

Національний університет «Львівська політехніка»

Міністерство освіти та науки України

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

Хропот Оксана Сергіївна

УДК 615.322:528.948.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИН РОДИНИ *RANUNCULACEAE*
ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН
В СИСТЕМІ *IN VITRO***

226 – Фармація, промислова 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

_____ О. С. Хропот

Науковий керівник: Новіков Володимир Павлович, доктор хімічних наук,
професор

Львів - 2021

АНОТАЦІЯ

Хронот О. С. Використання рослин родини *Ranunculaceae* для отримання біологічно активних речовин в системі *in vitro*. – Кваліфікаційна праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 - Фармація, промислова фармація. – Національний університет «Львівська політехніка», Львів, 2021.

Дисертаційну роботу присвячено одержанню калюсних біомас з введених в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., їх фітохімічному дослідженню та встановленню їх фармакологічної активності.

Аналіз наукових публікацій дозволив виявити, що рослини родини *Ranunculaceae*, зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*) містять значну кількість біологічно активних речовин, мають чисельні фармакологічні активності, здавна використовуються у народній медицині і є перспективною сировиною для виробництва фітопрепаратів. Однак, це рідкісні види лікарських рослин, запаси рослинної сировини є обмежені, і на українському ринку лікарських засобів (ЛЗ) на основі сировини *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. відсутні. Альтернативним джерелом одержання біомаси та продуктованих цими рослинами БАР є культивування в умовах *in vitro*. Використання методу клітинних культур дає можливість регулювати процес накопичення калюсної біомаси, оптимізувати умови вирощування з метою збільшення кількості цільового продукту, а також стандартизувати склад як лікарської сировини, так і готових фітопрепаратів.

Вперше для рослин родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. розроблено та науково обґрунтовано біотехнологічні підходи до одержання БАР в системі *in vitro*. Підібрано стерилізуючі агенти для максимального одержання життєздатних експлантів. Вивчено вплив регуляторів росту на ріст калюсної біомаси, встановлено умови культивування для кожної рослини з найвищим виходом

калюсної біомаси, підібрано схеми стратифікації та стерилізації, регулятори росту та їх концентрацію, отримано КБ з корневих, листових, стеблових, черешкових експлантів. При дослідженні культивування в *in vitro* *Anemone nemorosa* L. встановлено, що оптимальним середовищем для культивування є живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС) з 1,0 мг/л ІОК, 0,2 мг/л НОК, 0,1 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л К. Тривалість культивування 42 доби при температурі 23 °С та фотоперіоді 16/8 (світло/темрява). Встановлено, що приріст калюсної біомаси становить 35 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 42 добу культивування. Приріст калюсної біомаси залежав від співвідношення і концентрації регуляторів росту та типу експланту. При дослідженні культивування *in vitro* *Delphinium elatum* L. встановлено, що оптимальним середовищем для культивування є живильне середовище МС з додаванням 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК і 0,5 мг/л К. Тривалість культивування складає 50 діб при температурі 25°С і фотоперіоді 16/8 (світло/темрява), освітленні 2000 лк і відносній вологості 70%. Приріст калюсної біомаси складає 94 г сухої речовини на 1 л живильного середовища. При отриманні калюсної біомаси *Pulsatilla alba* Reichenb оптимальним для культивування є живильне середовище МС з додаванням регуляторів росту – 4,0 мг/л НОК і 1,0 мг/л К. Тривалість культивування складає 40 діб при температурі 25°С та 16 годинному фотоперіоді 16/8 (світло/темрява). Приріст біомаси складає 68 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 40 добу культивування. Ріст калюсної біомаси залежав від співвідношення та концентрації регуляторів росту та типу експланту.

Вперше встановлені оптимальні умови виділення комплексу БАР з КБ рослини родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb.

Встановлено оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Anemone nemorosa* L., а саме: подрібнення до розмірів частинок сировини 1-2 мм, як для КБ, так і для ЛРС, екстрагування 40% спиртом етиловим протягом 90 хв в колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:20. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС

становив $15,81 \pm 0,98$ %, з КБ - $15,83 \pm 0,92$ % становив $4,62 \pm 0,06$ %; поліфенолів з ЛРС - $4,62 \pm 0,6$ %, з КБ - $4,61 \pm 0,08$ % у перерахунку на суху речовину.

Вибрано наступні оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Delphinium elatum* L.: подрібнення сировини до розмірів частинок 1-2 мм для ЛРС та 2-3 мм для КБ, екстрагування 40% етиловим спиртом у колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі протягом 90 хв при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:20. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $11,81 \pm 0,38$ %, з КБ - $11,83 \pm 0,62$ %; поліфенолів з ЛРС - $4,52 \pm 0,06$ %, з КБ - $4,51 \pm 0,08$ % у перерахунку на суху речовину.

