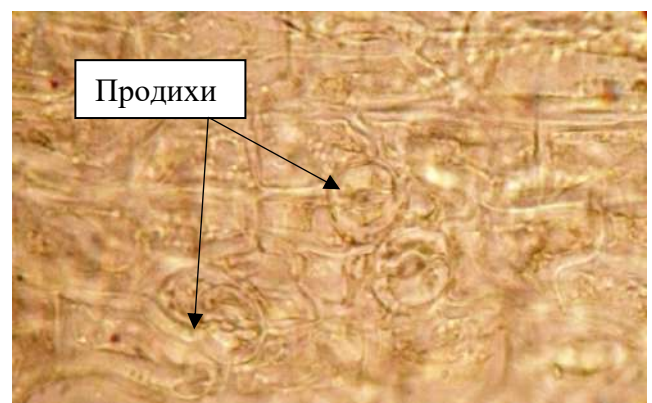


Рис. 4.3 Кристалічні включення кальцію оксалату у мезофілі листка шпинату городнього (1×100)

Епідерма абаксіального боку черешка (рис. 4.4 А), яка покриває опуклі виступи жилок, однорідна, без продихів і трихом. Вона утворена рівномірно потовщеними товстостінними, прозенхімними клітинами, які стикаються клиноподібно. Епідермальні клітини ділянок між жилок абаксіального боку черешка паренхімні з дещо потовщеними оболонками (рис. 4.4 Б), по всій поверхні зустрічаються кулясті продихи.



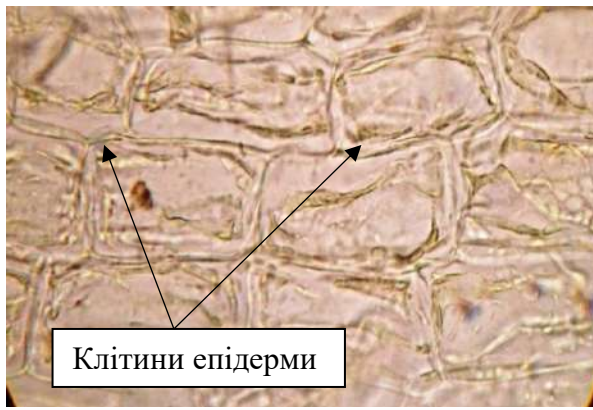
А



Б

Рис. 4.4 Фрагмент епідерми черешка листка шпинату городнього (1×100):
А – над жилками абаксіального боку; Б – між жилками абаксіального боку

Епідерма прозорих крил черешка (рис. 4.5 А) без продихів, складається з прямокутних паренхімних клітин із зернистим протопластом. Клітини епідерми адаксіального боку (рис. 4.5 Б), яка вистеляє жолоб, прозенхімні, вузькі, тонкостінні.



А



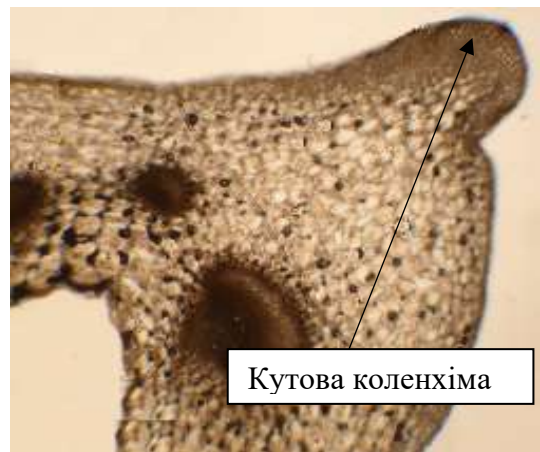
Б

Рис. 4.5 Фрагмент епідерми черешка листа шпинату горднього (1×100): А – абаксіальна епідерма крил; Б – адаксіальна епідерма, що вистеляє жолоб чи трубку черешка

Обрис поперечного перерізу черешка (рис. 4.6 А) сферичної, напівсферичної або трикутної форми. Абаксіальний бік округлий, широко-клиноподібний або кілюватий, адаксіальний – переважно сплющений або трохи увігнутий, під тонким шаром паренхіми має жолоб або порожнину. Бічні крила (рис. 4.6 Б) по усій довжині черешка більш-менш виразні.



А



Б

Рис. 4.6 Поперечний переріз черешка листка шпинату городнього (1×10): А – центральна жилка; Б – крилатий край

Основна паренхіма черешка пухка, складається з великих за розміром клітин. Виступи жилок укріплені кутовою коленхімою (рис. 4.6 А). Клітини мезофілу містять дрібні кристалічні включення кулястої, чотири- і багатогранної форми,

кількість яких поступово збільшується до кінця періоду вегетації рослини. Провідні пучки відкриті колатеральні (рис. 4.6 Б), кранцеві: оточені паренхімною обкладкою і вінцеподібно розміщеною хлоренхімою. Їх кількість варіюється від 9 до 11. По центру пучки великого розміру, ближче до крил вони дрібнішають [41].

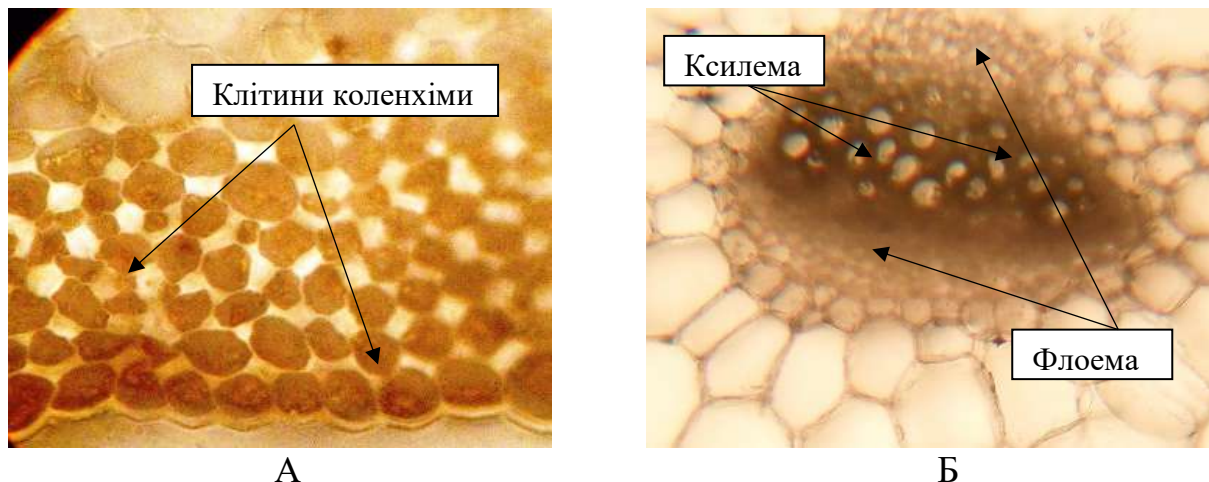


Рис. 4.7 Поперечний переріз черешка листка шпинату городнього (1×100):

А – центральна жила; Б – кутова коленхіма

4.3 Стандартизація шпинату городнього листя

ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО ЛИСТЯ

Spinaciae oleraceae folia

Цілі або фрагментовані листки *Spinacia oleracea* L. з черешками

Вміст:

- *поліфеноли*: не менше 10,0 % у перерахунку на пірогалол ($C_6H_6O_3$; М.м. 126,10) і суху сировину;
- *гідроксикоричні кислоти*: не менше 2,0 % у перерахунку на хлорогенову кислоту ($C_16H_{18}O_9$; М.м. 354,30) і суху сировину;
- *флавоноїди*: не менше 3,5 % у перерахунку на рутин ($C_{27}H_{30}O_{16}$; М.м. 611,0) і суху сировину;
- *щавлева кислота*: не більше 1,0 % ($C_2H_2O_4$; М.м. 126,1) у перерахунку на суху сировину.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Листкова пластинка зеленого кольору, овальної, округлої або яйцеподібної форми з перистим жилкуванням, без опушення із клиноподібною, іноді стріло- або списоподібною основою та округлою або злегка загостреною верхівкою. Черешки довгі, жолобчасті або трубчасті, крилаті, піхвоподібно розширені при основі.

В. Базисні клітини нижньої епідерми злегка видовжені, звивистостінні, верхньої епідерми – багатокутні або майже овальні клітини з прямими та потовщеними оболонками. Продихи аномоцитного типу, зустрічаються з обох боків листкової пластинки. Трихоми відсутні.

Епідерма абаксіального боку черешка над жилками та адаксіального боку, яка вистеляє жолоб, утворені прозенхімними клітинами, епідерми між жилками та прозорих крил черешка – паренхімними товстостінними клітинами. На епідермі черешка між жилками зустрічаються кулясті продихи, трихоми відсутні.

На поперечному перерізі черешок сферичної, напівсферичної або трикутної форми. Зовнішній бік округлий, широко-клиноподібний або кілюватий, внутрішній – переважно сплющений або трохи увігнутий з жолобом або порожниною під паренхімою. У мезофілі листка та черешка присутні безбарвні ідіобласти з кристалами кальцію оксалату кубічної, таблитчастої форми, які зростаються у численні друзи. Провідних пучків 9-11. Вони відкриті, колатеральні з паренхімною обкладкою і хлоренхімою, розміщеною вінцем.

С. *Тонкошарова хроматографія.*

Фенольні сполуки. Дослідження проводять за методикою монографії «Римської ромашки квітки» ДФУ 2.0.3 [19].

Випробовуваний розчин. До 0,50 г подрібненої сировини додають 10 мл метанолу *P*, нагрівають на водяній бані при температурі 60°C протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 2,5 мг *ФСЗ* апігеніну *P*, 2,5 мг *ФСЗ* рутину *P*, 2,5 мг *ФСЗ* кофейної кислоти *P* і 2,5 мг *ФСЗ* хлорогенової кислоти *P* розчиняють у 10 мл метанолу *P*.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна R – вода R – метанол R – етилацетат R (2,5 : 4 : 4 : 50).

Об'єм проб: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: при температурі (100-105)°C протягом 5 хв.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру R у метанолі R, потім розчином 50 г/л макрогону 400 R у метанолі R, після висихання переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: На хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння в УФ-світлі мають проявлятися такі зони:

Верхня частина пластинки	
кофейна кислота: блакитна флуоресцентна зона	блакитна флуоресцентна зона
апігенін: жовто-зелена флуоресцентна зона	жовто-зелена флуоресцентна зона
хлорогенова кислота: блакитна флуоресцентна зона	світло-жовта флуоресцентна зона блакитна флуоресцентна зона
рутин: жовто-коричнева флуоресцентна зона	жовто-коричнева флуоресцентна зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Вище або нижче описаних зон можуть проявлятися інші зони. ТШХ хроматограму фенольних сполук випробовуваного розчину шпинату городнього листя та розчину порівняння в УФ-світлі зображено на рис. 4.8.



Рис. 4.8 ТШХ хроматограма фенольних сполук випробовуваного розчину шпинату городнього листа (1) та розчину порівняння (2) в УФ-світлі у рухомій фазі *мурашина кислота безводна P – вода P – метанол P – етилацетат P* (2,5 : 4 : 4 : 50) при проявленні розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру *P* у метанолі *P* та розчином 50 г/л макроголу 400 *P* у метанолі *P*

ВИПРОБУВАННЯ

Екстрактивні речовини. Не менше 20,0 %. (За методикою монографії «Полин гіркий^N» 2.0.3 [19]).

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

Загальна зола. Не більше 18,0 %.

Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті. Не більше 2,0 %.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Сума поліфенольних сполук. Визначення проводять за методикою загальної статті «Визначення танінів у лікарських засобах рослинного походження» ДФУ 2.0.1 [20].

Близько 1,0 г подрібненої сировини заливають 150 мл *води P*, нагрівають на водяній бані 30 хв і охолоджують. Одержану витяжку кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 250,0 мл. Колбу обполіскують *водою P*, змиви об'єднують, об'єм розчину доводять *водою P* до 250,0 мл. Осад, що утворився відфільтровують, відкидаючи перші 50 мл фільтрату.

Сума поліфенолів. 5,0 мл фільтрату поміщають у мірну колбу ємністю 25,0 мл і доводять до мітки *водою P*. Суміш 2,0 мл одержаного розчину, 1,0 мл *фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву P* і 10,0 мл *води P* доводять розчином 290 г/л *натрію карбонату P* до об'єму 25,0 мл. Оптичну густину одержаного розчину вимірюють через 30 хв за довжини хвилі 760 нм. Як компенсаційний розчин використовують *воду P*.

Стандартний розчин. Для приготування стандартного розчину безпосередньо перед вимірюванням 50,0 мг (точна наважка) *пірогалолу Р* розчиняють у воді *Р* і доводять до 100,0 мл тим самим розчинником.

Вміст суми поліфенольних сполук (X , %), у перерахунку на *пірогалол* та абсолютно суху сировину обчислювали за формулою:

$$X = \frac{62,5 \times A_1 \times m_0}{A_0 \times m_1}, \quad (4.1)$$

де A_0 – оптична густина стандартного розчину за довжини хвилі 760 нм;

A_1 – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 760 нм;

m_1 – маса наважки сировини, г;

m_2 – маса *пірогалолу*, г [20].

Спектр поглинання водної витяжки зі шпинату городнього листа з *фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом Р* в у видимій ділянці світла в діапазоні 400-800 нм наведено на рис. 4.9.

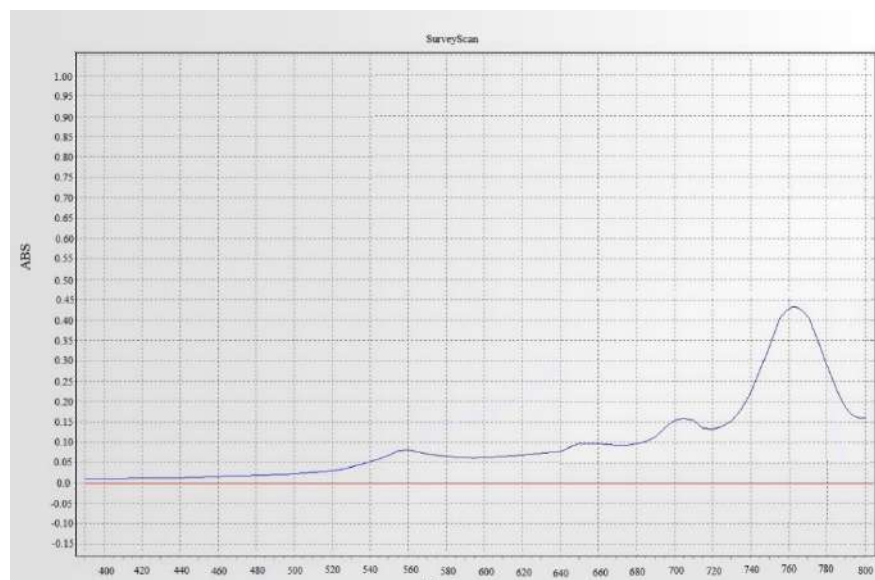


Рис. 4.9 Спектр поглинання у видимій ділянці світла водної витяжки зі шпинату городнього листа з *фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом Р* в УФ-світлі в діапазоні 400-800 нм

Вміст суми поліфенольних сполук у шпинату городнього листі має бути не менше 10,0 %.

Сума гідроксикоричних кислот. Дослідження проводять за методикою монографії «Кропиви листя» ДФУ 2.0.3 [19].

Випробовуваний розчин (а). До 1,0 г подрібненої сировини додають 95 мл *етанолу Р* (50 %, об/об) і нагрівають на водяній бані протягом 30 хв. Витяжку охолоджують і фільтрують. Фільтр обполіскують 5 мл *етанолу Р* (50 %, об/об), фільтрат і промивні води об'єднують у мірній колбі на 100,0 мл і доводять об'єм розчину *етанолом Р* (50 %, об/об) до позначки.

Випробовуваний розчин (b). До 1,0 мл випробовуваного розчину (а) додають 2,0 мл 0,5 М розчину *хлористоводневої кислоти* та розчину, який готують шляхом розчинення 10 г *натрію нітриту Р* і 10 г *натрію молібдату Р* у 100 мл *води Р*, потім додають 2,0 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до 10,0 мл.

Оптичну гуστину випробовуваного розчину вимірюють за довжини хвилі 525 нм. Як компенсаційний розчин використовують розчин, який складається з 1,0 мл випробовуваного розчину, 2,0 мл 0,5 М розчину *хлористоводневої кислоти*, 2,0 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р* доведених *водою Р* у мірній колбі до 10,0 мл.

Вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на *хлорогенову кислоту* (Х, %) та абсолютно суху сировину обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \times 5,3}{m}, \quad (4.2)$$

де А – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм;

m – маса наважки сировини, г.

Використовують питомий показник поглинання *хлорогенової кислоти*, який становить 188.

Спектр поглинання 50 % *етанольної витяжки* зі шпинату городнього листя з

натрію нітритом P і натрію молібдатом P в у видимій ділянці світла в діапазоні 450-600 нм наведено на рис. 4.10.

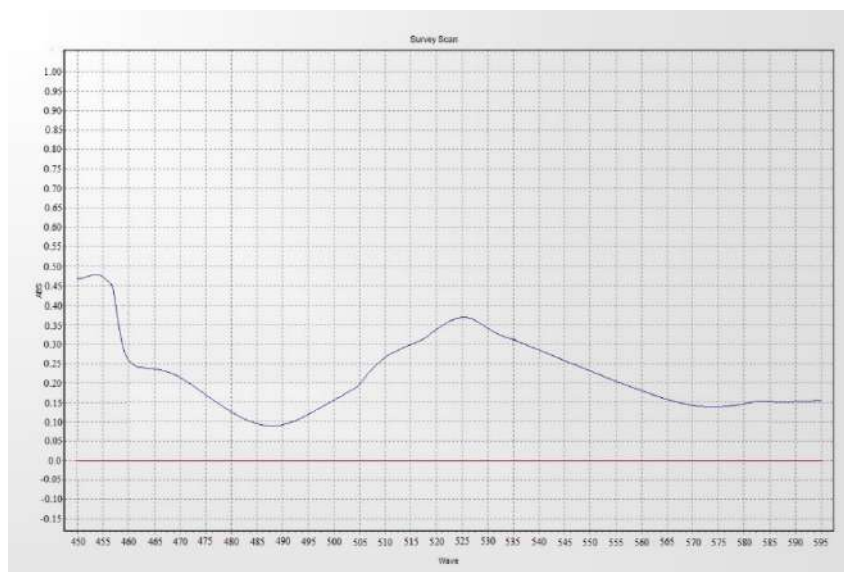


Рис. 4.10 Спектр поглинання у видимій ділянці світла 50 % етанольної витяжки зі шпинату городнього листя з натрію нітритом P і натрію молібдатом P в діапазоні 450-595 нм

Вміст гідроксикоричних кислот у шпинату городнього листі повинен бути не менше 2,0 %.

Сума флавоноїдів. Дослідження проводять за методикою монографії «Софори бутони» ДФУ 2.1 [21].

Вихідний розчин. 1,0 г знежиреної гептаном P сировини екстрагують 90 мл метанолу P . Охолоджену та відфільтровану метанольну витяжку кількісно переносять у мірну колбу і доводять об'єм розчину метанолом P до 100,0 мл. 10,0 мл одержаного розчину доводять водою P до об'єму 100,0 мл і ретельно струшують.

Випробовуваний розчин. 10,0 мл вихідного розчину доводять розчином 20 г/л алюмінію хлориду P у метанолі P до об'єму 100,0 мл.

Компенсаційний розчин. 10,0 мл вихідного розчину доводять метанолом P до об'єму 100,0 мл.

Оптичну густину випробовуваного та компенсаційного розчинів вимірюють за довжини хвилі 410 нм через 15 хвилин після приготування.

Вміст флавоноїдів (X , %), у перерахунку на *рутин* та абсолютно суху сировину обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times 37}, \quad (4.3)$$

де A -оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм;

m – маса наважки сировини, г.

Використовують питомий показник поглинання рутину, який дорівнює 370.

Спектр поглинання метанольної витяжки зі шпинату городнього листа з *алюмінію хлоридом Р* в УФ та видимій ділянці світла в діапазоні 350-450 нм наведено на рис. 4.11.

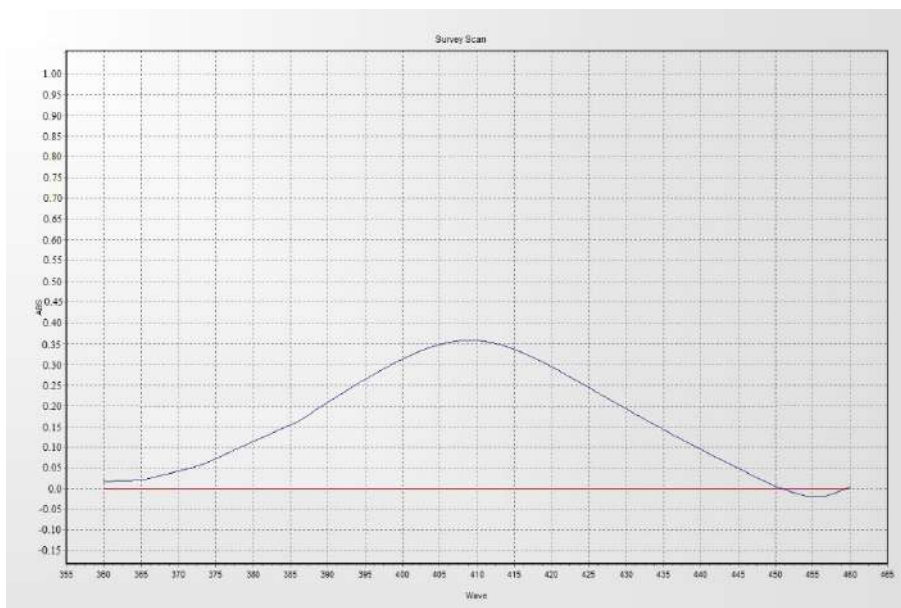


Рис. 4.11 Спектр поглинання в УФ та видимій ділянці світла метанольної витяжки зі шпинату городнього листа з *алюмінію хлоридом Р* в УФ-світлі в діапазоні 350-450 нм

Вміст суми флавоноїдів у шпинату городнього листі має бути не менше 3,5 %.