Встановлено наступні оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Pulsatilla alba* Reichenb.: подрібнення сировини до розмірів частинок 1-2 мм для ЛРС і 3-5 мм для КБ, екстрагування 70% етиловим спиртом у колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі протягом 120 хв при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:10. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $8,04 \pm 0,07$ %, з КБ - $8,01 \pm 0,27$ %; поліфенолів з ЛРС - $2,66 \pm 0,01$ %, з КБ - $2,68 \pm 0,19$ % у перерахунку на суху речовину.

В екстрактах з *Anemone nemorosa* L. *Delphinium elatum* L. *Pulsatilla alba* Reichenb. встановлено наявність фенольних сполук: флавоноїдів, дубильних речовин, гідроксикоричних кислот, гідрохінон похідних, алкалоїдів, антоціанів; Ці сполуки присутні як в екстрактах з ЛРС, так і в екстрактах з КБ.

Визначено аналітичними методами у зразках екстрактів сумарний вміст фенольних сполук: $1,2289 \pm 0,01$ мг/мл у ЛРС і $1,2186 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *A. nemorosa* L., $2,6230 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $2,4478 \pm 0,01$ мг/мл у КБ *D. elatum* L., $4,4631 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $4,2502 \pm 0,01$ мг/мл у КБ *P. alba* Reichenb.; вміст флавоноїдів: $0,0350 \pm 0,01$ мг/мл у ЛРС і $0,0324 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *A. nemorosa* L., $2,0389 \pm 0,01$ у ЛРС і $1,9883 \pm 0,02$ у КБ *D. elatum* L., $3,7603 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $3,4785 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *P. alba* Reichenb.; вміст дубильних речовин: $1,46 \pm 0,02$ % у ЛРС і $1,50 \pm 0,02$ % у КБ *A. nemorosa* L., $3,28 \pm 0,02$ % у ЛРС і $3,16 \pm 0,03$ % у КБ *D. elatum* L., $2,04 \pm 0,02$ % у ЛРС і $2,00 \pm 0,02$ % у КБ *P. alba* Reichenb.; сумарний вміст

гідроксикоричних: $1,71 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $1,69 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $2,06 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $2,09 \pm 0,03\%$ у КБ *D. elatum* L., $3,09 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $2,98 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.; сумарний вміст гідрохінонпохідних: $0,47 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,45 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $1,71 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $1,68 \pm 0,02\%$ у КБ *D. elatum* L., $0,96 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,91 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.; вміст антоціанів $0,032 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,029 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $0,050 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,043 \pm 0,03\%$ у КБ *D. elatum* L., $0,024 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,022 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.

Проведено порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у екстрактах КБ та ЛРС методами ГРХ, ВЕРХ та ТШХ. За результатами ТШХ в екстрактах ЛРС і КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. ідентифіковані в екстрактах КБ сполуки є такими ж, як сполуки в екстрактах ЛРС. Методом ВЕРХ у екстрактах КБ та ЛРС визначено практично рівноцінний якісний і кількісний вміст сполук фенольного характеру, що потенційно дозволяє вважати КБ альтернативною сировиною для одержання БАР.

Досліджено компонентний склад летких фракцій екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. та проведено їх порівняльний аналіз. Вміст виявлених речовин в екстрактах КБ *Anemone nemorosa* L. (ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени) є достатнім та практично рівноцінним з вмістом виявлених БАР в екстрактах ЛРС, що дозволяє використання КБ як сировини для одержання БАР. Визначені речовини в екстрактах КБ та ЛРС *D. elatum*, *P. alba* є в достатній кількості, проте відрізняються за компонентним складом.

Проведено порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у екстрактах КБ та ЛРС методами ВЕРХ та ТШХ. За результатами ТШХ в екстрактах ЛРС і КБ *A. nemorosa*, *D. elatum*, *P. alba* ідентифіковані в екстрактах КБ сполуки є такими ж, як сполуки в екстрактах ЛРС. Методом ВЕРХ у екстрактах КБ та ЛРС *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum* та *Pulsatilla alba* визначено практично рівноцінний якісний і кількісний вміст сполук фенольного характеру, що потенційно дозволяє вважати КБ альтернативною сировиною для одержання БАР.

Досліджено компонентний склад летких фракцій екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. та проведено їх порівняльний аналіз методом ГРХ. В досліджуваних екстрактах *Anemone nemorosa* L. ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени; в екстрактах *Pulsatilla alba* Reichenb. - ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, похідні тіазолу, бенздіазипіну, нафталіну та терпену; в досліджуваних екстрактах *Delphinium elatum* L. ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, аміди, монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, нафталіну, тіазолу, бенздіазипіну та невелика кількість терпену. Визначені речовини у складі летких фракцій КБ та ЛРС *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. є в достатній кількості, проте відрізняються за компонентним складом.

Результати дослідження гострої токсичності екстрактів рослинної сировини і калюсної біомаси *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. свідчать про відсутність будь-яких токсичних проявів при внутрішньошлунковому введенні в дозах 5000, 10000 та 15000 мг/кг на білих щурах, що дозволяє віднести їх до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини).

На підставі вивчення гепатопротекторної дії екстрактів ЛРС і КБ *A. nemorosa*, *D. elatum*, *P. alba* в експериментах *in vivo* на моделі тетрахлорметанового гострого токсичного гепатозу встановлено що екстракти А-2, А-21, D-2, D-21, D-3, D-31 не проявили гепатопротекторного ефекту, тоді як, екстракти А-3, А-31, С-2, С-21, С-3, С-31 виявляли помірні гепатопротекторні властивості та частково сприяли нормалізації функції печінки і могли б бути ефективним в якості профілактичного лікарського засобу для тривалого застосування при токсичних ураженнях.

Досліджено гіпоазотемічну активність екстрактів КБ і ЛРС *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. Встановлено, що тестовані екстракти володіють виразним діуретичним ефектом та позитивним впливом на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів сечовини та креатиніну. При застосуванні

тестованих екстрактів відмічено динаміку до покращення функції нирок, про що свідчить нормалізація рівнів іонізованого натрію як в плазмі крові так і сечі дослідних тварин.

Серед тестованих екстрактів ЛРС і КБ *P. alba* найкращий рівень протизапальної активності мали зразки С-3 та С-31, показники пригнічення запальної реакції яких становили 27% та 26,2% відповідно, що дещо поступається референс-препаратам (на 10 та 17 % кетанов та диклофенаку натрію, відповідно), проте є доволі хорошим показником для рослинних протизапальних засобів. Задовільний рівень антиексудативного ефекту також проявили екстракти *D. elatum* L. D-3 та D-31, які мають показники пригнічення запального процесу 17,4 та 17,03% відповідно.

Всі досліджувані екстракти мають антиоксидантні властивості, оскільки їх дія проявлялась у зниженні маркерів радикал поглинальної активності. При проведенні дослідження антиоксидантної активності екстрактів встановлено, що найбільшу ступінь інактивації ДФПГ проявляють 40% спиртові екстракти екстракти *D. elatum*, *P. alba* та екстракти *A. nemorosa* виготовлені з використанням 70% етанолу.

Вивчено протимікробну та протигрибкову активність екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. на 10 референс-культурах та 4 клінічних ізолятах мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з інфекціями пов'язаними з наданням медичної допомоги. Відповідно до кількісних показників результатів дослідження найбільш виражену протимікробну дію проявили екстракти КБ та ЛРС *D. elatum* L. Встановлено, що кращу протигрибкову дію проявили 70% екстракти ЛРС та КБ *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb.

Вивчено інгібуючу дію досліджуваних екстрактів на агрегацію тромбоцитів. Найкращий результат антитромботичної активності показали екстракти А-3, А-31, С-2, С-21, С-3, С-31, які при розведенні у 2 рази інгібували АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів не менше ніж на половину.

На основі проведених фітохімічних, фармакологічних, біотехнологічних досліджень доведено можливість та доцільність використання КБ досліджуваних видів рослин як рівноцінної лікарської сировини.

Здійснено стандартизацію одержаних калюсних біомас та екстрактів *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. Результати експериментальних досліджень впроваджені в навчальний процес вищих навчальних закладів.

Ключові слова: *Ranunculaceae*, *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., калюсна біомаса, екстракт, біологічна активність і фармакологічна дія.

ANNOTATION

Khropot O. S. The use of plants of the family *Ranunculaceae* to obtain biologically active substances in the *in vitro* system. - Qualification work on the rights of the manuscript.

The dissertation on achieving the scientific degree of Doctor of Philosophy, specialty 226 - Pharmacy, industrial pharmacy. - Lviv Polytechnic National University, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to obtaining the callus biomass of *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* introduced into a culture *in vitro*, their complex phytochemical study, and determination of their pharmacological activity.

According to the analysis of scientific publications, plants of the *Ranunculaceae* family, in particular, *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*) contain a significant amount of biologically active substances and characterized by numerous pharmacological activities. These plants have long been used in folk medicine and are promising raw materials for the production of phytopreparations. However, these medicinal plants are rare species, stocks of their raw materials are limited, and medicinal preparations based on *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. are absent in the Ukrainian market of drugs. An alternative source of biomass and BAS produced by these plants is *in vitro* cultivation. The use of the cell culture method makes it possible to regulate the callus biomass accumulation,

optimize growing conditions to increase the amount of the target product, as well as to standardize the composition of both medicinal raw materials and finished phytopreparations.