Щавлева кислота. Визначення кількісного вмісту вільної та зв'язаної щавлевої кислоти проводять методом перманганатометрії.

Близько 5,0 г сировини розтирають зі скляним піском, 5 мл 10 % сірчаною кислотою та невеликою кількістю 96 % етанолу. Потім до суміші додають 250 мл води, струшують і залишають на декілька годин. Вміст колби відфільтровують. До 50,0 мл фільтрату додають аміак до тих пір, поки рН розчину не перевищить 7,0. Для запобігання осадження винної кислоти та її ізомерів до розчину додають 1,0 г борної кислоти.

До утвореної суміші додають 10,0 мл реактиву для осадження щавлевої кислоти, який складається з рівних об'ємів 5,0 % розчину кальцію хлориду в 50 % оцтовій кислоті та 1 % розчину натрію ацетату, і залишають на 48 год при температурі не вище 7°C. Осад кальцію оксалату, що утворився, відфільтровують і промивають водою до негативної реакції з 1 % розчином аргентуму нітрату.

Осад кальцію оксалату змивають з фільтру водою, додають гарячу 10 % сірчану кислоту через той же фільтр, щоб розчинити сліди оксалатів. Колбу з вмістом нагрівають до повного розчинення осаду, фільтр промивають гарячою водою.

Суміш титрують 0,1 н розчином калію перманганату до появи рожевого забарвлення. Вміст щавлевої кислоти (X, %) з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V_{\text{KMnO}_4} \times T_{\text{KMnO}_4} \times 500 \times 100}{m \times 37 \times (100 - W)}, \quad (4.4)$$

де V_{KMnO_4} – об'єм калію перманганату, що пішов на титрування;

T_{KMnO_4} – титр калію перманганату за щавлевою кислотою;

m – маса наважки, г;

W – втрата в масі при висушуванні, %.

Вміст щавлевої кислоти у листі шпинату городнього не повинен перевищувати 1,0 %.

Для стандартизації використовували 5 серій шпинату городнього листа. Усі досліджувані зразки відповідали поставленим вимогам за макро- та мікроскопічними ознаками, числовими показниками, якісним складом та кількісним вмістом фенольних сполук та щавлевої кислоти. Параметри стандартизації шпинату городнього листа за вимогами ДФУ наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Параметри стандартизації шпинату городнього листя

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю	Досліджувані серії сировини				
			082016	082017	082018	082019	072020
1	2	3	4	5	6	7	8
Ідентифікація							
А	Цілі або фрагментовані листки <i>Spinacia oleracea</i> L. з черешками. Листкова пластинка зеленого кольору, овальної, округлої або яйцеподібної форми з перистим жилкуванням, без опушення із клиноподібною, іноді стріло- або списоподібною основою та округлою або злегка загостреною верхівкою. Черешки довгі, жолобчасті або трубчасті, крилаті, піхвоподібно розширені при основі.	МКЯ п. 1.1	Відповідає	-//-	-//-	-//-	-//-
В	Базисні клітини нижньої епідерми паренхімні, звивистостінні, верхньої епідерми – багатокутні або майже овальні клітини з прямими та потовщеними оболонками. Продихи аномоцитного типу, зустрічаються з обох боків листової пластинки. Трихоми відсутні. Епідерма абаксіального боку черешка над жилками та адаксіального боку, яка вистеляє жолоб, утворені прозенхімними клітинами, епідерми між жилками та прозорих крил черешка – паренхімними товстостінними клітинами. На епідермі черешка між жилками зустрічаються кулясті продихи, трихоми відсутні. На поперечному перерізі черешок сферичної, напівсферичної або трикутної форми. Зовнішній бік округлий, широко-клиновидний або кілюватий, внутрішній – переважно сплюснений або трохи увігнутий з жолобом або порожниною під паренхімою. У мезофілі листка та черешка присутні безбарвні ідіобласти з кристалами кальцію оксалату кубічної, таблитчастої форми, які зростаються у численні друзи. Провідних пучків 9-11. Вони відкриті, колатеральні з паренхімною обкладкою і хлоренхімою, розміщеною вінцем.	МКЯ п. 1.2	Відповідає	-//-	-//-	-//-	-//-

Продовж. табл. 4.4

1	2	3	4	5	6	7	8
С Фенольні сполуки	ТШХ у порівнянні з <i>ФСЗ апігеніну Р</i> , <i>ФСЗ рутину Р</i> , <i>ФСЗ кофейної кислоти Р</i> і <i>ФСЗ хлорогенової кислоти Р</i> у метанолі <i>Р</i> . Рухома фаза: <i>мурашина кислота безводна Р – вода Р – метанол Р – етилацетат Р</i> (2,5 : 4 : 4 : 50). Виявлення: розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру <i>Р</i> у метанолі <i>Р</i> , потім розчином 50 г/л макроглоу 400 <i>Р</i> у метанолі <i>Р</i> . На хроматограмі випробовуваного розчину у нижній частині одна над одною мають проявлятися жовто-коричнева, блакитна та жовто-зелена флуоресцентні зони, у верхній частині – інтенсивна блакитна флуоресцентна зона.	ДФУ 2.0.3, «Римської ромашки квітки» МКЯ п.1.3	Відповідає	-/-	-/-	-/-	-/-
Числові показники							
Екстрактивні речовини при екстракції 40 % етанолом	Не менше 20,0 %	ДФУ 2.0.3 «Полин гіркий ^N » МКЯ п.2	25,72	21,91	24,51	22,18	23,67
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 10,0 %	ДФУ 2.0.1, 2.2.32 МКЯ п.2	7,76	5,94	8,84	9,20	6,14
Загальна зола	Не більше 18,0 %	ДФУ 2.0.1, 2.4.16 МКЯ п. 2	14,80	16,17	13,91	17,62	16,84
Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті	Не більше 2,0 %	ДФУ 2.0.1, 2.4.16 МКЯ п. 2	1,28	1,45	1,07	1,16	1,33
Кількісне визначення							
Сума поліфенольних сполук	Не менше 10,0 %.	ДФУ 2.0.1., 2.8.14 МКЯ п. 3	10,90	11,12	11,30	10,48	10,27
Сума гідроксикоричних кислот	Не менше 2,0 %	ДФУ 2.0.3, «Кропиви листя» МКЯ п. 3	1,96	2,60	1,22	2,27	2,44
Сума флавоноїдів	Не менше 3,5 %	ДФУ 2.1, «Софори бутони» МКЯ п. 3	2,90	2,61	4,02	3,90	3,77
Щавлева кислота	Не більше 1,0 %	МКЯ п. 3	0,93	0,89	0,90	0,88	0,91

4.4 Розробка технології одержання шпинату городнього листа екстракту густого

На продуктивність виходу БАР із лікарської рослинної сировини та ефективність процесу екстракції значною мірою впливають різноманітні зовнішні та внутрішні чинники: ліпофільні та гідрофільні властивості екстрагенту, подрібненість сировини, співвідношення сировини й екстрагенту, температура, кратність та тривалість екстракції тощо [17, 29, 57]. Для того, щоб оцінити таку кількість чинників на практиці потрібно провести значне число дослідів. Традиційний однофакторний експеримент із почерговим варіюванням чинників за умови сталого значення усіх інших – трудомісткий та високовартісний процес, який не дозволяє оцінити взаємовплив усіх факторів на технологічний процес. Статистичні методи планування експерименту дозволяють одночасно варіювати всіма факторами. Практичне застосування математичного планування експерименту підвищує ефективність роботи та дозволяє раціоналізувати, оптимізувати, прискорити та значно здешевити процес розробки ліків [3, 17, 24, 29, 40, 57].

Для розробки раціональної технології одержання екстракту зі шпинату городнього листа та забезпечення максимальної екстракції БАР проводили підбір оптимальних умов екстракції за допомогою методу математичного планування на моделі трьохфакторного експерименту. Побудову математичного плану здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 10,0.

Вихідними незалежними факторами, які за даними літератури мають найбільший вплив на процес екстракції природних сполук з лікарської сировини природного походження, було обрано співвідношення сировини й екстрагенту, температура нагріву водяної бані та кратність екстракції. Контрольні точки цих чинників встановлювали на нижньому, центральному та середньому рівнях. Показник співвідношення сировини до екстрагенту змінювався в інтервалі від 0,10 (1 : 10) до 0,20 (1 : 5) з інтервалом 0,05. Фактор температури нагріву водяної бані оцінювали у діапазоні від 25 до 95°C з інтервалом варіювання 35°C. Нижній, центральний та верхній рівень для чинника кратності екстракції становили 1, 2 та 3 рази відповідно.

Як параметри оптимізації, за значеннями яких складали якісну оцінку ефективності процесу екстракції та проводили вибір його оптимальних умов, було обрано вихід суми поліфенолів, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів. Для виключення можливості випадкової та зниження імовірності виникнення систематичної похибок кожне вимірювання проводили у 5-кратній повторюваності.

Загальний вигляд рівняння регресії, яке описувало функцію виходу БАР із сировини, мало вигляд:

$$y = b_0 + r \cdot A + r \cdot A^2 + r \cdot B + r \cdot B^2 + r \cdot C + r \cdot C^2 + r \cdot AB + r \cdot AC + r \cdot BC + r \cdot ABC,$$

де b_0 – вільний член;

r – коефіцієнт регресії;

A, B, C – значення відповідних факторів при лінійній взаємодії;

A^2, B^2, C^2 – значення відповідних факторів при квадратичній взаємодії;

AB, AC, BC, ABC – значення факторів при лінійній одночасній взаємодії декількох параметрів.

Матрицю планування трьохфакторного експерименту із результатами виходу БАР у відповідних контрольних точках наведено у табл. 4.5.

Таблиця 4.5

**Матриця планування трьохфакторного експерименту та значення виходу БАР зі шпинату городнього листа у контрольних точках
($m=5, P < 0,05$)**

Номер досліджу	Значення незалежних факторів			Параметр оптимізації		
	Температура екстракції, °C	Співвідношення сировини до екстрагенту	Кратність екстракції	Поліфеноли	Гідроксикоричні кислоти	Флавоноїди
1	25	0,10	1	$5,94 \pm 0,15$	$1,11 \pm 0,03$	$2,97 \pm 0,07$
2	25	0,15	3	$6,22 \pm 0,16$	$1,17 \pm 0,03$	$3,02 \pm 0,08$
3	25	0,20	2	$7,15 \pm 0,18$	$1,58 \pm 0,04$	$3,72 \pm 0,09$
4	60	0,10	1	$11,54 \pm 0,29$	$2,32 \pm 0,06$	$4,14 \pm 0,10$
5	60	0,15	3	$12,72 \pm 0,32$	$2,68 \pm 0,07$	$4,42 \pm 0,11$
6	60	0,20	2	$13,21 \pm 0,33$	$2,99 \pm 0,07$	$4,76 \pm 0,12$
7	95	0,10	1	$7,91 \pm 0,21$	$1,80 \pm 0,05$	$2,29 \pm 0,06$
8	95	0,15	3	$8,42 \pm 0,22$	$1,91 \pm 0,05$	$2,50 \pm 0,06$
9	95	0,20	2	$8,85 \pm 0,23$	$2,00 \pm 0,05$	$2,99 \pm 0,07$

При складанні рівняння регресії функції, яка описує вихід поліфенольних

сполук, були розраховані коефіцієнти регресії:

$$\begin{aligned} b_0 &= 9,106667; & B^2 &= 0,020000; & AC &= 0; \\ A &= 1,956667; & C &= -0,320000; & BC &= 0; \\ A^2 &= 5,075000; & C^2 &= 0,325000; & ABC &= 0. \\ B &= 1,273333; & AB &= 0,190000; \end{aligned}$$

Рівняння лінійної регресії другого порядку мало вигляд:

$$Y \text{ (ПФ)} = 9,106667 + 1,956667 \cdot A + 5,075000 \cdot A^2 + 1,273333 \cdot B + 0,020000 \cdot B^2 - 0,320000 \cdot C + 0,325000 \cdot C^2 + 0,190000 \cdot AB;$$

Статистично значимими для функції виходу суми поліфенольних сполук були чинники лінійної та квадратичної температури екстракції, а також лінійний фактор співвідношення сировини до екстрагенту, що ілюструє карта Парето (рис. 4.12).

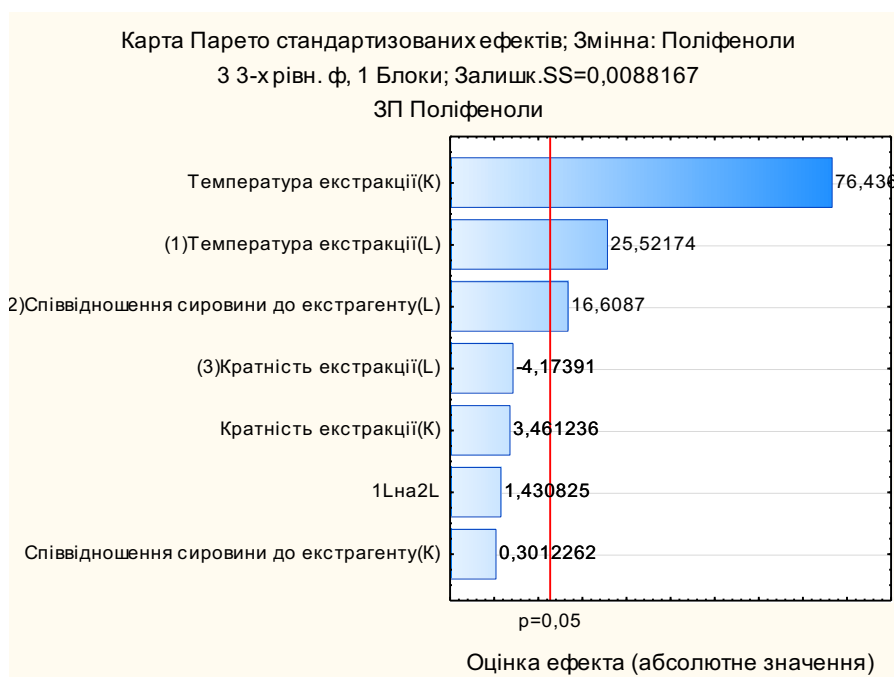
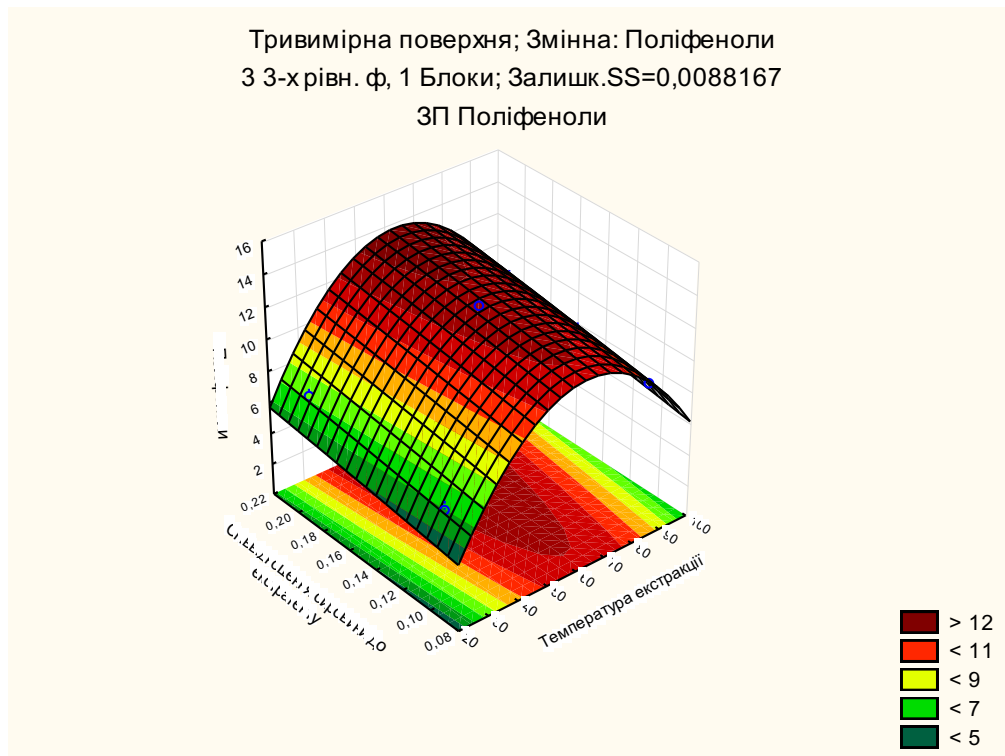
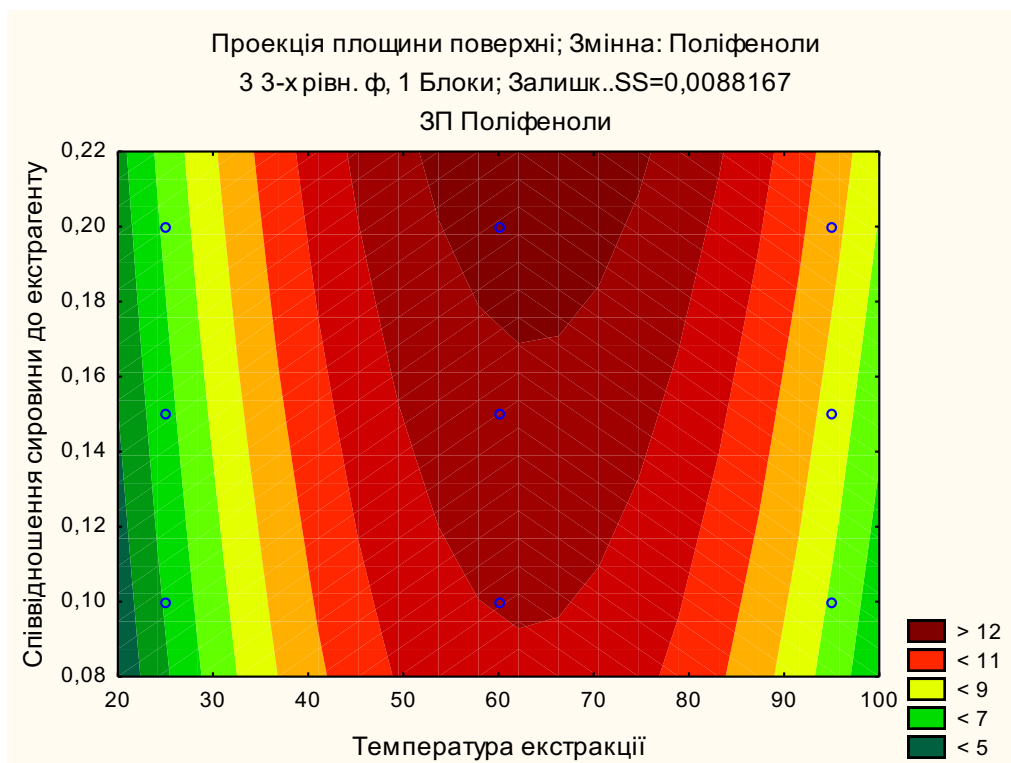


Рис. 4.12 Карта Парето статистичної значимості впливу факторів співвідношення сировини до екстрагенту, температури екстракції та кратності екстракції на процес виходу поліфенольних сполук зі шпинату городнього листа

Екстремуми функції відгуку виходу поліфенолів зображено на графіку площини її поверхні (рис. 4.13 А) та її проєкції (рис. 4.13 Б)



А



Б

Рис. 4.13 Графік площини поверхні (А) функції відгуку за параметром оптимізації «Поліфеноли» та її проєкція (Б) при сталому значенні кратності екстракції

Найвищий прогнозований вихід суми поліфенольних сполук зі шпинату городнього листа при сталому значенні кратності екстракції очікувався в інтервалі температури екстракції 55-75°C та співвідношенні сировини до екстрагенту понад 0,18.

Спрогнозоване граничне значення виходу поліфенолів у точці максимуму екстремуму функції за умов нагріву водяної бані до 64°C та співвідношенні сировини до екстрагенту 0,22 при однократній екстракції становило 13,47 %, при двократній – 13,63 %, при трикратній – 13,74 %.

Вихід гідроксикоричних кислот зі шпинату городнього листа оцінювали за допомогою рівняння регресії з відповідними статистичними коефіцієнтами:

$$\begin{aligned} b_0 &= 1,951111; & B^2 &= -0,046667; & AC &= 0; \\ A &= 0,616667; & C &= -0,173333; & BC &= 0; \\ A^2 &= 1,068333; & C^2 &= 0,071667; & ABC &= 0. \\ B &= 0,446667; & AB &= -0,063333; \end{aligned}$$

$$Y \text{ (ГК)} = 1,951111 + 0,616667 \cdot A + 1,068333 \cdot A^2 + 0,446667 \cdot B - 0,046667 \cdot B^2 - 0,173333 \cdot C + 0,071667 \cdot C^2 - 0,063333 \cdot AB;$$

Оцінку значимості факторів на процес екстракції гідроксикоричних кислот проводили за картою Парето (рис. 4.14).

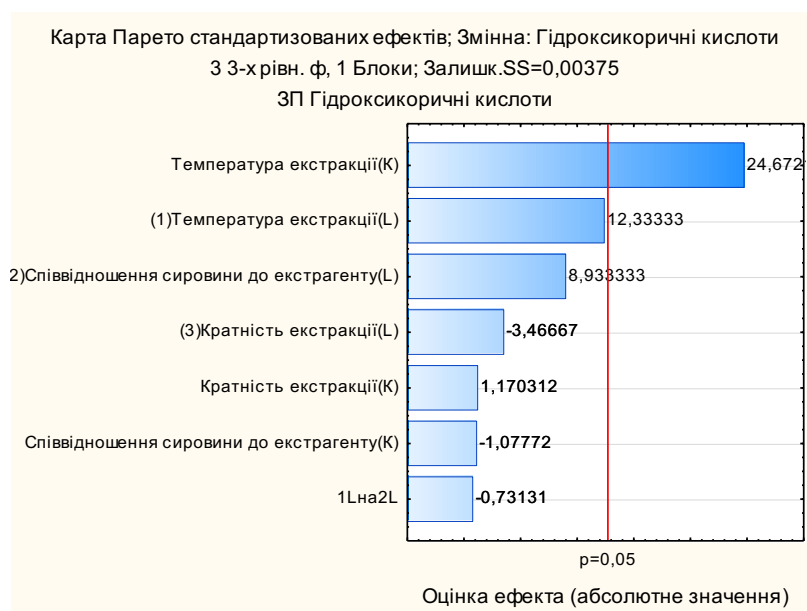
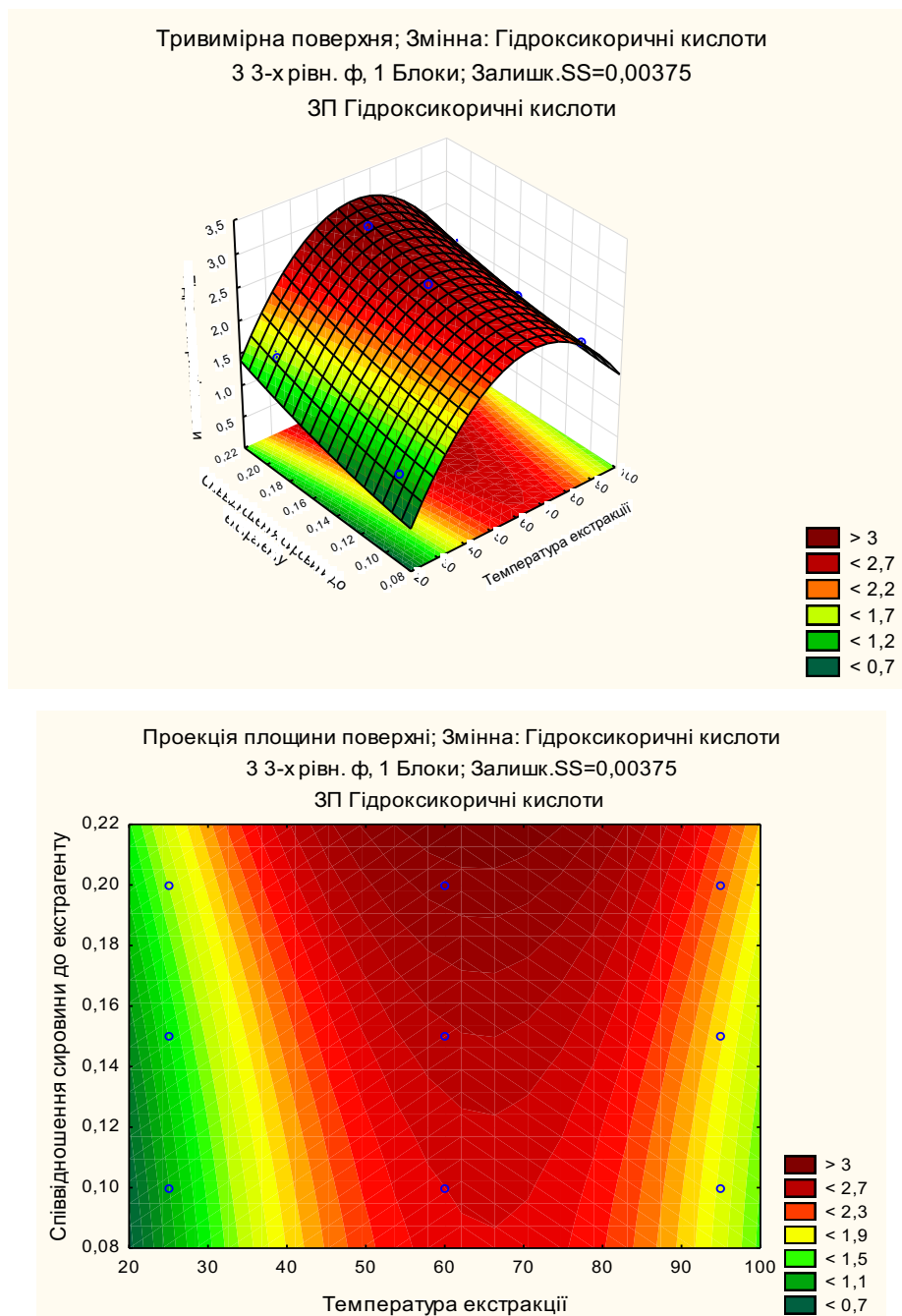


Рис. 4.14 Карта Парето статистичної значимості впливу аналізованих факторів на процес екстракції гідроксикоричних кислот зі шпинату городнього листа

Як видно з ілюстрації, розрахований критерій Стюдента квадратичної температури екстракції перевищував його критичне значення, що свідчило про статистичний вплив цього фактору на вихід гідроксикоричних кислот.

Графік тривимірної площини поверхні функції відгуку за виходом гідроксикоричних кислот та її проєкцію зображено на рис. 4.15.



А

Б

Рис. 4.15 Графік площини поверхні (А) функції відгуку за параметром оптимізації «Гідроксикоричні кислоти» та її проєкція (Б) при сталому значенні кратності екстракції

Відповідно, найвищий вихід цих БАР при сталому значенні кратності екстракції очікувався в діапазоні температури екстракції $65 \pm 10^\circ\text{C}$, при цьому, співвідношення сировини до екстрагенту перевищувало відмітку 0,20. Максимальне прогнозоване значення виходу гідроксикоричних кислот було у точці зі значенням температури екстракції 64°C , співвідношенні сировини до екстрагенту 0,22 та кратності екстракції 3. При цьому, воно складало 3,12 %.

Впливовість предикторів та їх взаємодії на процес екстракції флавоноїдів зі шпинату городнього листа виражалась коефіцієнтами регресії:

$$\begin{aligned} b_0 &= 3,423333; & B^2 &= -0,165000; & AC &= 0; \\ A &= -0,643333; & C &= -0,026667; & BC &= 0; \\ A^2 &= 1,525000; & C^2 &= 0,080000; & ABC &= 0. \\ B &= 0,690000; & AB &= 0; \end{aligned}$$

Функція оптимізації виходу флавоноїдів описувалась рівнянням:

$$Y(\Phi) = 3,423333 - 0,643333 \cdot A + 1,525000 \cdot A^2 + 0,690000 \cdot B - 0,165000 \cdot B^2 - 0,026667 \cdot C + 0,080000 \cdot C^2;$$

За картою Парето (рис. 4.16) встановлено, що найбільший вплив на процес екстракції флавоноїдів зі шпинату городнього листа мали лінійні чинники температури екстракції та співвідношення сировини й екстрагенту, а також квадратичний фактор температури екстракції.

Графік тривимірної площини поверхні функції відгуку, який описує вплив чинників на процес екстракції флавоноїдів зі шпинату городнього листа, та її проекція зображено на рис. 4.17.

Найвищий вихід флавоноїдів при сталому значенні кратності екстракції, як видно з одержаного графіка, очікувався при температурі екстракції від 45 до 70°C та співвідношенні сировини до екстрагенту близько 0,20.

Прогнозований максимум виходу флавоноїдів за умов однократної екстракції при температурі 55°C та співвідношенні сировини до екстрагенту 0,22 становив 5,08 %, при дво- та трикратній екстракції – 5,11 та 5,23 % відповідно.

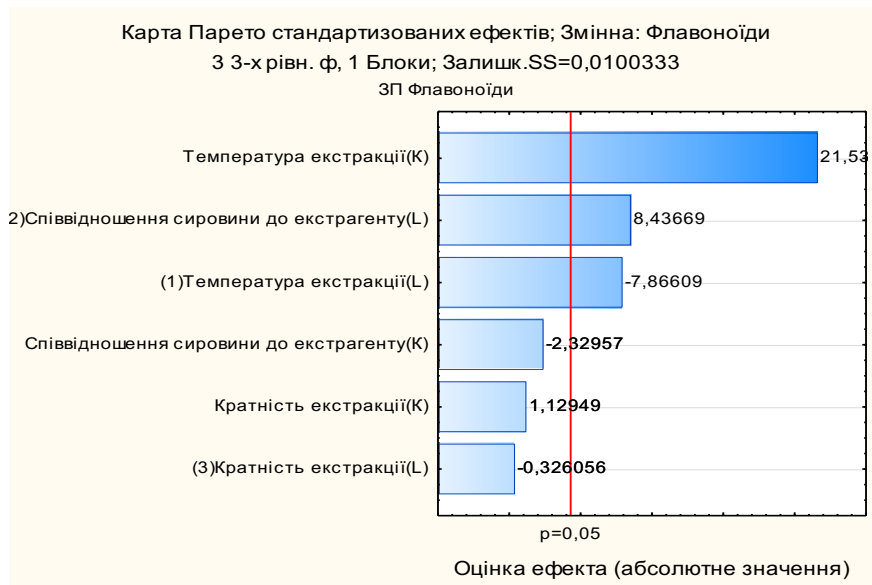
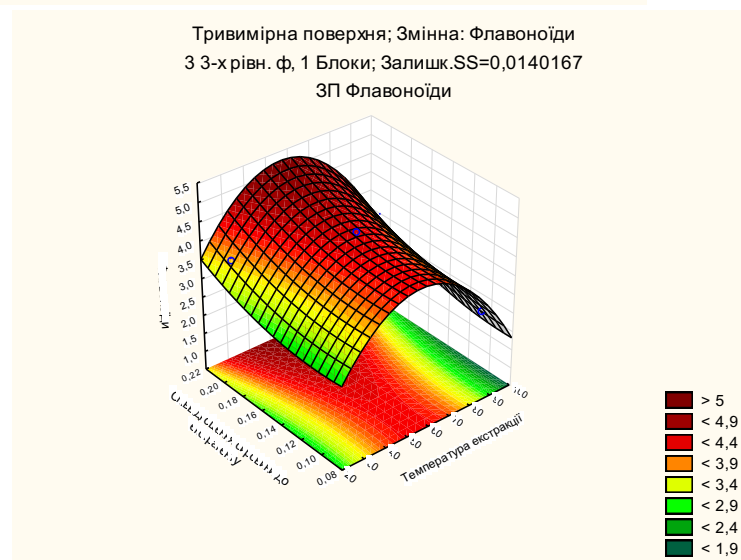
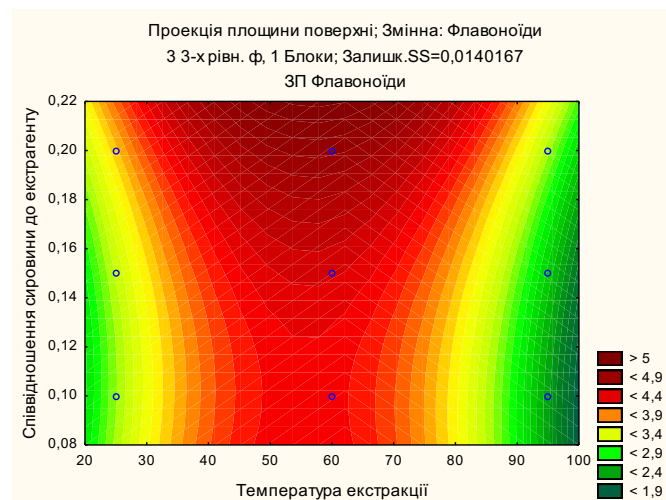


Рис. 4.16 Карта Парето статистичної значимості впливу аналізованих факторів на процес екстракції флавоноїдів зі шпинату городнього листя



А



Б

Рис. 4.17 Графік площини поверхні (А) функції відгуку за параметром оптимізації «Флавоноїди» та її проєкція (Б) при сталому значенні кратності екстракції

Для полегшення відтворення технологічного процесу при серійному одержанні екстракту оптимальними умовами було обрано трикратну екстракцію при температурі екстракції близько 60°C та співвідношенні сировини й екстрагенту 0,20. За таких умов прогнозоване значення виходу поліфенолів складало 12,85 %, гідроксикоричних кислот – 2,89 %, флавоноїдів – 4,93 %, що становило 93,52, 92,63 та 94,26 % відповідно, від максимально можливого.

Шпинату городнього листа екстракт густий одержували методом трикратної дробної мацерації 40 % етанолом при співвідношенні сировини й екстрагенту 1 : 5 та температурі нагріву водяної бані близько 60°C та з подальшим згущуванням витяжки під зниженим тиском.

Близько 100,0 г висушеного та подрібненого шпинату городнього листа заливали 438 мл 40 % етанолу з урахуванням K_p , який для цього екстрагенту становив 2,71. Екстракцію проводили протягом 1 год при температурі нагріву водяної бані близько 60°C . Витяжку охолоджували і фільтрували. Екстракцію проводили ще двічі, використовуючи щоразу по 167 мл екстрагенту. Одержані витяжки об'єднували.

Для перевірки результатів математичного планування на практиці методом абсорбційної спектрофотометрії в об'єднаній витяжці було визначено кількісний вміст суми поліфенольних сполук, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів за методиками ДФУ, які наведено у підрозділі 2.3.

За результатами проведених експериментів встановлено, що вміст поліфенольних сполук в одержаній витяжці зі шпинату городнього листа становив 12,33 %, гідроксикоричних кислот – 2,83 %, флавоноїдів – 4,82 %. Ці значення в загальному відрізнялись від прогнозованих не більше, ніж на 5 %, що можна пояснити у тому числі допустимими матеріальними втратами при проведенні різноманітних операцій технологічного процесу.

За результатами фітохімічних досліджень у шпинату городнього листі міститься щавлева кислота. У великих кількостях ця сполука провокує розвиток сечокам'яної хвороби [176]. Методом ТШХ у рухомій фазі № 3 у порівнянні зі стандартним зразком та за відповідним розташуванням і характерним

забарвленням зон після обробки реактивами А та Б в одержаній витяжці було ідентифіковано щавлеву кислоту. Методом перманганатометрії за методикою, яка наведена у підрозділі 2.3, визначено кількісний вміст цієї сполуки, який складав 0,82 %.

За даними літератури, використання ультразвукових хвиль сприяє руйнуванню оксалатів і знижує загальну кількість щавлевої кислоти в екстрактах з лікарської рослинної сировини [63]. Для зниження вмісту щавлевої кислоти в екстракті одержану витяжку поміщали в ультразвукову баню без підігріву на 10 хв, після чого витяжку фільтрували. Для оцінки залишку щавлевої кислоти методом перманганатометрії було визначено її вміст в очищеній витяжці. Встановлено, що в очищеній витяжці зі шпинату городнього листя містилася слідова кількість щавлевої кислоти ($< 0,01$ %).

Фільтрат концентрували під зниженим тиском на вакуум-випарному роторному апараті. Вихід готового продукту складав не менше 38 % від маси повітряно-сухої сировини. Технологічну схему одержання шпинату городнього листя екстракту густого наведено на рис. 4.18.

Шпинату городнього листя екстракт густий – в'язка маса зелено-бурого кольору. Одержаний екстракт легко розчинявся у воді та 40 % етанолі, частково – у 96 % етанолі, етилацетаті та бутанолі і майже не розчинявся у петролейному етері.

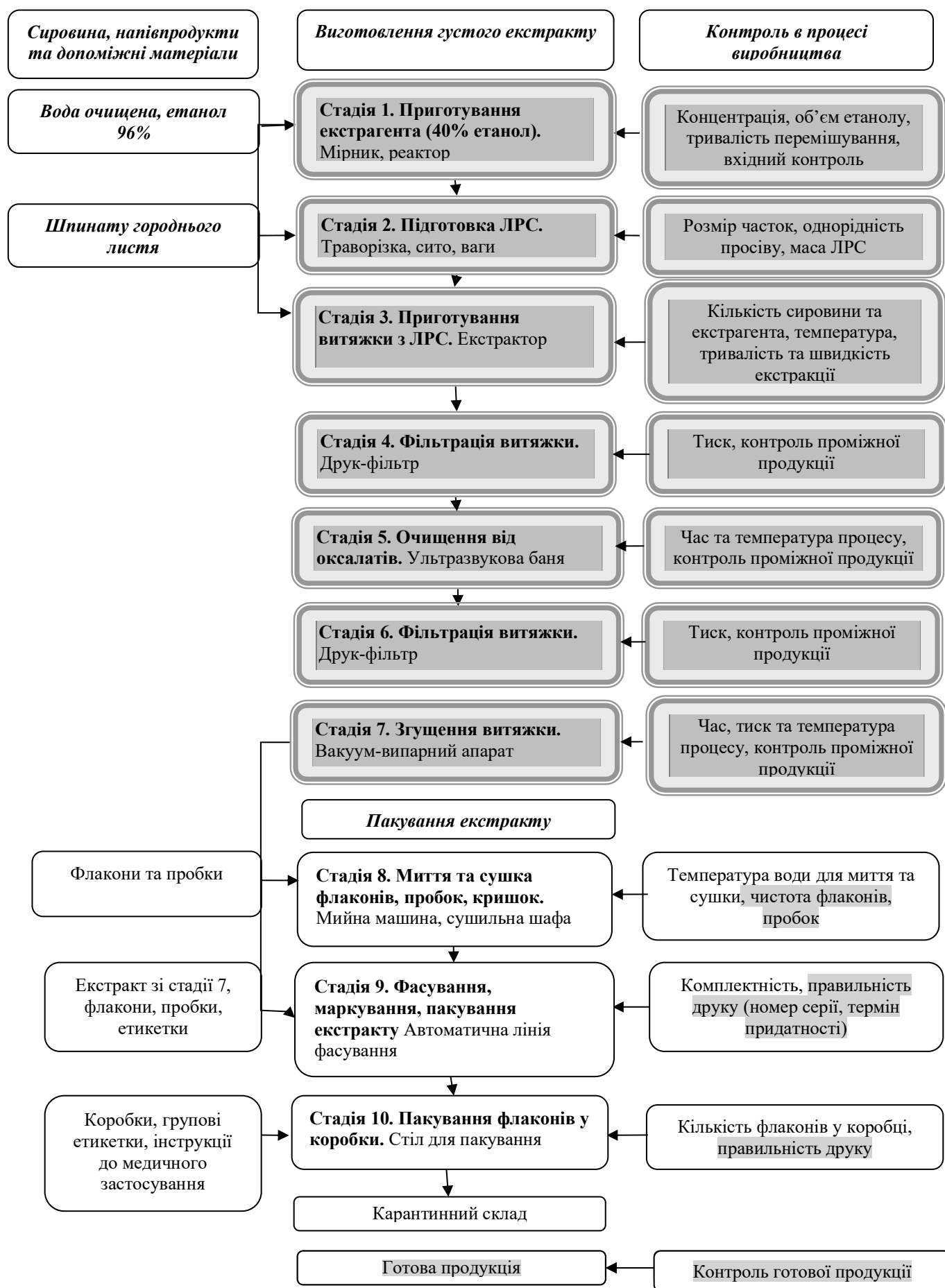


Рис. 4.18 Блок-схема одержання шпинату городнього листя екстракту густого

4.5 Фітохімічне вивчення шпинату городнього листя екстракту густого

Вивчення якісного складу фенольних сполук у шпинату городнього листя екстракті густому проводили методом ПХ та ТШХ у рухомих фазах № 3, 4, 6 та 9 у порівнянні з ФСЗДФУ гідроксикоричних кислот та флавоноїдів. На хроматограмах ці БАР ідентифікували за кольором флуоресценції, інтенсивність якої посилювалась після обробки реактивами Д, Е, Ж, та за відповідністю розташування зон на хроматограмах випробовуваного та стандартного розчинів.

У шпинату городнього листя екстракті густому ідентифіковано хлорогенову, неохлорогенову та кофейну кислоти, рутин, лютеолін, гіперозид та апігенін.

Методом ПХ у рухомих фазах № 1 і 2 та методом ТШХ у рухомій фазі № 3 за жовтим забарвленням зон на синьому фоні у денному світлі після обробки реактивами А, Б та В у порівнянні зі стандартами органічних кислот у шпинату городнього листя екстракті густому ідентифіковано яблучну, лимонну, винну, щавлеву, малонову та аскорбінову кислоти.

Якісний склад амінокислот вивчали методом ПХ у рухомій фазі № 4 та методом ТШХ у рухомій фазі № 5 у порівнянні зі стандартними зразками амінокислот.

Результати аналізу показали, що у шпинаті городнього листя екстракті густому містяться амінокислоти лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин, аргінін, гліцин, фенілаланін, серин, треонін та цистеїн.

Визначення кількісного вмісту щавлевої кислоти у шпинату городнього листя екстракті густому проводили методом перманганатометрії за методикою, повний текст якої наведено у підрозділі 2.3.

Кількісний вміст суми полісахаридів визначали методом гравіметрії за методикою монографії «Алтеї трава»ДФУ 2.0.3 [19]. Вміст поліфенольних сполук, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, амінокислот та суму стероїдних сполук визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за методиками, які наведено у підрозділі 2.3. Результати експерименту наведено у табл. 4.6.

Вміст БАР у шпинату городнього листя екстракті густому ($m = 5$, $P < 0,05$)

БАР	Вміст, %
Сума полісахаридів з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$1,35 \pm 0,04$
Щавлева кислота з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$0,06 \pm 0,01$
Сума вільних амінокислот у перерахунку на лейцин з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$6,96 \pm 0,33$
Сума поліфенольних сполук у перерахунку на пірогалол з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$26,52 \pm 0,66$
Сума гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$3,73 \pm 0,11$
Сума флавоноїдів у перерахунку на рутин з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$8,10 \pm 0,20$
Сума стероїдних сполук у перерахунку з урахуванням втрати в масі при висушуванні	$1,63 \pm 0,04$

Результати експерименту показали, що у шпинаті городнього листя екстракті густому найбільше містилося поліфенольних сполук ($26,52 \pm 0,66$) %. Вміст флавоноїдів ($8,10 \pm 0,20$ %) був у 2,8 рази, суми вільних амінокислот ($6,96 \pm 0,33$ %) – у 3,2 рази менше. Гідроксикоричних кислот містилося майже вдвічі менше, ніж флавоноїдів – ($3,73 \pm 0,11$) %. Вміст суми стероїдних сполук був на мінімальному рівні і становив ($1,63 \pm 0,04$) %. Суми полісахаридів у цьому об'єкті містилося ($1,35 \pm 0,04$) %, щавлевої кислоти – ($0,06 \pm 0,01$) %.