For the first time for a plant of the family Ranunculaceae: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., and *Pulsatilla alba* Reichenb., biotechnological approaches to the production of BAS *in vitro* have been developed and scientifically substantiated. Sterilizing agents have been selected for maximum obtaining of viable explants. The influence of growth regulators on callus biomass was studied, cultivation conditions were developed for each plant and the highest callus biomass yield, stratification and sterilization schemes, growth regulators, and their concentration were selected, CB from root, leaf, stem, petiole explants were obtained.

For *in vitro* cultivation of *Anemone nemorosa* L. it has found that the optimal medium is a nutrient medium Murashige-Skoog (MS) with 1.0 mg / l IOC, 0.2 mg / l NOC, 0.1 mg / l 2,4-D, and 0.5 mg / l K. The duration of cultivation was 42 days at a temperature of 23 °C and a photoperiod of 16/8 (light/dark). It was revealed that the increase of callus biomass is 35 g of dry matter per 1 liter of nutrient medium for 42 days of cultivation. The increase of callus biomass depended on the ratio and concentration of growth regulators and the type of explant. For *in vitro* cultivation of *Delphinium elatum* L. the optimal medium was a nutrient medium MS with the addition of 1.0 mg / l IOC, 0.2 mg / l NOC, and 0.5 mg / l K. The duration of cultivation was 50 days at a temperature of 25 ° C and a photoperiod of 16/8 (light/dark), illumination of 2000 lux and relative humidity of 70%. The increase of callus biomass was 94 g of dry matter per 1 liter of nutrient medium. For obtaining of callus biomass of *Pulsatilla alba* optimal is a nutrient medium MS with the addition of growth regulators - 4.0 mg / l NOC and 1.0 mg / l K. The duration of cultivation was 40 days at a temperature of 25 ° C and 16-hour photoperiod 16 / 8 (light/dark). The increase of biomass was 68 g of dry matter per 1 liter of nutrient medium for 40 days of cultivation. The growth of callus biomass depended on the ratio and concentration of growth regulators and the type of explant.

For the first time, the optimal conditions for the isolation of the BAS complex from the CB of plants of the *Ranunculaceae* family: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., and *Pulsatilla alba* Reichenb. were developed.

The optimal conditions for obtaining extracts from medicinal plant raw materials (MPRM) (grass) and CB *Anemone nemorosa* L., namely: grinding to a particle size of 1-2 mm, for both CB and MPRM, extraction with 40% ethyl alcohol for 90 minutes in a flask on a water heater under reflux at a ratio 1:20 (raw material/extractant). Under these conditions, the content of extracted BAS from LRS MPRM was $15.81 \pm 0.98\%$, from CB - $15.83 \pm 0.92\%$; polyphenols with MPRM - $4.62 \pm 0.06\%$, with CB - $4.61 \pm 0.08\%$ in terms of dry matter.

The optimal conditions for obtaining extracts from MPRM (grass) and CB *Pulsatilla alba* Reichenb. are as follows: grinding of raw materials to particle sizes of 1-2 mm for MPRM and 3-5 mm for CB, extraction with 70% ethyl alcohol in a flask on a water heater under reflux for 120 min at a ratio 1:10 (raw material/extractant). Under these conditions, the content of extracted BAS from MPRM was $8.04 \pm 0.07\%$, from CB - $8.01 \pm 0.27\%$; polyphenols from MPRM - $2.66 \pm 0.01\%$, from CB - $2.68 \pm 0.19\%$ in terms of dry matter.

There are such phenolic compounds as flavonoids, tannins, hydroxycinnamic acids, hydroquinone derivatives, alkaloids, and anthocyanins in the extracts of *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. These compounds are present in both MPRM and CB extracts.

The total content of phenolic compounds in the extracts was determined by analytical methods: $1,2289 \pm 0,01$ mg / ml in MPRM and $1,2186 \pm 0,02$ mg / ml in CB *A. nemorosa* L., $2,6230 \pm 0.02$ mg / ml in MPRM and $2,4478 \pm 0.01$ mg / ml in CB *D. elatum* L., $4,4631 \pm 0.02$ mg / ml in MPRM and $4,2502 \pm 0.01$ mg / ml in CB *P. alba* Reichenb.; flavonoid content: 0.0350 ± 0.01 mg / ml in MPRM and 0.0324 ± 0.02 mg / ml in CB *A. nemorosa* L., $2,0389 \pm 0.01$ in MPRM and $1,9883 \pm 0.02$ in CB *D. elatum* L., $3,7603 \pm 0.02$ mg / ml in MPRM and $3,4785 \pm 0.02$ mg / ml in CB *P. alba* Reichenb.; tannin content: $1.46 \pm 0.02\%$ in MPRM and $1.50 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $3,28 \pm 0.02\%$ in MPRM and $3,16 \pm 0.03\%$ in CB *D. elatum* L., $2,04 \pm$

0.02 % in MPRM and $2.00 \pm 0.02\%$ in CB *P. alba* Reichenb.; total hydroxycinnamic content: $1.71 \pm 0.02\%$ in MPRM and $1.69 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $2.06 \pm 0.02\%$ in MPRM and $2.09 \pm 0.03\%$ in CB *D. elatum* L., $3.09 \pm 0.02\%$ in MPRM and $2.98 \pm 0.02\%$ in CB *P. alba* Reichenb.; total content of hydroquinone derivatives: $0.47 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.45 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $1.71 \pm 0.02\%$ in MPRM and $1.68 \pm 0.02\%$ in CB *D. elatum* L., $0.96 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.91 \pm 0.02\%$ in CB *P. alba* Reichenb.; anthocyanin content $0.032 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.029 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $0.050 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.043 \pm 0.03\%$ in CB *D. elatum* L., $0.024 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.022 \pm 0.02\%$ in *P. alba* Reichenb.

A comparative analysis of the phenolic compounds in CB and MPRM extracts by high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC) was performed. According to the results of TLC identified compounds in the extracts of CB are the same as the compounds in the extracts of MPRM from *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb.

The almost equivalent qualitative and quantitative content of phenolic compounds was determined by HPLC method in the extracts of CB and MPRM, which potentially allows considering CB as an alternative raw material for the production of BAS.

The composition of volatile fractions of MPRM and CB extracts of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. was studied and their comparative analysis was performed. The content of detected substances in the extracts of CB of *Anemone nemorosa* L. (identified 32 compounds: paraffinic hydrocarbons, esters, aldehydes of fatty acids and terpenes) is sufficient and almost equivalent to the content of detected BAS in MPRM extracts, that allows the use of CB as a raw material for BAS obtaining. Certain substances in the extracts of CB and MPRM *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* are insufficient quantities but differ in their composition. A comparative analysis of the content of phenolic compounds in the extracts of CB and MPRM was conducted by HPLC and TLC. According to the results of TLC, the compounds identified in the extracts of CB are the same as the compounds in the extracts of MPRM from *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*.

The almost equivalent qualitative and quantitative content of phenolic compounds was determined by HPLC in extracts of CB and MPRM of *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. and *Pulsatilla alba* Reichenb., which potentially allows considering CB as an alternative raw material for the production of BAS.

The composition of volatile fractions of MPRM and CB extracts of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. was studied and their comparative analysis was performed by GC method. In the studied extracts of *Anemone nemorosa* L. 32 compounds were identified: paraffinic hydrocarbons, esters, fatty acid aldehydes and terpenes.

38 volatile compounds were identified in *Pulsatilla alba* Reichenb. extracts: higher fatty acids, fatty acid esters, monocyclic and bicyclic monoterpenoids, saturated hydrocarbons (alkanes), morphine derivatives, thiazole derivatives, benzdiazepine, naphthalene and terpene. 38 volatile compounds were identified in the studied extracts of *Delphinium elatum* L.: higher fatty acids, fatty acid esters, amides, monoterpenoids, saturated hydrocarbons (alkanes), derivatives of morphine, naphthalene, thiazole, benzdiazepine and a small amount of terpene. Certain substances in the volatile fractions of CB and MPRM of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. are in sufficient quantities but differ in their composition. The study of acute toxicity of plant raw material extracts and callus biomass of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. indicate the absence of any toxic manifestations in white rats after administration intragastrically at doses of 5000, 10000 and 15000 mg/kg, that allows to carry them to the VI class of toxicity (rather harmless substances).

The hepatoprotective effect of extracts of MPRM and CB of *Anemone nemosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* were studied in experiments in vivo on a model of carbon tetrachloride acute toxic hepatitis. These results did not show a hepatoprotective effect for extracts A-2, A-21, D-2, D-21, D-3, D-31, whereas extracts A-3, A-31, C-2, C-21, C-3, C-31 had a moderate hepatoprotective effect and partially normalized the liver function. Therefore, these extracts could be effective as a prophylactic preparation for long-term use in toxic lesions.

The hypoazotemic activity of CB and MPRM extracts of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. was studied. It was found that the tested extracts have a pronounced diuretic effect and positively influenced the excretion of nitrogenous metabolites of urea and creatinine in white rats. After using the tested extracts, the dynamics to the improvement of renal function was noted, as evidenced by the normalization of ionized sodium levels in both blood plasma and urine of experimental animals.

Among the tested extracts of MPRM and CB *P. alba*, the best anti-inflammatory activity was found for samples C-3 and C-31, the level of suppression of the inflammatory response was 27% and 26.2%, respectively. These result is slightly inferior to reference drugs (10 and 17% for ketanov and diclofenac sodium, respectively), but is good for herbal anti-inflammatory drugs. The anti-exudative effect was also shown for extracts of *D. elatum* L. D-3 and D-31, which suppress the inflammatory process on 17.4 and 17.03%, respectively.