Дослідження фенольних сполук шпинату городнього листя екстракту густого проводили методом ВЕРХ за методикою, повний текст якої викладено у підрозділі 2.3. Хроматограму, одержану при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у шпинату городнього листя екстракті густому методом ВЕРХ, наведено на рис. 4.19. Результати визначення наведено у табл. 4.7.

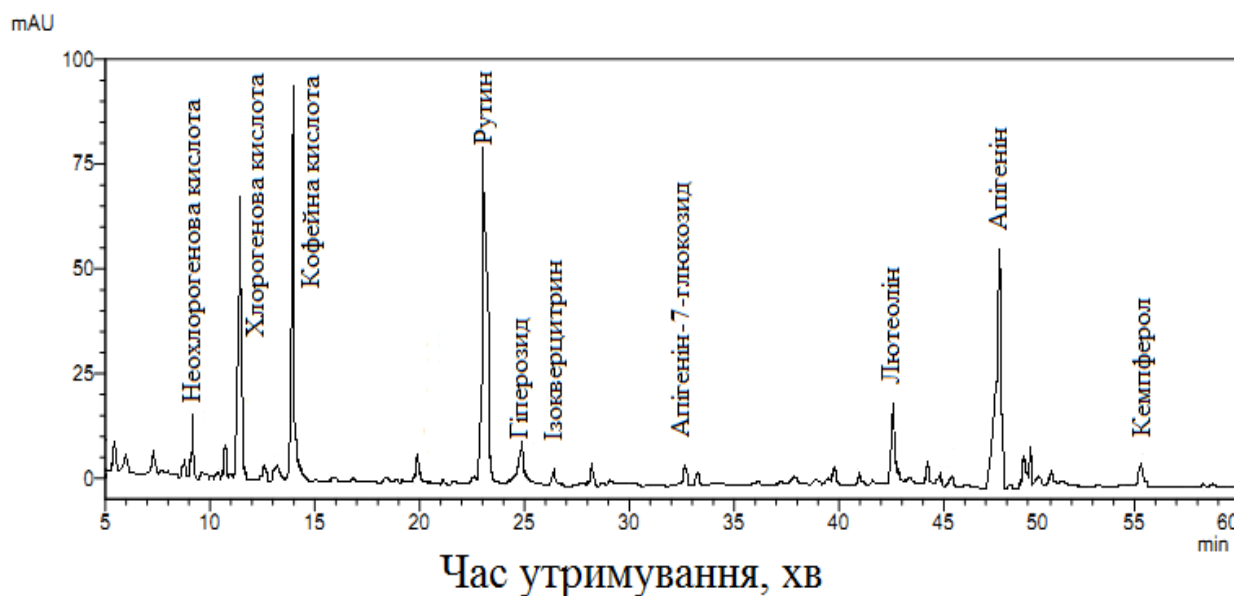


Рис. 4.19 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту фенольних сполук у шпинату городнього листя екстракті густому методом ВЕРХ

Таблиця 4.7

**Якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук у шпинату
городнього листя екстракті густому ($n = 5$, $P < 0,05$)**

Сполука	Час утримування, хв	Вміст, мг/кг
Неохлорогенова кислота	9,25	$27,94 \pm 0,70$
Хлорогенова кислота	11,46	$505,00 \pm 12,63$
Кофейна кислота	13,91	$883,04 \pm 22,08$
Загалом гідроксикоричних кислот	—	$1415,98 \pm 35,40$
Рутин	23,05	$1046,43 \pm 26,16$
Гіперозид	24,71	$115,74 \pm 2,89$
Ізокверцитрин	26,36	$5,97 \pm 0,15$
Апігенін-7-глюкозид	32,88	$8,05 \pm 0,20$
Лютеолін	43,62	$176,37 \pm 4,41$
Апігенін	47,48	$923,46 \pm 23,09$
Кемпферол	55,21	$86,89 \pm 2,17$
Загалом флавоноїдів	—	$2362,91 \pm 59,07$
Загалом фенольних сполук	—	$3778,89 \pm 94,47$

За результатами експерименту в шпинату городнього листя екстракті густому ідентифіковано 10 сполук фенольної природи, серед яких 3 гідроксикоричні кислоти (неохлорогенова, хлорогенова та кофейна кислоти), 3 аглікони (лютеолін, апігенін і кемпферол) та 4 глікозиди (рутин, ізокверцитрин, апігенін-7-глюкозид та гіперозид) флавоноїдів.

За результатами експерименту встановлено, що у шпинату городнього листя екстракті густому містилося ($3778,89 \pm 94,47$) мг/кг фенольних сполук, із яких близько 62 % припадало на флавоноїди ($2362,91 \pm 59,07$ мг/кг). Вміст гідроксикоричних кислот ($1415,98 \pm 35,40$ мг/кг) у досліджуваному об'єкті був майже вдвічі нижчим, у порівнянні з вмістом флавоноїдів.

Серед гідроксикоричних кислот у шпинату городнього листя екстракті густому домінувала кофейна кислота ($883,04 \pm 22,08$ мг/кг). Вміст хлорогенової кислоти був у 1,7 рази нижчий – ($505,00 \pm 12,63$) мг/кг.

Серед флавоноїдів за вмістом переважали рутин ($1046,43 \pm 26,16$ мг/кг) та апігенін ($923,46 \pm 23,09$ мг/кг). Лютеоліну ($176,37 \pm 4,41$ мг/кг) містилося майже у 6 разів менше. Вміст гіперозиду та кемпферолу в шпинату городнього листя екстракті густому був майже однаковий і складав ($115,74 \pm 2,89$ мг/кг) та ($86,89 \pm 2,17$ мг/кг) відповідно. Вміст ізокверцитрину та апігенін-7-глюкозиду не перевищував 10 мг/кг.

Дослідження амінокислотного складу шпинату городнього листя екстракту густого проводили методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії за методикою, яка наведена у розділі 2.3.

Хроматограму, одержану при визначенні кількісного вмісту амінокислот у шпинату городнього листя екстракті густому методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії, наведено на рис. 4.20. Якісний склад та кількісний вміст амінокислот наведено у табл. 4.8.



Рис. 4.20 Хроматограма, одержана при визначенні кількісного вмісту амінокислот у шпинату городнього листя екстракті густому методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії

Таблиця 4.8

Якісний склад та кількісний вміст амінокислот у шпинату городнього листя екстракті густому ($m = 5$, $P < 0,05$)

Кислота	Вміст з урахуванням втрати в масі при висушуванні, мг/кг
Замінні амінокислоти	
ГАМК	$2,15 \pm 0,05$
Аспарагінова кислота	$31,71 \pm 0,79$
Серин	$18,97 \pm 0,47$
Глутамінова кислота	$39,37 \pm 0,98$
Пролін	$24,12 \pm 0,60$
Гліцин	$19,22 \pm 0,48$
Аланін	$17,78 \pm 0,44$
Цистеїн	$6,55 \pm 0,16$
Тирозин	$13,28 \pm 0,33$
Сума замінних	$173,15 \pm 4,33$
Незамінні амінокислоти	
Лізин	$23,96 \pm 0,60$
Гістидин	$6,07 \pm 0,15$
Аргінін	$17,82 \pm 0,45$
Треонін	$14,09 \pm 0,35$
Валін	$21,05 \pm 0,53$
Метіонін	$3,97 \pm 0,10$
Ізолейцин	$6,14 \pm 0,15$
Лейцин	$28,41 \pm 0,71$
Фенілаланін	$13,49 \pm 0,34$
Сума незамінних	$135,00 \pm 3,38$
Сума ідентифікованих	$308,15 \pm 7,70$

За результатами експерименту в шпинаті городнього листя екстракті густому ідентифіковано 18 амінокислот, із яких 9 належать до незамінних амінокислот. Загальний вміст суми амінокислот у шпинату городнього листя екстракті густому становив $(308,15 \pm 7,70 \text{ мг/кг})$ амінокислот. Вміст замінних і незамінних амінокислот був майже на одному рівні та складав $(173,15 \pm 4,33)$ та $(135,00 \pm 3,38)$ мг/кг відповідно.

Домінуючими амінокислотами в шпинаті городнього листя екстракті густому були аспарагінова $(31,71 \pm 0,79 \text{ мг/кг})$ та глютамінова $(39,37 \pm 0,98 \text{ мг/кг})$ кислоти. Серед незамінних амінокислот превалював лейцин $(28,41 \pm 0,71 \text{ мг/кг})$, на вміст якого припадало близько 21 % від суми незамінних амінокислот. Дещо менше в досліджуваному об'єкті було лізину $(23,96 \pm 0,60 \text{ мг/кг})$ та валіну $(21,05 \pm 0,53 \text{ мг/кг})$. Аргініну $(17,82 \pm 0,45 \text{ мг/кг})$ у шпинаті городнього листя екстракті густому містилося у 1,6 рази, треоніну $(14,09 \pm 0,35 \text{ мг/кг})$ та фенілаланіну $(13,49 \pm 0,34 \text{ мг/кг})$ – майже вдвічі менше, ніж лейцину. Вміст гістидину, метіоніну та ізолейцину не перевищував 7 мг/кг.

Вміст мінеральних елементів у шпинаті городнього листя екстракті густому визначали методом ААС за методикою, яка наведена у підрозділі 2.3.

За результатами експерименту у досліджуваному об'єкті було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 19 мінеральних елементів. Результати дослідження наведено в табл. 4.9.

Результати дослідження показали, що вміст мінеральних елементів у шпинаті городнього листя екстракті густому становив $(14170,92 \pm 354,37)$ мкг/100 г. Серед макроелементів переважали калій $(7720,00 \pm 193,00 \text{ мкг/100 г})$, кальцій $(3259,00 \pm 81,48 \text{ мкг/100 г})$ та натрій $(1391,00 \pm 34,78 \text{ мкг/100 г})$. Превалюючими мікроелементами були ферум та цинк, вміст яких становив $(29,60 \pm 0,74)$ та $(14,79 \pm 0,37)$ мкг/100 г відповідно. Вміст важких металів знаходився в межах норм, встановлених ДФУ [20].

Мінеральний склад шпинату городнього листя екстракту густого
(m = 5, P < 0,05)

Елемент	Вміст з урахуванням втрати в масі при висушуванні, мкг/100 г
Макроелементи	
Силіцій	461,00 ± 11,53
Фосфор	507,00 ± 12,68
Магній	769,00 ± 19,22
Кальцій	3259,00 ± 81,48
Натрій	1391,00 ± 34,78
Калій	7720,00 ± 193,00
Загалом макроелементів	14107,00 ± 352,67
Мікроелементи	
Ферум	29,60 ± 0,74
Алюміній	10,34 ± 0,36
Манган	3,71 ± 0,09
Нікол	0,13 ± 0,01
Молібден	0,15 ± 0,01
Купрум	3,10 ± 0,08
Цинк	14,79 ± 0,37
Стронцій	2,10 ± 0,05
Загалом мікроелементів	63,92 ± 1,70
Сума мінеральних елементів	14170,92 ± 354,37
Вміст токсичних елементів	
Плюмбум	< 0,03
Кобальт	< 0,03
Кадмій	< 0,01
Арсен	< 0,01
Меркурій	< 0,01

4.6 Стандартизація шпинату городнього листя екстракту густого

ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО ЛИСТЯ ЕКСТРАКТ ГУСТИЙ

Spinaciae oleraceae foliorum extractum spissum

Густа, в'язка маса зелено-бурого кольору зі специфічним запахом.

Вміст:

- *поліфеноли*: не менше 20,0 % у перерахунку на пірогалол ($C_6H_6O_3$; М.м. 126,10) з урахуванням втрати в масі при висушуванні;
- *гідроксикоричні кислоти*: не менше 3,5 % у перерахунку на хлорогенову кислоту ($C_{16}H_{18}O_9$; М.м. 354,30) з урахуванням втрати в масі при висушуванні;
- *флавоноїди*: не менше 7,0 % у перерахунку на рутин ($C_{27}H_{30}O_{16}$; М.м. 611,0) з урахуванням втрати в масі при висушуванні;
- *щавлева кислота*: не більше 0,1 % ($C_2H_2O_4$; М.м. 126,1) з урахуванням втрати в масі при висушуванні.

ВИРОБНИЦТВО

Для виготовлення густого екстракту використовують 1 частину сировини та 5 частин *етанолу* (40 %, об/об) Р. Екстракт готують методом дробної мацерації при температурі близько 60°C з подальшим згущенням витяжки під зниженим тиском.

ВИПРОБУВАННЯ

Втрата в масі при висушуванні. Не більше 25,0 %. Визначення проводять за методикою загальної статті «Визначення втрати в масі при висушуванні екстрактів» ДФУ 2.0.1 [20].

Загальна зола. Не більше 22,0 %. Визначення проводять за методикою загальної статті «Загальна зола» ДФУ 2.0.1 [20].

Вміст важких металів. Не більше 0,01 %. Визначення проводять за методикою загальної статті «Важкі метали» ДФУ 2.0.1 [20].

Мікробіологічна чистота. В 1 г екстракту допускається наявність не більше 1000 бактерій і 100 дріжджових та пліснявих грибів (у сумі). Не допускається наявність бактерій *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*, бактерій роду *Salmonella*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

С. Тонкошарова хроматографія.

Ідентифікацію С проводять за методикою монографії «Бузини квітки» ДФУ 2.0.3 [19].

Випробовуваний розчин. 0,2 г розчиняють у 5 мл метанолу Р з використанням ультразвуку та подальшим центрифугуванням протягом 5 хв.

Розчин порівняння. 1,0 мг кофейної кислоти Р, 1,0 мг хлорогенової кислоти Р, 2,0 мг апігеніну Р та 2,0 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластика: ТШХ пластика із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р – вода Р – метанол Р – етилацетат Р (2,5 : 4 : 4 : 50).

Об'єм проб: 5 мкл, смугами 8 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: нагрівають протягом 5 хв при температурі 100-105°C, обробляють розчином 1 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р в етилацетаті Р, потім розчином 5 г/л макрогелю 400 Р у метиленхлориді Р і висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі зони мають проявлятися у такій послідовності:

Верхня частина пластинки	
кофейна кислота: синя флуоресцентна зона	синя флуоресцентна зона
апигенин: жовто-зелена флуоресцентна зона	жовто-зелена флуоресцентна зона
хлорогенова кислота: блакитна флуоресцентна зона	блакитна флуоресцентна зона

рутин: жовто-коричнева флуоресцентна зона	жовто-коричнева флуоресцентна зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

У верхній частині хроматограми випробовуваного розчину в УФ-світлі має проявлятися синя флуоресцентна зона, яка за кольором флуоресценції та розташуванням відповідає зоні кофейної кислоти на хроматограмі розчину порівняння. У середній частині хроматограми одна під одною мають проявлятися зони із жовто-зеленою та блакитною флуоресценцією, які відповідають зонам апігеніну та хлорогенової кислоти. У нижній частині хроматограми має проявлятися зона, що флуоресцює жовто-коричневим кольором (рутин). ТШХ хроматограма фенольних сполук випробовуваного розчину шпинату городнього листя екстракту густого та розчину порівняння в УФ-світлі зображено на рис. 4.21.



Рис. 4.21 ТШХ хроматограма фенольних сполук випробовуваного розчину шпинату городнього листя екстракту густого (1) та розчину порівняння (2) в УФ-світлі у рухомій фазі *мурашина кислота безводна P* – *вода P* – *метанол P* – *етилацетат P* (2,5 : 4 : 4 : 50) при проявленні розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру *P* у метанолі *P* та розчином 50 г/л макрогону 400 *P* у метанолі *P*

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Сума поліфенольних сполук. Кількісне визначення суми фенольних сполук проводиться за методикою загальної статті «Визначення танінів у лікарських засобах рослинного походження» ДФУ 2.0.1 [20]. Для проведення аналізу наважку 0,2 г шпинату городнього листя екстракту густого розчиняють 10 мл *етанолу P* (40 %, об/об) та доводять розчин до позначки цим же розчинником у мірній колбі місткістю 25,0 мл

Сума поліфенолів. 5,0 мл фільтрату поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл і доводять до позначки *водою P*. Суміш 2,0 мл одержаного розчину, 1,0 мл *фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву P* і 10,0 мл *води P* доводять розчином 290 г/л *натрію карбонату P* до об'єму 25,0 мл. Оптичну густину

одержаного розчину вимірюють через 30 хв за довжини хвилі 760 нм. Як компенсаційний розчин використовують *воду Р*.

Стандартний розчин. Для приготування стандартного розчину безпосередньо перед вимірюванням 50,0 мг (точна наважка) *пірогалолу Р* розчиняють у *воді Р* і доводять до 100,0 мл тим самим розчинником.

Вміст суми поліфенольних сполук (X, %), у перерахунку на *пірогалол* з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{62,5 \times A_1 \times m_0}{A_0 \times m_1}, \quad (4.5)$$

де A_0 – оптична густина стандартного розчину за довжини хвилі 760 нм;

A_1 – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 760 нм;

m_1 – маса наважки сировини, г;

m_2 – маса *пірогалолу*, г.

Спектр поглинання 40 % етанольного розчину шпинату городнього листя екстракту густого з *фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом Р* у видимій ділянці світла в діапазоні 400-800 нм наведено на рис. 4.22.



Рис. 4.22 Спектр поглинання у видимій ділянці світла 40 % етанольного розчину шпинату городнього листя екстракту густого з *фосфорно-молібденово-вольфрамовим реактивом Р* в діапазоні 400-800 нм

Вміст суми поліфенольних сполук у шпинату городнього листя екстракті густому має бути не менше 20,0 %

Сума гідроксикоричних кислот. Визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот проводять за методикою монографії «Кропиви листя» ДФУ 2.0.3 [19].

Випробовуваний розчин (а). 0,2 г шпинату городнього листя екстракту густого розчиняють у 10 мл *етанолу Р* (40 %, об/об) і доводять об'єм розчину до позначки тим же розчинником у мірній колбі на 25,0 мл.

Випробовуваний розчин (b). До 1,0 мл випробовуваного розчину (а) додають 2,0 мл 0,5 М розчину *хлористоводневої кислоти* та розчину, який готують шляхом розчинення 10 г *натрію нітриту Р* і 10 г *натрію молібдату Р* у 100 мл *води Р*, потім додають 2,0 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до 10,0 мл.

Оптичну густину випробовуваного розчину вимірюють за довжини хвилі 525 нм. Як компенсаційний розчин використовують розчин, який складається з 1,0 мл випробовуваного розчину, 2,0 мл 0,5 М розчину *хлористоводневої кислоти*, 2,0 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р* доведених *водою Р* у мірній колбі до 10,0 мл.

Вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на *хлорогенову кислоту* (Х, %) з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \times 5,3}{m}, \quad (4.6)$$

де А – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм;

m – маса наважки сировини, г.

Використовують питомий показник поглинання *хлорогенової кислоти*, який становить 188.

Спектр поглинання 40 % етанольного розчину шпинату городнього листя екстракту густого з *натрію нітритом Р* і *натрію молібдатом Р* у видимій ділянці світла в діапазоні 450-600 нм наведено на рис. 4.23.

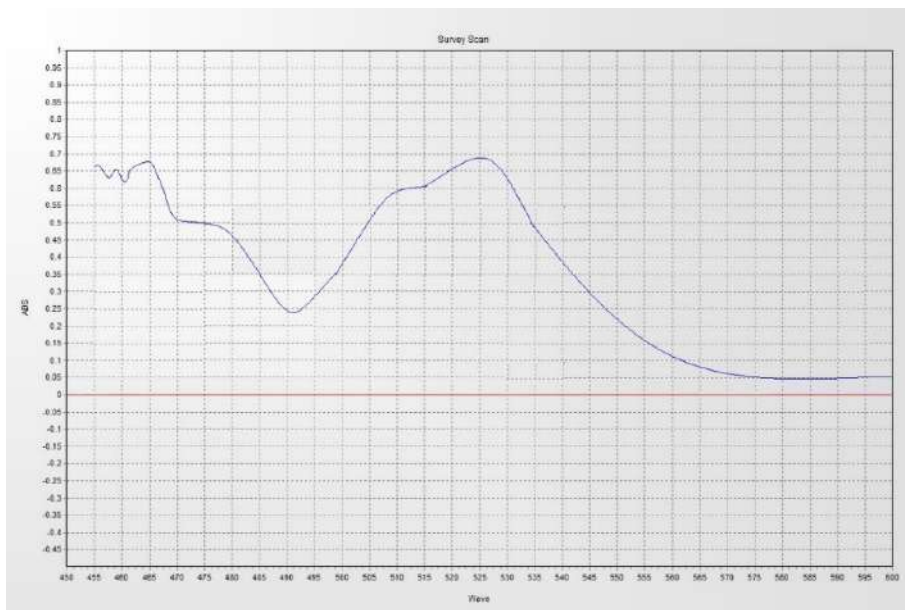


Рис. 4.23 Спектр поглинання у видимій ділянці світла 40 % етанольного розчину шпинату городнього листя екстракту густого з *натрію нітритом P* і *натрію молібдатом P* в діапазоні 450-600 нм

Вміст гідроксикоричних кислот у шпинату городнього листя екстракту густому повинен бути не менше 3,5 %.

Сума флавоноїдів. Дослідження проводять за методикою монографії «Софори бутони» ДФУ 2.1 [21].

Вихідний розчин. 0,2 г шпинату городнього листя екстракту густого розчиняють у 10 мл *етанолу P* (40 %, об/об) і доводять об'єм розчину до позначки тим же розчинником у мірній колбі на 25,0 мл.

Випробовуваний розчин. 10,0 мл вихідного розчину доводять розчином 20 г/л *алюмінію хлориду P* у *метанолі P* до об'єму 100,0 мл.

Компенсаційний розчин. 10,0 мл вихідного розчину доводять *метанолом P* до об'єму 100,0 мл.

Оптичну густину випробовуваного та компенсаційного розчинів вимірюють за довжини хвилі 410 нм через 15 хвилин після приготування.

Вміст флавоноїдів (X, %), у перерахунку на *рутин* з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \times 1000}{m \times 37}, \quad (4.7)$$

де A – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм;

m – маса наважки сировини, г.