The study of the antioxidant activity of extracts of MPRM and CB of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. has found that the highest degree of inactivation of DFPG was for 40% alcohol extracts of *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*, and 70% ethanol extracts of *Anemone nemorosa*.

The antimicrobial and antifungal activity of extracts of MPRM and CB of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. on 10 reference cultures and 4 clinical isolates from patients with infections related to medical care were studied. According to the quantitative indicators of the results of the study, the most pronounced antimicrobial effect was shown in extracts of CB and MPRM of *D. elatum* L. It was found that the best antifungal effect was found for 70% extracts of MPRM and CB of *D. elatum* L. and *P. alba* Reichenb.

The inhibitory effect of the studied extracts on platelet aggregation was studied. The best result of antithrombotic activity was shown in extracts A-3, A-31, C-2, C-21, C-3, C-31. These twice-diluted extracts inhibited ADP-dependent platelet aggregation by at least half.

The possibility and expediency of using the CB of the studied plants as equivalent medicinal raw materials is proved based on the phytochemical, pharmacological, and biotechnological studies.

The results of experimental study are introduced into the educational process of higher educational institutions.

Key words: *Ranunculaceae*, *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., callus biomass, extract, biological activity and pharmacological effect.

Список публікацій здобувача

1. Konechna R., Khropot O., Petrina R., Kurka M., Gubriy Z., Novikov V. Research of antioxidant properties of extracts of the plants and the callus biomass // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2017. – Том 10 № 7. – С. 182–185. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, узагальнення та обробка одержаних результатів, підготовка статті*).

2. Khropot O., Konechnyi Y., Polish N., Konechna R., Bazavluk Y., Korniychuk O., Novikov V. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. // *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 7, iss. 2. – P. 153–159. (*Особистий внесок здобувача: проведення процесу екстракції, аналіз результатів, написання статті*).

3. Лук'янчук А., Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд // *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. – 2017. – № 3 (7). – С. 38–42. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел і теоретичні відомості про сировину, оформлення статті*).

4. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Голота С. М., Пошивак О. Б., Нектегаєв І. О., Піняжко О. Р., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) // *Фармацевтичний часопис*. – 2019. – № 2 (50). – С. 60–66. (*Особистий внесок здобувача: брала участь у пробонідготовці зразків*

сировини, аналіз літературних джерел та результатів дослідження, оформлення матеріалів статті).

5. О. Хропот, Є. Базавлук, Р. Конечна, І. Губицька, Ю. Конечний, І. Ясіцька-Місяк, П. Вечорек, В. Новіков. Одержання та дослідження калюсної маси *Delphinium elatum* // Фармацевтичний часопис. – 2020. – №2. – С. 5–15. (Особистий внесок здобувача: брала участь у пробопідготовці зразків сировини, проведенні експериментальних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).

6. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Червцова В. Г., Новіков В. П. Введення в культуру *in vitro Delphinium elatum* та перспективи використання калюсної біомаси в гомеопатії // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 2. – С. 58–61. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, вирощування калюсу, оформлення результатів).

7. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П., Ясіцька-Місяк І., Вечорек П. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemone nemorosa* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 3. – С. 171–173. (Особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, оформлення статті).

8. Гриців С. В., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Петріна Р. О., Новіков В. П. Культивування деяких рідкісних та зникаючих видів лікарської флори Українських Карпат в умовах *in vitro* // Хімічна технологія та інженерія : збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції (Україна, Львів, 26–30 червня 2017 р.). – 2017. – С. 406–407. (Особистий внесок здобувача: культивування рослин в умовах *in vitro*).

9. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Альтернативний біотехнологічний метод одержання біомаси *Delphinium elatum* // Біологічні дослідження – 2017 : збірник наукових праць VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (14–16

березня 2017). – 2017. – С. 332–333. (*Особистий внесок здобувача: підір умов для одержання біомаси та оформлення тез*).

10. Lukianchuk A., Shikula S., Khropot O., Konechnyi Y., Hamada V., Konechna R., Mylianych A., Korniychuk O., Novikov V. Antimicrobial activity of extracts of windflower (*Anemone nemorosa* L.) // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції (29–30 вересня 2017 р., Харків). – 2017. – С. 11–12. (*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності анемони та оформлення тез згідно з вимогами*).

11. Гриців С., Хропот О., Конечна Р., Петріна Р. Культивування рослин родини *Ranunculaceae* // Біотехнологія XXI століття : матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 24. (*Особистий внесок здобувача: підір умов для культивування рослин*).

12. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П. Використання *Anemone nemorosa* в фармакотерапії захворювань людини, проблеми та перспективи // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 202. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та підготовка тез згідно вимог*).

13. Колб Ю. І., Гриців С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Перспективи використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* у фармації // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 165–166. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та отримання калюсів*).

14. Гриців С. В., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Біотехнологічне дослідження *Delphinium elatum* // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада

2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 279–280. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та підготовка тез до друку згідно вимог*).

15. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Можливість застосування *Pulsatilla alba* у косметології та фармації // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 284. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел*).

16. Хропот О. С., Конечна Р. Т., Конечний Ю. Т., Шикуча С. І., Тимчук І. В. Протимікробна активність *Delphinium elatum* L. // Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Чернівці, 29 січня 2018 року). – 2018. – С. 126–128. (*Особистий внесок здобувача: вивчення протимікробної активності*).

17. Конечний Ю. Т., Хропот О. С., Базавлук Є. В., Гамада В. Р., Корнійчук О. П., Шикуча Р. Г., Конечна Р. Т., Журахівська Л. Р., Новіков В. П. Дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.). – 2018. – С. 25–27. (*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності та дослідження вмісту фенольних сполук*).

18. Гамада В. Р., Хропот О. С., Кривавич А. С., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Аспекти біотехнології у розробці нових функціональних харчових продуктів // Стан і перспективи харчової науки та промисловості: тези доповідей V Міжнародної науково-технічної конференції, 10–11 жовтня 2019 р., Тернопіль. – 2019. – С. 126–127. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел*).

19. Базавлук Є. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Новіков В. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Delphinium elatum* L. // Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження :

матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 11 березня 2020 року, м. Харків. – 2020. – С. 21–22. (*Особистий внесок здобувача: дослідження вмісту фенольних сполук*).

20. Базавлук Є.В., Хропот О.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П., Шикула С.І., Конечний Ю.Т. Оцінка антимікробного потенціалу *Delphinium elatum L.*// Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances: матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, 23-25 квітня 2020, м.Київ, 2020 – С.88-91. (*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності*).

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БАР – біологічно активні речовини;
6-БАП – 6-бензиламінопурин;
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
ГК – гіберелова кислота;
ГРХ – газорідинна хроматографія;
ДФПГ – 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил;
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота;
ЖС – живильне середовище;
ІОК – індолил-3-оцтова кислота;
КБ – калюсна біомаса;
Кін – кінетин;
Лк – люкс;
ЛРС – лікарська рослинна сировина;
МКЯ – методи контролю якості;
МС – Мурасиге-Скуга;
НОК – 1-нафтилоцтова кислота;
ТШХ – тонкошарова хроматографія;
УФ – ультрафіолетове випромінювання.

Скорочені назви екстрактів

- A-2 - 40 % спиртовий екстракт (1:40) з ЛРС *A. nemorosa* L.
A-21 - 40 % спиртовий екстракт (1:40) з КБ *A. nemorosa* L.
A-3 - 70 % спиртовий екстракт (1:40) з ЛРС *A. nemorosa* L.
A-31 - 70 % спиртовий екстракт (1:40) з КБ *A. nemorosa* L.
D-2 - 40 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС *D. elatum* L.
D-21 - 40 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ *D. elatum* L.
D-3 - 70 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС *D. elatum* L.
D-31 - 70 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ *D. elatum* L.
P-2 - 40 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС *P. Alba*
P-21 - 40 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ *P. Alba*
P-3 - 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *P. alba*
P-31 - 70 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *P. Alba*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 РОСЛИНИ РОДИНИ <i>RANUNCULACEAE</i> – ПЕРСПЕКТИВНІ ОБ'ЄКТИ ФАРМАКОГНОСТИЧНИХ ТА БИОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ (Літературний огляд)	31
1.1. Лікарські рослини родини <i>Ranunculaceae</i> <i>Juss.</i> як об'єкт фармакогностичних досліджень	31
1.2. Ботанічна характеристика, розповсюдження, хімічний склад, застосування у народній та науковій медицині <i>Anemone nemorosa</i> <i>L.</i>	36
1.3. Ботанічна характеристика, розповсюдження, хімічний склад, застосування у народній та науковій медицині <i>Delphinium elatum</i> <i>L.</i>	41
1.4. Ботанічна характеристика, розповсюдження, хімічний склад, застосування у народній медицині <i>Pulsatilla alba</i> <i>Reichenb.</i>	45
1.5. Культивування рослин родини <i>Ranunculaceae</i> <i>Juss.</i> в умовах <i>in vitro</i> .	49
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1	52
2 РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ (експериментальна частина)	54
2.1. Загальна методологія досліджень	54
2.2. Об'єкти дослідження.	56
2.3. Методи та методики досліджень.	56
2.3.1. Визначення параметрів та показників якості лікарської рослинної сировини.	56
2.3.2. Введення в культуру <i>in vitro</i> <i>Anemone nemorosa</i> <i>L.</i> , <i>Delphinium elatum</i> <i>L.</i> , <i>Pulsatilla alba</i> <i>Reichenb.</i>	58