Використовують питомий показник поглинання рутину, який дорівнює 370.

Спектр поглинання 40 % етанольного розчину шпинату городнього листя екстракту густого з *алюмінію хлоридом Р* в УФ та видимій ділянці світла в діапазоні 350-450 нм наведено на рис. 4.24.

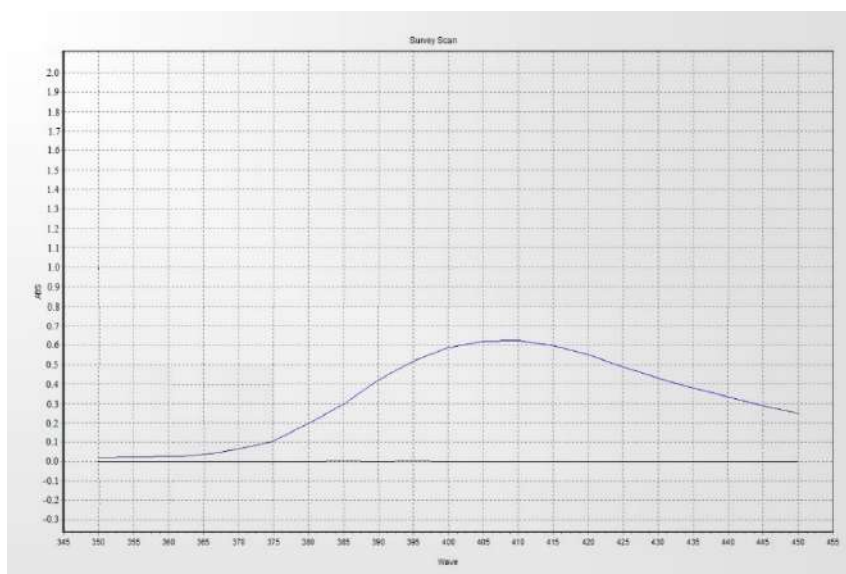


Рис. 4.24 Спектр поглинання в УФ та видимій ділянці світла 40 % етанольного розчину шпинату городнього листя екстракту густого з *алюмінію хлоридом Р* в УФ-світлі в діапазоні 350-450 нм

Вміст суми флавоноїдів у шпинату городнього листя екстракті густому має бути не менше 7,0 %.

Щавлева кислота. Визначення кількісного вмісту вільної та зв'язаної щавлевої кислоти проводили методом перманганатометрії [2].

Близько 1,0 г (точна наважка) шпинату городнього листя екстракту густого розчиняють у 5 мл 10 % сірчаної кислоти та невеликій кількості 96 % етанолу. Потім до суміші додають 250 мл води, струшують і залишають на декілька годин. Вміст колби відфільтровують. До 50,0 мл фільтрату додають аміак до тих пір, поки рН розчину не перевищить 7,0. Для запобігання осадження винної кислоти

та її ізомерів до розчину додають 1,0 г борної кислоти.

До утвореної суміші додають 10,0 мл реактиву для осадження щавлевої кислоти, який складається з рівних об'ємів 5,0 % розчину кальцію хлориду в 50 % оцтовій кислоті та 1 % розчином натрію ацетату, і залишають на 48 год при температурі не вище 7°C. Осад кальцію оксалату, що утворився, відфільтровують і промивають водою до негативної реакції з 1 % розчином аргентуму нітрату.

Осад кальцію оксалату змивають з фільтру водою, додають гарячу 10 % сірчану кислоту через той же фільтр, щоб розчинити сліди оксалатів. Колбу з вмістом нагрівають до повного розчинення осаду, фільтр промивають гарячою водою.

Розчин титрують 0,1 н розчином калію перманганату до появи рожевого забарвлення. Вміст щавлевої кислоти (X, %) з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V_{\text{KMnO}_4} \times T_{\text{KMnO}_4} \times 500 \times 100}{m \times 37 \times (100 - W)}, \quad (4.8)$$

де V_{KMnO_4} – об'єм калію перманганату, що пішов на титрування;

T_{KMnO_4} – титр калію перманганату за щавлевою кислотою;

m – маса наважки, г;

W – втрата в масі при висушуванні, %.

Вміст щавлевої кислоти не повинен перевищувати 0,1 %.

Для стандартизації шпинату городнього листя екстракту густого брали 5 серій екстракту. Усі досліджувані зразки відповідали поставленим вимогам за органолептичними показниками, числовими показниками, якісним складом та кількісним вмістом фенольних сполук та щавлевої кислоти. Параметри стандартизації шпинату городнього листя екстракту густого за вимогами ДФУ наведено в табл. 4.10.

Таблиця 4.10

Параметри стандартизації шпинату городнього листа екстракту густого

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю	Досліджувані серії екстракту				
			112017	042018	102018	052019	022020
1	2	3	4	5	6	7	8
Виробництво							
Спосіб одержання	Для виготовлення густого екстракту використовують 1 частину сировини та 5 частин етанолу (40%, об/об) Р. Екстракт готують методом дрібної мацерації при температурі близько 60°C та згущують витяжку під зниженим тиском	МКЯ п. 1	Відповідає	-/-	-/-	-/-	-/-
Ідентифікація							
А. Органолептичні показники	Густа, в'язка маса зелено-бурого кольору зі специфічним запахом.	МКЯ п. 2.1	Відповідає	-/-	-/-	-/-	-/-
С. Фенольні сполуки	ТІХ у порівнянні з <i>ФСЗ кофейної кислоти Р, апігеніну Р, хлорогенової кислоти Р, рутину Р</i> . Рухома фаза: <i>мурашина кислота безводна Р – вода Р – метанол Р – етилацетат Р (2,5 : 4 : 4 : 50)</i> . В УФ-світлі після обробки розчином 1 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р в етилацетаті Р, розчином 5 г/л макрогону 400 Р у метиленхлориді Р у верхній частині хроматограми має проявлятися зона із яскраво-синьою флуоресценцією (кофейна кислота), У середній частині хроматограми – одна під одною зони апігеніну зелено-жовтого кольору та хлорогенової кислоти із блакитною флуоресценцією. У нижній частині хроматограми – зона, що флуоресціює жовто-коричневим кольором (рутин).	ДФУ 2.0.3, «Бузини квітки» МКЯ п.2.2	Відповідає	-/-	-/-	-/-	-/-

Продовж. табл. 4.10

1	2	3	4	5	6	7	8
Числові показники							
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 25,0 %	ДФУ 2.0.1, 2.8.17 2.2.3 2 МКЯ п.3.	22,14	21,32	22,51	20,77	19,48
Зола загальна	Не більше 22,0 %	ДФУ 2.0.1, 2.4.16 МКЯ п.3.	17,53	15,20	21,14	19,78	18,61
Важкі метали	Не більше 0,01 %	ДФУ 2.0.1, п. 2.4.8 МКЯ п.3.	Відповідає	-//-	-//-	-//-	-//-
Мікробіологічна чистота	В 1 г екстракту допускається наявність не більше 1000 бактерій і 100 дріжджових та пліснявих грибів (у сумі). Не допускається наявність бактерій <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> та <i>Staphylococcus aureus</i> , бактерій роду <i>Salmonella</i> .	ДФУ 2.0.1, 5.1.4 МКЯ п.3.	Відповідає	-//-	-//-	-//-	-//-
Кількісне визначення							
Сума поліфенольних сполук	Не менше 20,0%	ДФУ 2.0.1, 2.8.14 МКЯ п. 4	22,43	21,20	23,67	24,25	20,64
Сума гідроксикоричних кислот	Не менше 3,5 %	ДФУ 2.0.3, «Кропиви листя» МКЯ п. 4	2,85	2,63	2,91	2,76	2,70
Сума флавоноїдів	Не менше 7,0 %	ДФУ 2.1, «Софори бутони» МКЯ п. 4	7,55	8,12	8,37	9,03	7,42
Вміст щавлевої кислоти	Не більше 0,1 %	МКЯ п. 4	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05

4.7 Обговорення фармакологічної активності шпинату городнього листа екстракту густого

Дослідження антибактеріальної активності

За даними літератури, більшість патологій печінки супроводжується приєднанням бактеріальної інфекції, що значно сповільнює процес одужання [4, 54, 61]. При цьому, відомий факт, що антиоксидантні препарати підвищують ефективність антибактеріальної терапії [54, 61]. Тому доцільним було вивчення протимікробної активності одержаного екстракту.

Антибактеріальну та протигрибкову активність шпинату городнього листа екстракту густого визначали *in vitro* методом дифузії в агар у модифікації «колодязів» за методикою, яка наведена у підрозділі 2.5. Результати дослідження наведено у табл. 4.11.

Таблиця 4.11

Протимікробна активність шпинату городнього листа екстракту густого ($m = 5$, $P < 0,05$)

Мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту, мм	
	Шпинату городнього листа екстракт густий	Хлорофіліпт
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$25,33 \pm 1,22$	$19,00 \pm 0,84$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$17,00 \pm 0,80$	$14,00 \pm 0,60$
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	$15,00 \pm 0,71$	Ріст
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$18,00 \pm 0,83$	$21,00 \pm 0,95$
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	$21,00 \pm 1,02$	Ріст
<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653	$17,00 \pm 0,80$	$15,00 \pm 0,58$

Результати показали, що *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans* були чутливими до дії шпинату городнього листа екстракту густого, що було на рівні або перевищувало показники препарату порівняння Хлорофіліпту. *Staphylococcus aureus* був високочутливим до дії даного лікарського засобу. Зона затримки росту цього мікроорганізму при дії шпинату городнього листа екстракту густого становила ($25,33 \pm 1,22$) мм.

Визначення антирадикальної активності

Здатність до блокування вільнорадикальних ланцюгових реакцій

скавендежерами є визначальною для розуміння їх антиоксидантних властивостей [77]. Антирадикальну активність шпинату городнього листа екстракту густого визначали *in vitro* методом абсорбційної спектрофотометрії у еквіваленті хлорогенової кислоти за реакцією зі стабільним радикалом DPPH·, за методикою, яка викладена у підрозділі 2.5.

За результатами встановлено, що антирадикальна активність шпинату городнього листа екстракту густого у еквіваленті хлорогенової кислоти становила 8,31 мг/г.

Дослідження гепатопротекторної активності

При вживанні щурами шпинату городнього листа екстракту сухого у дозі 5000 мг/кг суттєвих змін у поведінці, фізіологічних та біохімічних показниках піддослідних тварин протягом 14 діб виявлено не було, що дозволило віднести цей лікарський засіб до V групи токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова [45, 51, 58].

Попередньо встановлено, що мінімально ефективною дозою шпинату городнього листа екстракту густого була доза 150 мг/кг [39, 51].

Одним із пускових механізмів ураження клітин організму токсичними речовинами є посилення активності вільнорадикальних процесів. Тетрахлорметан провокує інтоксикацію організму, що призводить до виникнення оксидативного стресу. Вважають, що основним біохімічним механізмом активації окиснювальних процесів під час ушкодження організму тетрахлорметаном є утворення вільнорадикальних продуктів та активних форм кисню, які стимулюють реакції переокисної модифікації біомолекул – ліпідів, білків та нуклеїнових кислот [43, 129].

За даними літератури, антиоксидантна система організму контролює всі ланки протікання вільнорадикальних реакцій, гальмуючи ініціацію перекисного окиснення ліпідів та безпосередньо утворенням гідропероксидів та інших шкідливих продуктів їх перебігу. Стан динамічної рівноваги про- й антиоксидантної систем підтримується певною організацією плазмових і клітинних ліпідів, мембранних фосфоліпідів і холестеролу, які визначають ліпідний рівень окиснення клітинних мембран. Порушення цього балансу потенційно може викликати оксидативний стрес [43, 129].

Після введення в організм щурів токсину, протягом усього експерименту у сироватці крові та печінці піддослідних тварин прогресуюче підвищувався вміст

ТБК-АП (табл. 4.12).

Таблиця 4.12

**Вміст ТБК-АП у сироватці крові та печінці щурів, уражених
тетрахлорметаном, до та після застосування корегувальних чинників
($M \pm m$; $n = 6$)**

Групи тварин	Терміни дослідження, діб		
	4	7	10
Сироватка крові, мкмоль/л			
Інтактний контроль	1,60 ± 0,08		
Уражені тетрахлорметаном	2,50 ± 0,08*	2,89 ± 0,14*	3,00 ± 0,06*
Уражені тетрахлорметаном з корекцією шпинату городнього листя екстрактом густим 150 мг/ кг	2,25 ± 0,006	2,08 ± 0,07**	1,92 ± 0,08**
Уражені тетрахлорметаном з корекцією силімарином 100 мг/кг	2,15 ± 0,09**	2,01 ± 0,06**	1,79 ± 0,06**
Печінка, мкмоль/кг			
Інтактний контроль	22,11 ± 0,84		
Уражені тетрахлорметаном	41,66 ± 1,36*	48,82 ± 1,03*	50,10 ± 1,54*
Уражені тетрахлорметаном з корекцією шпинату городнього листя екстрактом густим 150 мг/ кг	37,17 ± 1,08	28,09 ± 1,40**	27,13 ± 0,71**
Уражені тетрахлорметаном з корекцією силімарином 100 мг/кг	30,23 ± 0,75**	24,25 ± 1,01**	22,96 ± 0,75**

Примітки:

1. * – вірогідні зміни між щурами інтактного контролю та щурами, ураженими тетрахлорметаном;

2. ** – вірогідні зміни між ураженими щурами та щурами, які піддавались корекції.

До закінчення експерименту вміст ТБК-АП у сироватці крові щурів перевищував цей показник інтактних тварин майже вдвічі, у печінці – у 2,4 рази, що підтверджує гепатотропність обраного токсину. При лікуванні силімарином спостерігали вірогідне зниження вмісту ТБК-АП у сироватці крові та печінці щурів протягом всього періоду дослідження. Шпинату городнього листя екстракт густий проявляв ефективний вплив на цей показник на 7-у та 10-ту доби експерименту і вірогідно знижував його майже до рівня інтактного контролю у крові на 67 % та печінці на 104 % по відношенню до уражених тетрахлорметаном щурів.

Одержані дані свідчать, що інтоксикація тетрахлорметаном активує окиснювальні процеси, у тому числі ліпопероксидації, що проявляється збільшенням у досліджуваних тканинах проміжних ТБК-активних продуктів.

Після ураження тетрахлорметаном спостерігали збільшення основних та нейтральних продуктів окиснювальної модифікації протеїнів 2,4-ДНФГ у сироватці крові. Впродовж всього експерименту вміст цих сполук практично не змінювався, а до кінця експерименту він зріс майже вдвічі у порівнянні з інтактним контролем. Рівень 2,4-ДНФГ нейтрального характеру у печінці піддослідних тварин прогресуюче зростає і по закінченні експерименту перевищував норму на 144 %, що простежується за даними табл. 4.13.

Таблиця 4.13

**Вміст 2,4-динітрофенілгідразонів у сироватці крові та печінці щурів,
уражених тетрахлорметаном, до та після застосування корегувальних
чинників ($M \pm m$; $n = 6$)**

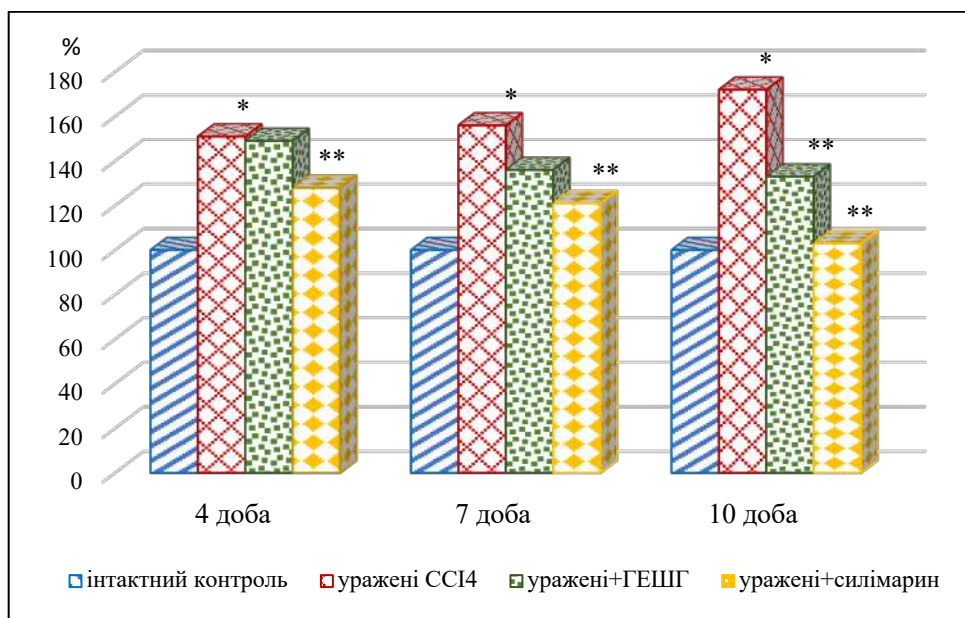
Групи тварин	Терміни дослідження, діб		
	4	7	10
Сироватка крові, мкмоль/г протеїну			
Інтактний контроль	0,44 $\pm$ 0,03		
Уражені тетрахлорметаном	0,82 $\pm$ 0,02*	0,83 $\pm$ 0,02*	0,86 $\pm$ 0,02*
Уражені тетрахлорметаном з корекцією шпинату городнього листя екстрактом густим 150 мг/ кг	0,74 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,02**	0,67 $\pm$ 0,02**
Уражені тетрахлорметаном з корекцією силімарином 100 мг/кг	0,73 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,01**	0,58 $\pm$ 0,01**
Печінка, мкмоль/г протеїну			
Інтактний контроль	0,59 $\pm$ 0,01		
Уражені тетрахлорметаном	0,75 $\pm$ 0,02*	0,80 $\pm$ 0,02*	0,85 $\pm$ 0,007*
Уражені тетрахлорметаном з корекцією шпинату городнього листя екстрактом густим 150 мг/ кг	0,71 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,01**
Уражені тетрахлорметаном з корекцією силімарином 100 мг/кг	0,66 $\pm$ 0,01**	0,69 $\pm$ 0,02**	0,62 $\pm$ 0,01**

Примітки:

1. * – вірогідні зміни між щурами інтактного контролю та щурами, ураженими тетрахлорметаном;

2. ** – вірогідні зміни між ураженими щурами та щурами, які піддавались корекції.

При застосуванні силімарину концентрація 2,4-ДНФГ у крові щурів поступово знижувалась протягом всього експерименту і майже досягла рівня інтактного контролю. Лікування шпинату городнього листа екстрактом густим вірогідно знижувало значення цих показників лише на 10 добу експерименту. Ефективність дії досліджуваного екстракту, дещо поступалася за цими показниками силімарину. Така закономірність простежувалась і при дослідженні динаміки вмісту 2,4-ДНФГ(430) основного характеру у сироватці крові й печінці тварин (рис. 4.25). У печінці щурів, уражених тетрахлорметаном, вміст 2,4-ДНФГ(430) прогресуюче збільшувався, досягши максимуму на 10 день дослідження. У цей термін ефективність застосування екстракту зі шпинату та силімарину виявилась майже на одному рівні щодо даного показника.



Примітки:

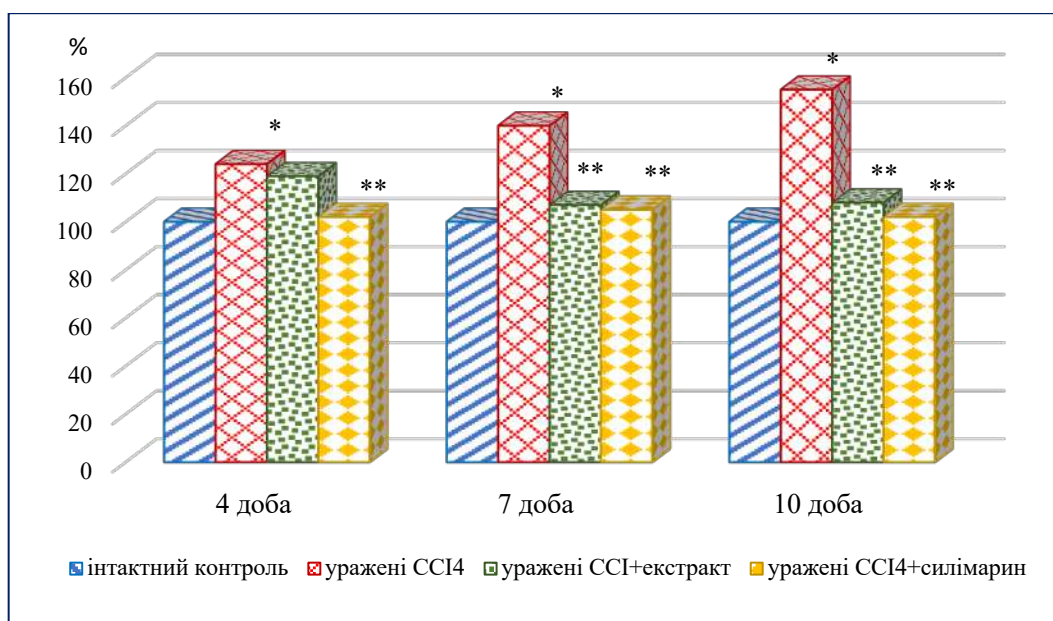
1. * – вірогідні зміни між щурами інтактного контролю та щурами, ураженими тетрахлорметаном;
2. ** – вірогідні зміни між ураженими щурами та щурами, які піддавались корекції.

Рис. 4.25 Вміст 2,4-динітрофенілгідразону (430) основного характеру в сироватці крові щурів, уражених тетрахлорметаном, до та після застосування коригувальних чинників

Ураження печінки тетрахлоретаном спровокувало процеси модифікації протеїнових молекул, що сприяло накопиченню їх альдегідо- та кетопохідних у сироватці крові та органах піддослідних тварин. Застосовані коригувальні чинники проявили ефективний вплив на процеси ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів, що підтверджує їх антиоксидантні властивості.

Церулоплазмін (ЦП) – купрумвмісний протеїн α -глобулінової фракції сироватки крові. Він вважається одним із основних антиоксидантних ферментів. Його характерною особливістю є висока стабільність до токсичного впливу активних форм кисню, що дозволяє йому зберігати біологічну активність за умов їх інтенсивної генерації [43, 129].

Результати показали, що за час тривалості експерименту вміст ЦП у сироватці крові щурів прогресуюче зростає (рис. 4.26).



Примітки:

1. * – вірогідні зміни між щурами інтактного контролю та щурами, ураженими тетрахлорметаном;
2. ** – вірогідні зміни між ураженими щурами та щурами, які піддавались корекції.

Рис. 4.26 Вміст церулоплазміну у сироватці крові щурів, уражених тетрахлорметаном, та після застосування коригувальних чинників

До кінця експерименту вміст цього протеїну в крові піддослідних тварин перевищував рівень інтактного контролю на 55 %. На початковому етапі дослідження (4 доба) вміст ЦП у сироватці крові вірогідно знижував лише силімарин. Суттєвий вплив на вміст цього ферменту шпинату городнього листа екстракт густий проявляв лише починаючи з 7 доби з моменту розвитку токсичного гепатиту і до закінчення експерименту досяг показників референтного препарату.

Зниження активності ферменту каталази (КТ) сприяє накопиченню токсину пероксиду гідрогену, який є продуктом дисмутації супероксидного аніонного радикалу. Стрімкий ріст вмісту цієї сполуки у крові та печінці свідчить про виснаження захисних антиоксидантних механізмів в організмі й призводить до ушкодження молекул ензимів продуктами перекисного окиснення. Однією з причин зниження активності КТ може бути тривала дія токсину, що призводить до деградації вільних та зв'язаних з мембранами ендоплазматичної сітки рибосом, які відповідають за синтез даного ферменту [43, 129].

Результати визначення каталазної активності у крові та печінці піддослідних тварин наведено в табл. 4.14.

Таблиця 4.14

**Каталазна активність у сироватці крові та печінці щурів, уражених
тетрахлорметаном, до та після застосування коригувальних чинників
($M \pm m$; $n = 6$)**

Групи тварин	Терміни дослідження, діб		
	4	7	10
1	2	3	4
Сироватка крові, мкат/г протеїну			
Інтактний контроль	0,23 $\pm$ 0,007		
Уражені тетрахлорметаном	0,15 $\pm$ 0,006*	0,13 $\pm$ 0,006*	0,14 $\pm$ 0,007*
Уражені тетрахлорметаном з корекцією шпинату городнього листа екстрактом густим 150 мг/кг	0,17 $\pm$ 0,009	0,21 $\pm$ 0,006**	0,22 $\pm$ 0,005**
Уражені тетрахлорметаном з корекцією силімарином 100 мг/кг	0,21 $\pm$ 0,007**	0,22 $\pm$ 0,008**	0,23 $\pm$ 0,004**
Печінка, мкат/г протеїну			
Інтактний контроль	0,32 $\pm$ 0,01		
Уражені тетрахлорметаном	0,24 $\pm$ 0,006*	0,21 $\pm$ 0,009*	0,21 $\pm$ 0,008*

Продовж. табл. 4.14

1	2	3	4
Уражені тетрахлорметаном з корекцією шпинату городнього листя екстрактом густим 150 мг/ кг	$0,25 \pm 0,007$	$0,23 \pm 0,009$	$0,30 \pm 0,005^{**}$
Уражені тетрахлорметаном з корекцією силімарином 100 мг/кг	$0,27 \pm 0,007^{**}$	$0,27 \pm 0,006^{**}$	$0,31 \pm 0,005^{**}$

Примітки:

1. * – вірогідні зміни між щурами інтактного контролю та щурами, ураженими тетрахлорметаном;
2. ** – вірогідні зміни між ураженими щурами та щурами, які піддавались корекції.

Результати дослідження показали, що застосування силімарину вірогідно підвищувало активність КТ у досліджуваних тканинах протягом всього експерименту. Шпинату городнього листя екстракт густий був ефективний лише наприкінці експерименту. При цьому, до 10 доби розвитку токсичного гепатиту обидва коригувальні чинники відновлювали активність цього ферменту майже до рівня інтактного контролю.

Результати дослідження свідчать, що шпинату городнього листя екстракт густий у дозі 150 мг/ кг проявляв виражену антиоксидантну та гепатопротекторну активність на рівні з референтним препаратом силімарином [51].

Висновки до розділу 4

1. На підставі проведених фітохімічних досліджень як перспективну для одержання лікарських засобів сировину шпинату городнього обрано висушене листя цієї рослини. Для обраної сировини визначено числові показники якості та технологічні параметри. Встановлено, що найкращим екстрагентом, який вилучав максимальну кількість екстрактивних речовин (24,73 %), поліфенолів (10,68 %), гідроксикоричних кислот (2,77 %) та флавоноїдів (4,20 %) зі шпинату городнього листя був 40 % етанол.

2. Досліджено морфолого-анатомічну будову шпинату городнього листя

та встановлено основні діагностичні ознаки. До макроскопічних діагностичних ознак сировини було віднесено овальну форму та тип жилкування листкової пластинки, наявність крилатих черешків з піхвоподібним розширенням при основі.

До мікроскопічних діагностичних ознак віднесено наявність кулястих прорихів аномоцитного типу, сферичну, напівсферичну або трикутну форму поперечного перерізу черешка, а також наявність у мезофілі листка та черешка ідіобластів з кристалами оксалату кальцію кубічної або таблитчастої форми, які зростаються у чисельні друзи.

3. Запропоновано стандартизувати шпинату городнього листя за якісним складом фенольних сполук та кількісним вмістом поліфенолів (не менше 10,0 %), гідроксикоричних кислот (не менше 2,0 %), флавоноїдів (не менше 3,5 %) та щавлевої кислоти (не більше 1,0 %).

4. Методом трьохфакторного математичного планування за виходом поліфенольних сполук, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів здійснено вибір оптимальних умов одержання екстракту зі шпинату городнього листя при екстракції 40 % етанолом: температури нагріву водяної бані (60°C), співвідношення сировини й екстрагенту (1 : 5) та кратності екстракції (3 рази), що за прогнозами дозволяло вилучати із сировини 12,85 % суми поліфенолів, 2,89 % гідроксикоричних кислот та 4,93 % флавоноїдів. Ці дані були підтверджені на практиці, оскільки одержані в експерименті результати відрізнялись від прогнозованих не більше, ніж на 5 %, а вихід готового продукту перевищував 38 % від маси повітряно-сухої сировини.

5. Одержано шпинату городнього листя екстракт густий та проведено його фітохімічне вивчення. Методом ПХ та ТШХ у лікарському засобі ідентифіковано хлорогенову, неохлорогенову, кофейну, яблучну, лимонну, винну, щавлеву, малонову та аскорбінову кислоти, а також рутин, лютеолін, гіперозид, апігенін, лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин, аргінін, гліцин, фенілаланін, серин, треонін та цистеїн.

6. Методом ВЕРХ у шпинаті городнього листя екстракті густому ідентифіковано 3 гідроксикоричні кислоти, 7 флавоноїдів та визначено їх кількісний

вміст. Загальний вміст фенольних сполук в цьому об'єкті складав 3778,89 мг/кг. Серед гідроксикоричних кислот у досліджуваному екстракті домінувала кофейна кислота (883,04 мг/кг), серед флавоноїдів – рутин (1046,43 мг/кг).

Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії у шпинату городнього листя екстракті густому ідентифіковано та визначено кількісний вміст 18 амінокислот, серед яких 9 – незамінні амінокислоти. Загальний вміст цих сполук складав 308,15 мг/кг. Домінуючими незамінними амінокислотами були лейцин (28,41 мг/кг), лізин (23,96 мг/кг) та валін (21,05 мг/кг).

Методом АСС у шпинату городнього листя екстракті густому визначено вміст мінеральних елементів. Вміст важких металів у досліджуваному об'єкті знаходився в межах допустимої норми за вимогами ДФУ для лікарських рослинних екстрактів.

Методом абсорбційної спектрофотометрії у шпинату городнього листя екстракті густому визначено вміст суми поліфенолів (26,52 %), гідроксикоричних кислот (3,73 %), флавоноїдів (8,10 %), суми стероїдних сполук (1,63 %). Методом перманганатометрії у шпинату городнього листя екстракті густому визначено кількісний вміст щавлевої кислоти (0,06 %), гравіметричним методом – суми полісахаридів (1,35 %).

7. Розроблено проєкт МКЯ «Шпинату городнього листя екстракт густий», який пропонується стандартизувати за вмістом щавлевої кислоти, поліфенолів, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів.

8. Методом дифузії в агар проведено протимікробний скринінг досліджуваного екстракту у порівнянні з Хлорофіліптом. Встановлено, що *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans* були чутливими, а *Staphylococcus aureus* – високочутливим до дії шпинату городнього листя екстракту густого.

Антирадикальну активність досліджуваного екстракту визначали методом абсорбційної спектрофотометрії у еквіваленті хлорогенової кислоти. Числове значення антирадикальної активності досліджуваного об'єкту складало 8,31 мг/г.

У дослідях *in vivo* встановлено, що шпинату городнього листя екстракт густий відноститься до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за

класифікацією К. К. Сидорова. У мінімальній ефективній дозі 150 мг/кг шпинату городнього листя екстракт густий проявляв виражену антиоксидантну та гепатопротекторну активність на рівні з препаратом-порівняння Карсилом.

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у таких публікаціях:

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

2. Grynenko U. V., Zhuravel I. O. Extractable matter determination in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Science and Practice: Abstracts of 8th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice Kaunas, 15th of December 2017*. Kaunas. 2017. P. 63-64.

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

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

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

ВИСНОВКИ

У дисертаційні роботі представлено результати практичного вирішення наукової задачі, яка полягає у комплексному фармакогностичному дослідженні коренів, листя та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, замороженого листя цієї рослини промислового виробництва, одержаних на їх основі лікарських засобів та стандартизації досліджуваних об'єктів.

1. За допомогою хімічних реакцій та методів планарної хроматографії в усіх видах сировини шпинату городнього виявлено полісахариди, крохмаль, органічні кислоти, гідроксикоричні та амінокислоти, поліфеноли, флавоноїди, хлорофіли, каротиноїди та стероїдні сполуки. У коренях та насінні цієї рослини виявлено крохмаль, у листі та насінні – токоферол. Методами ПХ та ТШХ в усіх зразках сировини ідентифіковано яблучну, лимонну, аскорбінову, хлорогенову та кофейну кислоти, лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин, аргінін та лютеолін. Крім того, у листі цієї рослини виявлено щавлеву та малонову кислоти, рутин та апігенін.

2. Методом ВЕРХ у коренях обох досліджуваних сортів шпинату городнього ідентифіковано по 3, в усіх зразках листя – ідентифіковано по 7, у насінні – по 5 фенольних сполук та визначено їх кількісний вміст. Максимальна сумарна кількість фенольних сполук відмічена у листі шпинату городнього – від 966,73 до 1650,03 мг/кг. У листі шпинату городнього сорту Красень Полісся переважали кофейна кислота (351,50 мг/кг), у листі цієї рослини сорту Фантазія – рутин (323,43 мг/кг) та апігенін (617,92 мг/кг). У листі та насінні методом ВЕРХ ідентифікували α -, β -, γ - та δ -токоферолі. В усіх зразках листя шпинату городнього за вмістом переважав γ -токоферол (9,30-27,10 мг/кг), у насінні – δ -токоферол (43,90-48,20 мг/кг).

Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії в усіх досліджуваних об'єктах ідентифіковано 18 амінокислот, з яких 9 – незамінні. Найвищий вміст амінокислот був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся (155,09 мг/кг). В усіх досліджуваних об'єктах серед незамінних амінокислот превалювали лейцин та лізин. Крім того, у коренях обох

досліджуваних сортів шпинату городнього у значній кількості накопичувалися валін та треонін, у листі та насінні – аргінін.

3. Жирнокислотний склад у сировині шпинату городнього вивчали методом ГХ. В усіх досліджуваних об'єктах ідентифіковано від 11 до 14 жирних кислот. Найбільше за вмістом в усіх зразках містилося ненасичених жирних кислот (від 81,46 до 87,49 %), домінуючими серед яких були олеїнова, лінолева та ліноленова кислоти. Методом ААС в усіх зразках сировини ідентифіковано та визначено кількісний вміст 19 мінеральних елементів. Мажоритарними серед макроелементів у сировині шпинату городнього були калій, кальцій та натрій, серед мікроелементів – ферум, цинк та алюміній. Вміст важких металів був у межах норми для лікарської рослинної сировини за вимогами ДФУ.

Методом абсорбційної спектрофотометрії визначено кількісний вміст деяких груп БАР. Найвищий вміст аскорбінової кислоти (0,18 %), гідроксикоричних кислот (2,60 %), флавоноїдів (4,02 %) був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся; суми вільних амінокислот (3,21 %), поліфенолів (11,30 %), хлорофілів а і b (366,41 і 670,89 мг/100 г відповідно), каротиноїдів (250,86 мг/100 г), суми стероїдних сполук (0,70 %) – у листі цієї рослини сорту Фантазія.

Вміст та фракційний склад полісахаридів у коренях, листі та насінні шпинату городнього визначали методом гравіметрії, крохмалю – методом поляриметрії. Найвищий вміст полісахаридів (28,58 %), клітковини (30,28 %) та крохмалю (28,41 %) відмічено у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся. В усіх зразках сировини переважала фракція ГЦ А. Вміст органічних кислот встановлювали алкаліметричним методом, щавлевої кислоти – перманганатометричним методом, протеїну – методом К'ельдаля. Максимальний вміст щавлевої кислоти був у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся (0,93 %), органічних кислот (3,95 %) та протеїну (33,10 %) – у листяі шпинату городнього сорту Фантазія .

4. У ході проведення якісного та кількісного аналізу встановлено, що за хімічним складом та вмістом БАР аналогічні види сировини шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія відрізнялись не значно. Найвищий вміст БАР

був у листі шпинату городнього обох досліджуваних сортів. При цьому, у замороженому листі цієї рослини вміст БАР був дещо нижчий. Тому для розробки лікарських засобів обрано висушене листя шпинату городнього без зазначення сорту.

Для шпинату городнього листя було встановлено основні діагностичні ознаки (аномоцитний тип продихового апарату, сферична або трикутна форма поперечного перерізу черешка, наявність у мезофілі листка та черешка ідіобластів з кристалами оксалату кальцію кубічної або таблитчастої форми, які зростаються у чисельні друзи) визначено числові показники якості за вимогами ДФУ та технологічні параметри.

5. За допомогою методу трьохфакторного математичного планування здійснено підбір оптимальних умов екстракції та розроблено раціональну технологію одержання шпинату городнього листя екстракту густого. Лікарський засіб одержували трикратною екстракцією 40 % етанолом при температурі екстракції близько 60°C та співвідношенні сировини до екстрагенту 1 : 5.

Проведено фітохімічне вивчення шпинату городнього листя екстракту густого. Методом ВЕРХ у цьому об'єкті ідентифіковано 10 фенольних сполук, серед яких переважали кофейна кислота (883,04 мг/кг), рутин (1046,43 мг/кг) та апігенін (923,46 мг/кг). Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії у досліджуваному екстракті виявлено 18 амінокислот, загальний вміст яких складав 308,15 мг/кг. Методом ААС досліджено мінеральний склад одержаного екстракту та встановлено, що вміст важких металів був в межах норми для екстрактів з лікарської рослинної сировини за вимогами ДФУ. Методом абсорбційної спектрофотометрії у шпинату городнього листя екстракті густому визначено вміст полісахаридів, щавлевої кислоти, вільних амінокислот, поліфенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та стероїдних сполук.

6. Розроблено параметри стандартизації та запропоновано проекти МКЯ «Шпинату городнього листя», «Шпинату городнього листя екстракт густий».

7. Фармакологічну активність одержаного екстракту вивчали методами *in vitro* та *in vivo*. За результатами протимікробного скринінгу методом дифузії в агар

встановлено, що *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* були чутливими до дії шпинату городнього листа екстракту густого. Антирадикальну активність (8,31 мг/г) визначали методом абсорбційної спектрофотометрії у еквіваленті хлорогенової кислоти.

Встановлено, що шпинату городнього листа екстракт густий належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова. У мінімальній ефективній дозі 150 мг/кг він проявляв антиоксидантну та гепатопротекторну активність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алексейчук О. М. Элементы сортовой технологии выращивания шпината городского у Правобережному лісостепу України: дис. ...кан. сільгосп. наук: 06.01.06 / Уманський національний університет садівництва, Умань, 2019. 186 с.
2. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие / под ред. М. Г. Кусакина, В. И. Суворов, Л. А. Чудинова; Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2012. 148 с.
3. Босов А. А., Артемчук В. В. Математичне моделювання планування експерименту. *Вісник Дніпропетровського національного університету залізничного транспорту*. 2008. № 25. С. 118-121.
4. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. *Методичні рекомендації*. К., 2004. 38 с.
5. Гарна С. В., Ветров П. П., Георгіянц В. А. Взаємозв'язок основних технологічних параметрів рослинної сировини. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. № 1 (8) С. 54-57.
6. Гриненко У. В. Количественное определение фенольных соединений в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Роль молодежи в развитии медицинской науки*: мат. XII научн.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году молодежи», г. Душанбе, 28 апреля 2017 г. Душанбе. 2017. С. 292-293.
7. Гриненко У. В. Определение количественного содержания органических кислот в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Актуальные вопросы современной медицины и фармации*: мат. 69-й итоговой научн.-практ. конф. студентов и молодых ученых, г. Витебск, 19-20 апреля 2017 г. Витебск. 2017. С. 611-612.
8. Гриненко У. В. Определение содержания гидроксикоричных кислот в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017*: мат. LXXI Междунар. научн.-практ. конф. студентов и молодых ученых, г. Минск, 17-19 апреля 2017 г. Минск. 2017. С. 1530.

9. Гриненко У. В., Журавель И. А. Идентификация и количественное определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях шпината огородного сортов «Красавец полесья» и «Фантазия». *Рецепт*. 2018. Т. 21, № 2. С. 226-230.
10. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту флавоноїдів в листі шпинату городнього. Промислова фармація: етапи становлення та майбутнє: мат. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 29-30 вересня 2017 р. Харків. 2017. С. 35-37.
11. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів в листі шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.). *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 28. С. 29-33.
12. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення жирнокислотного складу в насінні шпинату городнього сорту «Фантазія». *Фітотерапія. Часопис*. 2017. № 3. С. 55-58.
13. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення числових показників в сировині шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: зб. наук. праць, вип. 4*. Харків. 2018. С. 71.
14. Гриненко У. В., Журавель І. О. Гриненко У.В. Визначення технологічних параметрів для сировини шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження*: мат. І Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 5 квітня 2018 р. Харків. 2018. С. 41.
15. Гриненко У. В., Журавель І. О., Могильна О. М. Порівняльний аналіз жирнокислотного складу листя шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 30. С. 388-397.
16. Гур'єва І. Г. Кількісне визначення суми стероїдних сполук у сировині тифону. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2014. № 23 (4). С. 267–270.
17. Гуреева С. М. Використання методів математичного планування

для підбору оптимальної композиції полімерної оболонки таблеток «Антраль». *Фармацевтичний журнал*. 2012. № 2. С. 69-72.

18. Давлатова М. С., Кароматов И. Д. Научные исследования лекарственных свойств шпината. *Биология и интегративная медицина*. 2017. № 10. С. 125-136.

19. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Х.: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.

20. Державна фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Х.: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1130 с.

21. Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Доп. 1. Х.: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.

22. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020 рік. [електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>. (Дата звернення 15.07.2020). Назва з екрану.

23. До питання про введення у Державну Фармакопею України загальних статей на лікарську рослинну сировину та препарати / Є. К. Товмасян, А. Г. Котов, О. І. Гризодуб, В. П. Георгієвський. *Фармаком*. 2004. С. 17-27.

24. Довжук В. В. Математичне моделювання постановки експерименту з розробки складу, технології приготування мазі з німесулідом. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2012. Т. 7, № 1. С. 49-51.

25. Дученко М. А. Дослідження полісахаридів листя гледичії колючої. *Український біофармацевтичний журнал*. 2014. № 3 (32). С. 64-66.

26. Ільїнська Н. І., Гонтова Т. М., Кічимасова Я. С. Вивчення технологічний параметрів сировини жоржини німфейної сорту Ken's Flame. *Український медичний альманах*. 2014. Т. 17, № 1. С. 86.

27. Інформаційно-довідкова система "Сорт". [електронний ресурс]. Режим доступу: <http://sort.sops.gov.ua/taxon/view/130>. (Дата звернення 20.07.2020). Назва з екрану.

28. Калашнова Т. В., Беляева И. А. Ботаническое описание,

морфологическая структурная оценка шпината огородного. *Современная наука и инновации*. 2014. № 4 (8). С. 33-38.

29. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Підбір оптимальних умов при розробці технології отримання 50% етанольного екстракту плодів моркви посівної з використанням методу математичного планування. *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 4. С. 67-71.

30. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Дослідження мінерального складу сланей пармелії перлинової. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 1. С. 117-122.

31. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Дослідження фотосинтезувальних пігментів трави канни садової деяких сортів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. № 2. С. 141-147.

32. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Ідентифікація та визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів у листі, квітках та траві канни садової сортів «Америка», «Президент» та «Маестро». *Зб. наук. прац. співробіт. НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 30. С. 16-25.

33. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Дослідження амінокислотного складу та визначення кількісного вмісту амінокислот в сланях пармелії бороздчатої та пармелії перлинової. *Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку = Pharmaceutical science and practice : problems, achievements, prospects* : мат. II наук. - практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 27 квіт. 2018 р. Харків. 2018. С. 163.

34. Кисличенко, О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Дослідження якісного складу та визначення кількісного вмісту суми амінокислот у сировині моркви посівної сортів «Яскрава», «Нантська Харківська», «Оленка», «Комет» та «Афалон». *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 1. С. 41-45.

35. Кисличенко, О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Динаміка накопичення суми стероїдних сполук в листі хости подорожникової. *Science and life: proceedings of articles the international scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary - Ukraine, Kyiv, November 16-17, 2017*. Karlovy Vary. 2017. P. 157-159.

36. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Частина 2. *Управління правління, економіка кономіка та забезпечення забезпечення якості в фармації фармації*. 2012. № 1 (21). С. 4-10.
37. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Частина 1. *Управління правління, економіка кономіка та забезпечення забезпечення якості в фармації фармації*. 2011. № 6 (20). С. 16-22.
38. Котов А. Г., Котова Е. Е. Систематизація досвіду введення монографії на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України 2.1-2.2. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2018. № 3 (55). С. 11-19.
39. Лихацький П. Г. Никифорок А. Я., Фіра Л. С. Встановлення ефективної дози густого екстракту з листя шпинату городнього на моделі токсичного ураження печінки. *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 3. С. 38-42.
40. Ляшок А. В. Планування багатофакторного експерименту при дослідженні процесу ультразвукового розпилення в тонкому шарі. *Вісник НТУУ «КПІ»*. 2013. № 3 (69). С. 13-17.
41. Макро- та мікроскопічні ознаки листя прикореневої розетки шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.): Інформаційний лист № 368-2018, протокол № 104 від 24.10.2018 р. / У. В. Петровська, І. О. Журавель, В. С. Кисличенко. К.: Укрмедпатентінформ, 2018. 4 с.
42. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / Затверджено Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України № 540 від 12.12.2016 р. «Про затвердження методик проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні». [електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sops.gov.ua/uploads/page/5a5f41997447d.pdf>. (Дата звернення 27.07.2020). Назва з екрану.
43. Никифорок А. Я., Фіра Л. С., Лихацький П. Г. Дослідження антиоксидантних властивостей екстракту зі шпинату городнього листя на моделі тетрахлорметанового ураження печінки. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20. № 4. С. 36-43.
44. Никифорок А. Я., Фіра Л. С., Лихацький П. Г. Дослідження

протизапальних властивостей густого екстракту з листя шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.). *Фітотерапія. Часопис*. 2019. № 1. С. 85-88.

45. Никифрук А. Я., Фіра Л. С., Лихацький П. Г. Експериментальне обґрунтування безпечності густого екстракту зі шпинату городнього. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 3 (56). С. 16-21.

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

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

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

49. Петровська У. В., Журавель І. О. Кількісний вміст органічних кислот, аскорбінової кислоти та гідроксикоричних кислот в сировині шпинату городнього сорту Красень Полісся та Фантазія. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : мат. II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 11 березня 2020 р. Харків. 2020. С. 129.

50. Петровська У. В., Журавель І. О., Гуцол В. В. Визначення кількісного вмісту протеїну та клітковини в листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія. *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 4. С. 56-58.

51. Петровська У. В., Никифрук А. Я., Журавель І. О., Фіра Л. С. Лікарський рослинний засіб з гепатопротекторною активністю: пат. на кор. мод.

136789 Україна. № у 201906898; заявл. 20.06.2019; опубл. 27.08.2019; Бюл. № 16.

52. Позняк О. В., Чабан Л. В. Селекція малопоширених видів овочевих рослин на ДС «Маяк» ІОБ НААН: досягнення і перспективи. *Основні, малопоширені і нетрадиційні види рослин – від вивчення до освоєння (сільськогосподарські і біологічні науки)*: мат. Міжнародної наук.-практ. конф. у рамках II наук. форуму «Науковий тиждень у Крутах – 2017», с. Крути, Чернігівська обл., 16 березня 2017 р. Крути. 2017. Т. 2. С. 167-170.

53. Проблемы введения монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную Фармакопею Украины / А. И. Гризодуб, Г. В. Георгиевский, Т. М. Тихоненко, В. П. Георгиевский. *Фармаком*. 2004. С. 3-17.

54. Процька В. В., Дьяконова Я. В., Журавель І. О. Дослідження антибактеріальної та протигрибкової активності настоек з квіток та кореневищ з коренями хости подорожникової та хости ланцетолистої. *Фітотерапія. Часопис*. 2016. № 1. С. 67-72.

55. Прудкий Р. І. Технологічні особливості формування урожайності шпинату городнього за органічного виробництва Правобережному лісостепу України: дис. ...кан. сільгосп наук: 06.01.06 / Уманський національний університет садівництва, Умань, 2019. 192 с.

56. Резніков О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. *Ендокринологія*. 2003. Т. 8, № 1. С. 142-145.

57. Рубан О. А., Колісник Т. Є., Сліпченко Г. Д. Застосування методу математичного планування експерименту при оптимізації складу та технології матриксних таблеток із сухим екстрактом листя чорниці. *Фармацевтичний часопис*. 2018. № 2. С. 41-47.

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

59. Чабан Л. В., Позняк О. В. Новий сорт шпинату городнього Фантазія. *Овочівництво і багтанництво*. 2011. Вип. 57. С. 76-78.

60. Чепель Н. В., Грек О. Л. Дослідження пектинових речовин як адсорбентів

ароматичних речовин. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2014. № 1. С. 45-51.

61. Чутливість до антибактеріальних препаратів збудників позалікарняних інфекцій / Т. П. Осолодченко, І. Д. Андреєва, Н. П. Завада, Т. В. Лук'яненко та ін. *Annals of Mechnikov Institute*. 2015. № 1. С. 29-38.

62. Шпичак О. С. Визначення технологічних параметрів лікарської рослинної сировини, що входить до складу комплексного апіфітопраепарату «Апісед». *Вісник фармації*. 2013. №1 (73). С. 3-8.

63. Щеглов Н. Г., Мартирисян В. В., Дебияева М. С. Разработка эффективных методов осаждения щавелевой кислоты в растительном сырье. *Известия ВУЗов. Пищевая технология*. 2010. № 5-6. С. 11-13.

64. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits / R. J. Ogbe, D. O. Ochalefu, S. G. Mafulul, O. B. Olaniru. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2015. № 5 (4). P.10-21.

65. A review on the genetic resources, domestication and breeding history of spinach (*Spinacia oleracea* L.) / A. Ribera, Y. Bai . A.-M. A. Wolters . R. van Treuren et al. *Euphytica*. 2020. № 21. 47-68.

66. Abdel-Salam O. M. E., Sleem A. A., Shaffie N., Hepatoprotective effects of citric acid and aspartame on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *EXCLI Journal*. 2009. № 8. P. 41-49.

67. Abidi S. L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A*. 2000. № 881. P. 197-216.

68. Adikwu E., Deo O. Hepatoprotective Effect of Vitamin C (Ascorbic Acid). *Pharmacology & Pharmacy*. 2013. № 04 (01). P. 84-92.

69. Alterations in the Chemical Composition of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) as Provoked by Season and Moderately Limited Water Supply in Open Field Cultivation / C. Schlering, J. Zinkernagel, H. Dietrich, M. Frisch et al. *Horticulturae*. 2020. № 6. P. 25-48.

70. American Herbal Pharmacopoeia / CRC Press, Edition 1st. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 800.

71. Analysis of fatty acid composition of rhizomes with roots, leaves and flowers of *Hosta Plantaginea* / M. F. Dababneh, V. V. Protska, I. O. Zhuravel. *Research Journal*

of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016. № 7(6). P. 2251- 2255.

72. Antidiabetic activity of leaves of *Spinacia oleracea* Linn. in Alloxaninduced diabetic rats / V. Gomathi, B. Jayakar, R. Kothai, G. Ramakrishnan. *J. Chem. Pharm. Res.* 2010. № 2 (4). P. 266-274.

73. Anti-Hyperglycemic Evaluation of Extracts of *Spinacia oleracea* Linn. and *Acacia nilotica* Linn. in Alloxan induced Diabetic Rats / S. K. Sarje, N. B. Ghiware, S. Bhosale, P. Chavan *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2019. № 9 (1). P. 797-802.

74. Antioxidant Effects of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Supplementation in Hyperlipidemic Rats / S.-H. Ko, J.-H. Park, S.-Y. Kim, S. W. Lee et al. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2014. № 19 (1). P. 19-26.

75. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study / C. Trenzado, M. C. Hidalgo, M. García-Gallego, A. E. Morales et al. *Aquaculture*. 2006. № 254. P. 758–767.

76. Anti-oxidative and hepatoprotective effect of beta-carotene on acetaminophen-induced liver damage in rats / A. O. Morakinyo, B. O. Iranloye, O. T. Oyelowo, J. Nnaji. *Biology and Medicine*. 2012. № 4 (3). P. 134-140.

77. Arabshahi-Delouee S., Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* 2007. № 102. P. 1233–1244.

78. Assessment of the hepatoprotective effect of developed lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPHNPs) encapsulating naturally extracted β -Sitosterol against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats / E. M. Abdou, M. A. A. Fayed, D. Helal, K. A. Ahmed. *Scientific Reports*. 2019. № 9. 19779-19793.

79. Authorised EU health claims for betaine / K. K. Tiihonen, K. Riihinen, M. Lyyra, E. Sarkkinen et al. *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised Eu Health Claims*. 2014. № 1. P. 251-273.

80. Bader A. A., Hassouna H. Z., Dairouty R. K. E. Evaluation of antimicrobial activity, total phenolic compounds , antioxidant activity and nutritional value of fresh spinach (*Spinacia oleracea*)extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016. № 7 (3). P. 1835-1843.

81. Barkat N. Harvesting time influences health-promoting properties, and nanoemulsions inhibit *e. coli* O157:H7 growth on Spinach: a thesis of master of science / Submitted to the Office of Graduate and Professional Studies of Texas A&M University, 2017. 76 p.
82. Bergman M. E., Davis B., Phillips M. A. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*. 2019. № 24. P. 3961-3984.
83. Borowski E., Michałek S. The effect of foliar nutrition of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) with magnesium salts and urea on GAS exchange, leaf yield and quality. *Acta Agrobotanica*. 2010. Vol. 63 (1). P. 77-85.
84. Cai X., Yang Q., Wang S. Antioxidant and hepatoprotective effects of pigment-protein complex from *Chlorella vulgaris* on carbon tetrachloride-induced liver damage in vivo. *RSC Advances*. 2015. № 5 (116). P. 96097-96104.
85. Cardioprotective activity of polysaccharides derived from marine algae: An overview / V. Mayakrishnana, P. Kannappanb, N. Abdullaha, A. A. Bakrudeen. *Trends in Food Science & Technology*. 2013. № 30. P. 98-104.
86. Cerulli J., Grabe D.W., Gauthier I. Chromium picolinate toxicity. *Ann Pharmacother*. 1998. № 32. № 428-431.
87. Dabak J., Gazuwa S., Ubom G. A. Hepatoprotective Potential of Calcium and Magnesium Against Cadmium and Lead Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. *Asian Journal of Biotechnology*. 2009. № 1 (1). P. 12-19.
88. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry / A. A. Gotor, E. Farkasa, M. Bergera, F. Labalette et al. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2007. № 109. P. 525-530.
89. Devarenne T. P. Terpenoids: Higher. Encyclopedia of life sciences John Wiley & Sons, Ltd. 2009. [электронный ресурс]. Режим доступа: <http://biochemistry.tamu.edu/wpcontent/uploads/sites/104/2016/03/ELSTerpenoids200.pdf>. (Дата звернення 22.07.2020). Назва з екрану.
90. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage / Y. Wanga, C.-F. Changa, J. Choua, H.-L. Chena et al. *Experimental Neurology*. 2005. № 193. P. 75-84

91. Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice / R. Domitrović, J. Hrvoje, V. Vanja, R. Dario et al. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012. № 33 (10). P. 1260-1270.
92. Dymińska L. Spectroscopic properties of spinacine—an active component of ginseng (*Panax ginseng*) and spinach (*Spinacia oleracea*). *Spectroscopy Letters*. 2016. Vol. 49, № 10. P. 635-646.
93. Effect of spinach aqueous extract on wound healing in experimental model diabetic rats with streptozotocin / S. Rahati, M. Eshraghian, A. Ebrahimi, H. J. Pishva. *Sci. Food Agric*. 2016. № 96 (7). P. 2337-2343.
94. Egharevba H. Chemical Properties of Starch and Its Application in the Food Industry. Chemical properties of starch. 2020. № 1. P. 1-26.
95. Evaluation of Hepatoprotective Effect of Omega 3-Fatty Acid against Paracetamol Induced Liver Injury in Albino Rats / M. Meganathan, K. M. Gopal, P. Sasikala, J. Mohan et al. *Global Journal of Pharmacology*. 2011. № 5 (1). P. 50-53.
96. Fahmy A., Nahla H., Rehab A. Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2016. № 4 (4). P. 1147-1153.
97. Farah K. A.-W., Thukaa Z. A. J. Study of Iraqi Spinach Leaves (Phytochemical and Protective Effects Against methotrexate-Induced hepatotoxicity in rats). *Iraqi J Pharm Sci*. 2010. Vol. 21 (2). P. 8-17.
98. Flavonoid glycosides in Malabar Spinach *Basella alba* inhibit the growth of *Spodoptera litura* larvae / T. Aboshi, S. Ishiguri, Y. Shiono, T. Murayama. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2018. Vol. 82, № 1. P. 9-14.
99. Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress / C. D. Martino, S. Delfine, R. Pizzuto, F. Loreto et al. *New Phytologist*. 2003. № 158 (3). P. 455-463.
100. Goering P. L, Barber D. S. Hepatotoxicity of Copper, Iron, Cadmium, and Arsenic. *Comprehensive Toxicology*. 2010. № 6. P. 01022-01028.
101. Grynenko U. V., Zhuravel I. O. Extractable matter determination in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Science and Practice: Abstracts of 8th international*

conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice Kaunas,. 15th of December 2017. Kaunas. 2017. P. 63-64.

102. Gupta R. S., Singh D. Amelioration of CCl₄-induced hepatosuppression by *Spinacia oleracea* L. leaves in wistar albino rats. *Pharmacologyonline*. 2006. № 3. P. 267-278.

103. Hasan T., Sultana M. Antidiabetic Potency of Bangladeshi Medicinal Plants. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*. 2018. № 4 (1). P. 35-42.

104. Hepatoprotective activity of terpenoids and terpenoid fractions of *Scopariadulcis* L / P. T. Krishnamurthy, J. Bajaj, A. Sharma, S. Manimaran et al. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2010. № 10 (4). P. 263-270.

105. Hepatoprotective Effect of Apigenin Against Liver Injury via the Non-canonical NF- κ B Pathway In Vivo and In Vitro / S. Yue, N. Xue, H. Li, B. Huang et al. *Inflammation*. 2020. № 65. P. 13-24.

106. Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats / Z. Chen, Y. Yang, S. Mishow, Z. Ruan et al. *Journal of Functional Foods*. 2019. № 62. P. 103540-103549.

107. Hepatoprotective Effect of Coumarin and Chlorophyll Against Aflatoxicosis in Rat / M. S. Abdel-Latif, K. M. Elmeleigy; M. M. S. Khattab, S. M. Mohamd. *J. Anim. and Poultry Prod., Mansoura Univ*. 2016. Vol. 7 (12). P. 483-490.

108. Hepatoprotective effect of crude polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice / R. J. K. Susilo, D. Winarni, S. A. Husen, S. Hayaza et al. *Veterinary World*. 2019. Vol.12. P. 1987-1991.

109. Hepatoprotective effect of polyunsaturated fatty acids against repeated subacute acetaminophen dosing in rat / T. Chavan, S. P. Khadke, S. M. Harke, A. Kuvalekar et al. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013. № 4 (2). P. 286-299.

110. Hepatoprotective effects of chlorogenic acid under hyperglycemic conditions / H. B. Farhood, M. Balas, D. Gradinaru, Margina D. *Romanian Biotechnological Letters*. 2017. № 1. P. 1-10.

111. Hepatoprotective Effects of Polysaccharides Isolated from *Phellinus gilvus* Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury in Rats / S.-C. Park, Y.-P. Cheon, W.-Y. Son, K. Kilsoo et al. *Toxicological Research*. 2009. № 25 (1). P. 29-33.

112. Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats / M. A M Aboul-Soud, Z. A Alothman, G. El-Baz El-desoky, A. A. Al-Khedhairi et al. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2011. № 36 (3). P. 285-296.
113. Hepatoprotective efficacy of gallic acid during Nitrosodiethylamine-induced liver inflammation in Wistar rats / U. Latief, H. Husain, D. Mukherjee, R. Ahmad. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 2016. № 76 (C). P. 31-41.
114. Hyeok M., Weird J., Heo J.-G., Cheol J. Extract of *Spinacia oleracea* Linne having anti-asthma activity: пат. на винахід KR100785419B1 Корея. № KR1020060063599A; заявл. 06.07.2006; опубл. 13.12.2007.
115. Identification of Key Root Volatiles Signaling Preference of Tomato over Spinach by the Root Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. / L. K. Murungi, H. Kirwa, D. Coyne, P. E. A. Teal et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018. № 66 (28). P. 7328-7336.
116. Identifying Freshness of Spinach Leaves Stored at Different Temperatures Using Hyperspectral Imaging / S. Zhu, L. Feng, C. Zhang, Y Bao., Y. He. *Foods*. 2019. № 8. P. 356-368.
117. In Vivo Hepatoprotective Effects of a Peptide Fraction from Krill Protein Hydrolysates against Alcohol-Induced Oxidative Damage / S. Y. Park, I. Priyan, S. Fernando, E. J. Han et al. *Mar. Drugs*. 2019. № 17. P. 690-702.
118. In-vitro Anthelmintic Activity of leaves of *Spinacia oleracea* Linn / U. K. Patil, S. Dave , A. Bhaiji, U. S. Baghel, S. K. Yadav et al. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2009. № 1 (1). P. 21-23.
119. Jiraungkoorskul W. Review of Neuro-nutrition Used as Anti-Alzheimer Plant, Spinach, *Spinacia oleracea*. *Pharmacogn Rev*. 2016. № 10 (20). P. 105-108.
120. Kennedi E. V., Devarajan N. Evaluation of free radical scavenging activity and biological properties of *Spinacia oleracea* L. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2011. № 1 (1). P. 25-30.
121. Kwang S. K. Hepatoprotective Functions of Sulfur Containing Amino Acids: Possibilities of Hepatocellular Carcinoma Prevention. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2012.

Vol. 44, № 6. P. 653-657.

122. Kyslychenko O., Protska V., Zhuravel I. Phytochemical research of Vagrant *Parmelia* thalli as a prospective source of certain nutrients. *Norwegian Journal of development of the International Science*. 2019. № 30 (1). P. 44-49.

123. Kyslychenko O., Protska V., Zhuravel I. Phytochemical research of vagrant *Parmelia* thalli as a prospective source of certain nutrients. *Norwegian Journal of development of the International Science*. 2019. № 30. P. 44-49.

124. Lee D.-Y., Kim E.-H. Therapeutic Effects of Amino Acids in Liver Diseases: Current Studies and Future Perspectives. *J Cancer Prev*. 2019. № 24 (2). P. 72-78.

125. Ligor M., Buszewski B. Study of Xanthophyll Concentration in Spinach Leaves by Means of HPLC Coupled with UV–VIS and Corona CAD Detectors. *Food Analytical Methods*. 2012. Vol. 5. P. 388-395.

126. Liver and Cadmium Toxicity / V. S. Arroyo, K. M. Flores, L. B. Ortiz, L. E. Gómez-Quiroz et al. *J. Drug. Metab. Toxicol*. 2012. S5. P. 001-007.

127. Martin-Smith M., Khatoon T. Biological Activity of the Terpenoids and Their Derivatives. *Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques*. 2012. Vol. 6. P. 279-346.

128. Metha D., Belemkar S. Pharmacological activity of *Spinacia oleracea* Linn.—A complete overview. *Asian J Pharm Res Dev*. 2014. № 2. P. 32-42.

129. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol. Int*. 2009. № 3 (4). P. 526-536.

130. Näf R., Velluz A. The volatile constituents of extracts of cooked spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Flavour and Fragrance Journal*. 2000. № 15 (5). P. 329-334.

131. Novel neuroprotective and hepatoprotective effects of citric acid in acute malathion intoxication / O. M. E. Abdel-Salam, E. R. Youness, N. A. Mohammed, N. N. Yassen. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016. № 9 (12). P. 1181-1194.

132. Nutritional profile of spinach and its antioxidant & antidiabetic evaluation / A. K. Sah, S. Raj, G. L. Khatik, M. Vyas. *International Journal of Green Pharmacy*. 2017. № 11 (3). P. 192-197.

133. Nuutila A. M. Kammiovirta K., Oksman Caldentey K.M. Comparison of

methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*. 2002. № 76 (4). P. 519-525.

134. Olasupo A. D., Aborisade A. B., Olagoke O. V. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activities of Spinach Leaf. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 2018. Vol. 6, № 2 (8). P. 1-4

135. Panda V., Shinde P. Appetite suppressing effect of *Spinacia oleracea* in rats: Involvement of the short term satiety signal cholecystokinin. *Appetite*. 2017. № 113. P. 224-230.

136. Parekh J., Chanda S. In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae. *African Journal of Microbiology Research*. 2007. Vol. 1 (6). P. 092-099.

137. Parekh J., Chanda S. V. Antibacterial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of 34 Indian Medicinal Plants against Some Staphylococcus Species. *Turk. J. Biol.* 2008. № 32. P. 63-71.

138. Patel M. R., Patel H. V., Shukla S. Pharmacognostical Studies and Evaluation of Quality Parameters of *Spinacia oleracea*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2017. № 9 (6). P. 760-765.

139. Petrovska U. V., Zhuravel I. O., Hutsol V. V. Identification And Quantitative Content Determination Of Macro- And Microelements In Spinach Leaves, Seeds And Roots of “Krasen” Polissia” And “Fantasy” Cultivars. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. № 9 (6). P 530-534.

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

141. Pharmacognostical studies of leaves of *Spinacia oleracea* Linn / P. R Dande ., G. M. Sharma, R. M. Sharma, G. S. Chakraborty *Int J Pharm Sci Res*. 2010. № 1. P. 41-46.

142. Pharmacopeia of The People's Republic of China / People's Medical Publishing House. Edition 1st. Vol. 1. Ovid: People's Medical Publishing House; 2005. 946 p.

143. Physico-chemical Amino acid composition, fatty acid profile, functional and

antioxidant properties of *Spinacia oleracea* L. leaf / G. Narsing Rao, P. G. Prabhakara Rao, G. Sulochanamma, A. Satyanarayana. *J. Food Pharm. Sci.* 2015. № 3. P. 27-37

144. Phytochemical investigations of *Spinacia oleracea*: An important leafy vegetable used in Indian diet / Mane P. C., Kadam D. D., Chaudhari R. D., Varpe K. A. et al. *Cent. Eur. J. Exp. Biol.* 2015. № 4. P. 1-4.

145. Phytochemical Profiling and Evaluation of Antioxidant and Antidiabetic Activity of Methanol Extract of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves / I. Ohidul, A. K. Azad, M. M. Rahman, A. A. Khorshed et al. *Int J Pharm Sci & Scient Res.* 2018. № 4 (2). 24-27.

146. Polysaccharides from traditional chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity / Yun Chen, Fangke Yao, Ke Ming et al. *Molecules.* 2016. № 21. P. 1705-1728.

147. Potential hepatoprotective effects of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by malathion in rats / G. El-Desoky, M. Abdelreheem, A. AL-Othman, Z. AL-Othman et al. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2012. Vol. 6 (11). P. 806-813.

148. Preliminary phytochemical screening of *Spinacia oleracea* L. / K. N. Rao, B. Tabassum, S. R. Babu, A. Yaja et al. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. № 4. P.532-551.

149. Prospects for the Use of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Containing Phytoecdysteroids and Polyphenols / D. O. Bokov, Yu. S. Sidorova, V. K. Mazo, V. V. Bessonov. *Pharmacogn J.* 2020. № 12 (2). P. 246-250.

150. Protective effect of aqueous spinach (*Spinacia oleracea* L.) extract on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats / G. H. Farjah, M. M. Pour, M. H. Khadem-Ansari, M. Karimipour et al. *Veterinary Research Forum.* 2018. № 9 (2). P. 187-191.

151. Rehder D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future medicinal chemistry.* 2012. № 4 (14). P. 1823-1837.

152. Ricke S. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science.* 2003. № 82 (4). P. 632-639.

153. Roberts J. L., Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct.* 2016. № 7 (8). P. 3337-3353.

154. Role of Natural Phenolics in Hepatoprotection: A Mechanistic Review and

Analysis of Regulatory Network of Associated Genes / P. Saha, A. D. Talukdar, R. Nath, S. D. Sarker et al. *Front Pharmacol.* 2019. № 10. P. 509-534.

155. Roughani A., Miri S. M. Spinach: An important green leafy vegetable and medicinal herb. The 2nd International Conference on Medicinal Plants, Organic Farming, Natural and Pharmaceutical Ingredients. 2019. P. 1-6.

156. Shehab N. G., Gharbieh A.-E., Bayoumi F. A. Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *BMC Complement Altern Med.* 2015. № 15. P. 401-413.

157. Singh N., Tailang M., Mehta S. C. Phytochemical screening and immunomodulatory activity of different extract of *Spinacia oleracea* leaves. *IJPSR.* 2017. Vol. 8 (2). P. 878-882.

158. Singh N., Tailang M., Mehta S. C.. Pharmacognostic and phytochemical evaluation of *Spinacia oleracea* leaves. *International Journal of Phytopharmacy.* 2016. Vol. 6 (5). P. 99-105.

159. *Spinacia oleracea* modulates radiation-induced biochemical changes in mice testis / R. Sisodia, R. K. Yadav, K. V. Sharma, A. L. Bhatia. *Indian. J. Pharm. Sci.* 2008. № 70 (3). P. 320-326.

160. Standartization of the preparation of microbial suspensions / Y. L. Volyanskiy, L. G. Mironenko, S. V. Kalinichenko et al. Newsletter of innovations in health care № 163–2006. Ministry of Health Care of the Ukraine ; Ukranian Centre for Scientific Health Information and Patent licensing work (Ukrmedpatentinform), Kyiv, 2006.

161. Stigmasterol: a comprehensive review / N. Kaur, J. Chaudhary, A. Jain, L. Kishore. *International journal of pharmaceutical sciences and research.* 2017. № 1. P. 21-24.

162. Suksomboon N., Poolsup N., Yuwanakorn A. Trace Elements and Metals. *LiverTox.* 2019. № 4. P. 1-9.

163. Temiz M. Ali, Temur A., Oguz E. K. Antioxidant and hepatoprotective effects of vitamin E and melatonin against copper-induced toxicity in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2018. № 17 (6). P. 1025-1031.

164. Terpenoids in Treatment of Liver Disease / Sujana Chatterjee, Debajyoti

Patra, Debajyoti Patra, Pujita GhoshShow et al. *Terpenoids Against Human Diseases*. 2019. № 1. P. 1-11.

165. The Ayurvedic Pharmacopeia of India: Part I. Government of India / 1st ed., Vol. 2. New Delhi: Controller of Publications; 1999. p. 190.

166. The determination of qualitative composition and quantitative content of steroidal compounds in *Hosta plantaginea* and *Hosta lancifolia* plant raw material / O. A. Kyslychenko, V. V. Protska, I. O. Zhuravel, V. V. Hutsol // *Journal of Pharmacy Research*. 2018. Vol. 12, Iss. 3. P. 408-413.

167. The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression / H. Baba, K. Tsuneyama, M. Yazaki, K. Nagata et al. *Mod. Pathol.* 2013. № 26. P. 1228-1234.

168. The Story of Beta-sitosterol – A Review / S. Saeidnia, A. Manayi, A. R. Gohari, M. Abdollahi. *European Journal of Medicinal Plants*. 2014. № 4 (5). P. 590-609.

169. The Study of *Daucus Carota* subsp. *Sativus* fruits fatty acid composition of 'Olenka', 'Kharkivska nantska' and 'Yaskrava' varieties / O. A. Kyslychenko, V. V. Protska, I. O. Zhuravel, V. V. Hutsol. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. № 9 (6). P. 307-312.

170. The Study of *Hosta sieboldiana*, *Hosta ventricosa* and *Hosta lancifolia* herb polyphenolic compounds by high performance liquid chromatography technique / O. A. Kyslychenko, V. V. Protska, I. O. Zhuravel, A. I. Fedosov et al. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2019. № 10. P. 1161-116.

171. Thoppil R., Bishayee A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology*. 2011. № 3 (9). P. 228-249.

172. Topical and oral administration of the natural water-soluble antioxidant from spinach reduces the multiplicity of papillomas in the Tg.AC mouse model / A. Nyska, L. Lomnitski, J. Spalding, D. B. Dunson et al. *Toxicology Letters*. 2001. № 122. P. 33-44.

173. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.) / M. Andjelkovic, A. Bunea, C. Socaciu, O. Bobis et al. *Food Chem.* 2008. № 108 (2). P. 649-56.

174. Tracking changes in chlorophyll and carotenoids in the production process

of frozen spinach purée / A. Mendelová, Ľ. Mendel, P. Czako, J. Mareček. *J Microbiol. Biotech. Food. Sci.* 2014. № 3 (3). P. 263-266.

175. Vdovenko S. A. Growing Spinate in the city in the conditions of the right of Belarusian forest of Ukraine. *Danish Scientific Journal*. 2020. № 36. P. 3-7.

176. Wróbel G., Kuder T. The role of selected environmental factors and the type of work performed on the development of urolithiasis – a review paper. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 2019. № 32 (6). P. 761-775.

177. Young A. J., Lowe G. L. Carotenoids – Antioxidant Properties. *Antioxidants (Basel)*. 2018. № 7 (2). P. 28-32.

178. Young I. S., Woodside J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001. № 54. P. 176-186.

179. Zangeneh M. M. Green synthesis and formulation a modern chemotherapeutic drug of *Spinacia oleracea* L. leaf aqueous extract conjugated silver nanoparticles; Chemical characterization and analysis of their cytotoxicity, antioxidant, and anti-acute myeloid leukemia properties in comparison to doxorubicin in a leukemic mouse model. *Appl Organometal Chem*. 2020. № 34. P. 5295-5311.

180. Zeb A., Ullah F. Effects of spinach leave extracts on quality characteristics and phenolic profile of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018. № 2018. P. 1800325-1800350.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення жирнокислотного складу в насінні шпинату городнього сорту «Фантазія». *Фітотерапія. Часопис*. 2017. № 3. С. 55-58. (Особистий внесок – огляд літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту).
2. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів в листі шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.). *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 28. С. 29-33. (Особистий внесок – огляд літературних джерел, планування та проведення експерименту, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів публікації).
3. Гриненко У. В., Журавель І. А. Идентификация и количественное определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях шпината огородного сортов «Красавец полесья» и «Фантазия». *Рецепт*. 2018. Т. 21, № 2. С. 226-230. (Особистий внесок – огляд літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту та комп'ютерна обробка матеріалів дослідження, підготовка матеріалів до друку).
4. Petrovska U. V., Zhuravel I. O., Hutsol V. V. Identification And Quantitative Content Determination Of Macro- And Microelements In Spinach Leaves, Seeds And Roots Of “Krasen’ Polissia” And “Fantasy” Cultivars. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. № 9 (6). P 530-534. (Особистий внесок – планування експерименту, пробопідготовка зразків сировини, аналіз та узагальнення результатів експерименту, комп'ютерна обробка результатів).
5. Гриненко У. В., Журавель І. О., Могильна О. М. Порівняльний аналіз жирнокислотного складу листя шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 30. С. 388-397. (Особистий внесок – планування експерименту, огляд літературних джерел, аналіз та узагальнення результатів експерименту, комп'ютерна обробка матеріалів дослідження).

Продовж. дод. А

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

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

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

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

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

Продовж. дод. А

11. Гриненко У. В. Количественное определение фенольных соединений в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Роль молодежи в развитии медицинской науки*: мат. XII научн.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году молодежи», г. Душанбе, 28 апреля 2017 г. Душанбе. 2017. С. 292-293.
12. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту флавоноїдів в листі шпинату городнього. *Промислова фармація: етапи становлення та майбутнє*: мат. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 29-30 вересня 2017 р. Харків. 2017. С. 35-37.
13. Grynenko U. V., Zhuravel I. O. Extractable matter determination in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Science and Practice: Abstracts of 8th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice Kaunas*, 15th of December 2017. Kaunas. 2017. P. 63-64.
14. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення технологічних параметрів для сировини шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження*: мат. І Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 5 квітня 2018 р. Харків. 2018. С. 41.
15. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення числових показників в сировині шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*: зб. наук. праць, вип. 4. Харків. 2018. С. 71.
16. Петровська У. В. Журавель І. О. Визначення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот в листі та насінні шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Інноваційний розвиток: освіта та наука XXI століття*: мат. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 19 червня 2018 р. Обухів. 2018. Т. 2. С. 92-93.

Продовж. дод. А

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

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

19. Петровська У. В., Журавель І. О. Кількісний вміст органічних кислот, аскорбінової кислоти та гідроксикоричних кислот в сировині шпинату городнього сорту Красень Полісся та Фантазія. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : мат. II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 11 березня 2020 р. Харків. 2020. С. 129.

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

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых *«Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017»* (г. Минск, 17-19 апреля 2017 г., форма участі – публікація тез);
2. 69-я итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых *«Актуальные вопросы современной медицины и фармации»* (г. Витебск, 19-20 апреля 2017 г., форма участі – публікація тез);
3. XII научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году молодежи» *«Роль молодежи в развитии медицинской науки»* (г. Душанбе, 28 апреля 2017 г., форма участі – публікація тез);
4. Міжнародній науково-практичній конференції *«Промислова фармація: етапи становлення та майбутнє»* (м. Харків, 29-30 вересня 2017 р., форма участі – публікація тез);
5. 8th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice *«Science and Practice»* (Kaunas, 15th of December 2017, форма участі – публікація тез);
6. I Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції *«Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження»* (м. Харків, 5 квітня 2018 р., форма участі – публікація тез);
7. Міжнародній науково-практичній конференції *«Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології»* (м. Харків, 2018 р., форма участі – публікація тез);
8. Міжнародній науково-практичній конференції *«Інноваційний розвиток: освіта та наука XXI століття»* (м. Київ, 19 червня 2018 р., форма участі – публікація тез);

Продовж. дод. А

9. I науково-практичній інтернет-конференції з міжнар. участю *«Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція»* (м. Харків, 18 жовтня 2018 р., форма участі – публікація тез);

10. Міжнародній науково-практичній конференції, присвячена пам'яті д. хім. н., проф. Н. П. Максютіної (до 95-річчя від дня народження) *«PLANTA+. Досягнення та перспективи»* (м. Київ, 20–21 лютого 2020 р., форма участі – публікація тез);

11. II Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції *«Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження»* (м. Харків, 11 березня 2020 р., форма участі – публікація тез).

Додаток Б

ПРОЄКТ



Перший проректор з науково-
педагогічної роботи Національного
фармацевтичного університету

А. І. Федосов

«*листопада*» 2020 р.

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет, Україна

Виробник, країна: Україна

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Spinaceae oleraceae folia

Шпинату городнього листя

Лікарська рослинна сировина у мішках з тканини або льно-джуто-кенафних

Продовж. дод. Б

утворився, відфільтровують і промивають водою до негативної реакції з 1 % розчином аргентуму нітрату.

Осад кальцію оксалату змивають з фільтру водою, додають гарячу 10 % сірчану кислоту через той же фільтр, щоб розчинити сліди оксалатів. Колбу з вмістом нагрівають до повного розчинення осаду, фільтр промивають гарячою водою.

Суміш титрують 0,1 н розчином калію перманганату до появи рожевого забарвлення. Вміст щавлевої кислоти (X, %) з урахуванням втрати в масі при висушуванні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V_{\text{KMnO}_4} \times T_{\text{KMnO}_4} \times 500 \times 100}{m \times 37 \times (100 - W)},$$

де V_{KMnO_4} – об'єм калію перманганатк, що пішов на титрування;

T_{KMnO_4} – титр калію перманганату за щавлевою кислотою;

m – маса наважки, г;

W – втрата в масі при висушуванні, %.

УПАКОВКА

Здрібнену сировину упаковують у мішки з тканини або льно-джуто-кенафні не більше 25 кг.

МАРКУВАННЯ

На етикетці мішка або тюка українською мовою вказують «Україна», «Розробка НФаУ, м. Харків», його товарний знак і адресу, назву сировини латинською та українською мовами, масу сировини при вологості 10%, умови зберігання, номер партії, термін придатності.

ЗБЕРІГАННЯ

У сухому, захищеному від світла місці.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Антимікробний засіб

Антиоксидантний засіб

Гепатопротекторний засіб

Професорка кафедри хімії
природних сполук і нутриціології,
доктор фармацевтичних наук,
професорка



І. О. Журавель

« 10 » лютого 2020 р.

Аспірантка кафедри хімії
природних сполук і нутриціології



У. В. Петровська

« 10 » лютого 2020 р.

Продовж. дод. Б

ПРОЄКТ



Перший проректор з науково-педагогічної роботи Національного фармацевтичного університету

А. І. Федосов

«12 жовтня» 2020 р.

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет,
Україна

Виробник, країна: Україна

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Spinaceae oleraceae foliorum extractum spissum

Шпинату городнього листя екстракт густий

Лікарський рослинний засіб у флаконах із темного скла

Продовж дод. Б

МАРКУВАННЯ

На етикетці мішка або тюка українською мовою вказують «Україна», «Розробка НФаУ, м. Харків», його товарний знак і адресу, назву сировини латинською та українською мовами, масу сировини при вологості 10%, умови зберігання, номер партії, термін придатності.

ЗБЕРІГАННЯ

У сухому, захищеному від світла місці.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Антимікробний засіб

Антиоксидантний засіб

Гепатопротекторний засіб

Професорка кафедри хімії
природних сполук і нутриціології,
доктор фармацевтичних наук,
професорка



І. О. Журавель

« 10 » лютого 2020 р.

Аспірантка кафедри хімії
природних сполук і нутриціології



У. В. Петровська

« 10 » лютого 2020 р.

Додаток В



Додаток Г

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи
(Укрмедпатентінформ)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№ 368- 2018

Випуск 52 з проблеми
«Фармація»
Підстава: рішення ЕПК «Фармація»
Протокол № 104 від 24.10.2018 р.

НАПРЯМ ВПРОВАДЖЕННЯ:
ФАРМАЦІЯ.

МАКРО- ТА МІКРОСКОПІЧНІ ОЗНАКИ ЛИСТЯ ПРИКОРЕНЕВОЇ
РОЗЕТКИ ШПИНАТУ ГОРОДНЬОГО (*SPINACIA OLERACEA* L.)

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

УКРМЕДПАТЕНТІНФОРМ
МОЗ УКРАЇНИ

А В Т О Р И:

ПЕТРОВСЬКА У.В.,
д. фарм. н., проф. ЖУРАВЕЛЬ І.О.,
д. фарм. н., проф. КИСЛИЧЕНКО В.С.

м. Київ

Додаток Д

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Вінницького національного
медичного університету ім. М. І.
Пирогова
проф. О.В. Власенко
« 5 » Вересня » 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати вивчення жирнокислотного складу в насінні шпинату городнього сорту «Фантазія».
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук, аспірант – Гриненко У.В.
3. **Джерела інформації:** Гриненко У. В. Визначення жирнокислотного складу в насінні шпинату городнього сорту "Фантазія" / У. В. Гриненко, І. О. Журавель // Фітотерапія. - 2017. - № 3. - С. 55-58.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармації Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
6. **Ефект від впровадження:** вдосконалення наукових досліджень хімічного складу лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2017-2018 навч. рік.

Завідувач кафедри фармації
Вінницького національного медичного
університету ім. М. І. Пирогова,
к. фарм. н., доцент

О. В. Кривов'яз

Продовж. дод. Д

УТВЕРЖДАЮ

Декан школы Фармации
 АО «Национальный медицинский
 университет»
 проф. Сакипова З.Б.
 « 14 февраля » 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Наименование предложений для внедрения:** Результаты исследования качественного состава и количественного содержания хлорофилла а, b и каротиноидов в листьях шпината огородного сортов «Красавец полесья» и «Фантазия».
 2. **Организация, автор:** Украина, Национальный фармацевтический университет, аспирант кафедры химии природных соединений - Гриненко У.В.
 3. **Источники информации:** У.В. Гриненко, И.А. Журавель. Идентификация и количественное определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях шпината огородного сортов «Красавец Полесья» и «Фантазия» / Рецепт. 2018. том 21. № 2. С. 226-230.
 4. **Где внедрено:** в учебный процесс кафедры химико-фармацевтических дисциплин АО «Национальный медицинский университет».
 5. **Форма внедрения:** научно-исследовательская работа.
 6. **Эффект от внедрения:** для углубления знаний по вопросам качественного состава и количественного содержания биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье.
 7. **Сроки внедрения:** 2018-2019 уч. год.
- Утверждено на заседании кафедры, протокол № 1 от « 9 » 02 2018 г.

Ответственный за внедрение:

профессор кафедры химико-фармацевтических
 дисциплин

Саякова Г.М.

Продовж. дод. Д

«Затверджую»

Директор Інституту підвищення
кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного
університету

проф. Пімінов О.Ф.

«*17*» «*січня*» 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати вивчення хлорофілів та каротиноїдів в листі шпинату городнього спектрофотометричним методом.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук, аспірант – Гриненко У.В.
3. **Джерела інформації:** Гриненко У.В., Журавель І. О. Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів в листі шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.) / Гриненко У.В., Журавель І. О. // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика. – 28/2017. – С. 29-33.
4. **Де впроваджено:** кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків, Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота, в лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** вдосконалення наукових досліджень хімічного складу лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2017-2018 навч. рік.

Завідувач кафедри якості, стандартизації
та сертифікації ліків ІПКСФ НФаУ
д. фарм. наук, проф.

С.В. Гарна

С.В. Гарна

Продовж. дод. Д

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи ПВНЗ «Київський медичний
університет»,
проф. Доан С.І.



«5» жовтня 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати дослідження мінерального складу сировини шпинату городнього сорту «Красень Полісся» та «Фантазія».
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології, аспірант – Петровська У.В.
3. **Джерела інформації:** Petrovska U. V. Identification And Quantitative Content Determination Of Macro- And Microelements In Spinach Leaves, Seeds And Roots Of "Krasen" Polissia" And "Fantasy" Cultivars / Uliana V Petrovska, Iryna O Zhuravel, Victoria V Hutsol // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2018. - №9(6). – P 530-534.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань хімічного складу лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2019-2020 навч. рік.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри фармацевтичної
і біологічної хімії, фармакогнозії
ПВНЗ «Київський медичний
університет»,
д.фарм.н., професор

О. Ю. Коновалова

Продовж. дод. Д



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор Національної
медичної академії післядипломної
освіти імені П. Л. Шупика
член-коресподент НАМН України,
професор Ю. П. Вдовиченко

«11» жовтня 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати визначення порівняльного аналізу жирнокислотного складу листя шпинату городнього сорту «Красень Полісся» та «Фантазія».
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології, аспірант – Петровська (Гриненко) У.В.
3. **Джерела інформації:** Гриненко У.В., Журавель І. О., Могильна О. М. Порівняльний аналіз жирнокислотного складу листя шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 30. С. 388-397.
4. **Де впроваджено:** кафедра контролю якості і стандартизації лікарських засобів.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань хімічного складу лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2019–2020 навч. рік.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри контролю якості і
стандартизації лікарських засобів
НМАПО імені П. Л. Шупика
к. фарм. н. доцент

С. Г. Убогов

Продовж. дод. Д

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи та інновацій
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця

професор _____ С.В. Земсков

«9» жовтня 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати вивчення кількісного вмісту протеїну та клітковини в листі та насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся та Фантазія.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології, аспірант – Петровська У.В.
3. **Джерела інформації:** У.В. Петровська, І.О. Журавель, В.В. Гуцол. Визначення кількісного вмісту протеїну та клітковини в листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія. *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 4. С. 56-58.
4. **Де впроваджено:** кафедра
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань хімічного складу лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2019-2020 навч. рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії та ботаніки
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця,
д.біол.н., професор

В.М. Мінарченко