2.3.3.	Стандартизація калюсної біомаси.	60
2.3.4.	Методики одержання екстрактів <i>Anemone nemorosa</i> L., <i>Delphinium elatum</i> L., <i>Pulsatilla alba</i> Reichenb.	60
2.3.5.	Методики визначення стандартних показників екстрактів	62
2.3.6.	Дослідження якісного складу екстрактів	62
2.3.7.	Кількісні визначення БАР	64
2.3.7.1.	Кількісний вміст суми фенолів	64
2.3.7.2.	Кількісне визначення флавоноїдів.	65
2.3.7.3.	Кількісне визначення гідроксикоричних кислот.	65
2.3.7.4.	Кількісне визначення антоціанів.	66
2.3.7.5.	Кількісне визначення дубильних речовин.	67
2.3.7.6.	Кількісне визначення гідрохінонпохідних сполук.	68
2.3.7.7.	Високоєфективна рідинна хроматографія	69
2.3.7.8.	Газова хроматографія	69
2.3.8.	Визначення антиоксидантної дії екстрактів	70
2.3.8.1.	Визначення сумарної антиоксидантної дії екстрактів	70
2.3.8.2.	Визначення часткової антиоксидантної дії екстрактів	71
2.3.9.	Мікробіологічні дослідження	72
2.3.9.1.	Відсутність мікробної контамінації	72
2.3.9.2.	Визначення протимікробної та протигрибкової активності екстрактів	73
2.3.10.	Визначення гострої токсичності	75
2.3.11.	Дослідження фармакологічної активності	75
	ВИСНОВИ ДО РОЗДІЛУ 2	76
	РОЗДІЛ 3.	77
	ОДЕРЖАННЯ КАЛЮСНОЇ БІОМАСИ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН РОДИНИ <i>RANUNCULACEAE</i> : <i>ANEMONE NEMOROSE</i> L., <i>DELPHINIUM ELATUM</i> L., <i>PULSATILLA ALBA REICHENB.</i>	

3.1.	Одержання калюсної біомаси <i>Anemone nemorosa</i> L.	79
3.2.	Одержання калюсної біомаси <i>Delphinium elatum</i> L.	85
3.3.	Одержання калюсної біомаси <i>Pulsatilla alba</i> Reichenb	90
	ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3	97
	РОЗДІЛ 4	99
	ЕКСТРАКЦІЯ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ І КАЛЮСНИХ БІОМАС ДОСЛІДЖУВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН	
4.1.	Підбір умов екстракції рослинної сировини <i>Anemone nemorosa</i> L., <i>Delphinium elatum</i> L., <i>Pulsatilla alba</i> Reichenb та їх калюсних біомас	99
4.2.	Стандартизація екстрактів з рослинної сировини <i>Anemona</i> <i>nemorosae</i> L. , <i>Delphinium elatum</i> L., <i>Pulsatilla alba</i> Reichenb та їх калюсних біомас	108
	ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4	109
	РОЗДІЛ 5.	111
	ФІТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ, КАЛЮСНИХ БІОМАС ТА ЕКСТРАКТІВ <i>ANEMONE</i> <i>NEMOROSA</i> L., <i>DELPHINIUM ELATUM</i> L., <i>PULSATILLA ALBA</i> REICHENB	
5.1.	Первинна оцінка вмісту БАР у екстрактах з ЛРС та КБ	111
5.2.	Ідентифікація та кількісне визначення БАР методом високоєфективної рідинної хроматографії.	113
5.3.	Кількісні визначення БАР аналітичними методами	115
5.4.	Хромато-мас-спектрометрія.	116
	ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5	120
	РОЗДІЛ 6	123
	БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ І ФАРМАКОЛОГІЧНА ДІЯ ЕКСТРАКТІВ	
6.1.	Вивчення гострої токсичності екстрактів	123

6.2.	Дослідження гепатопротекторної активності	125
6.3.	Дослідження гіпоазотемічної активності	129
6.4.	Дослідження протизапальної активності	135
6.5.	Антиоксидантна активність екстрактів	138
6.6.	Вивчення протимікробної та протигрибкової активності	139
6.7.	Вивчення антитромботичної активності	145
	ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 6	147
	ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	150
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	154
	ДОДАТКИ	177

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Асортимент українського ринку рослинних препаратів складає понад дві тисячі на рік. Серед них фітопрепарати, субстанції рослинного походження, лікарські засоби (ЛЗ) на основі біологічно активних речовин (БАР), отриманих із лікарської рослинної сировини (ЛРС). На фармацевтичному ринку України від 30 до 50% усіх лікарських препаратів (ЛП) виготовляється із сировини рослинного походження. При лікуванні деяких захворювань частка рослинних препаратів становить 80-90% від загальної кількості ліків. Актуальним завданням сьогодення для фармації є пошук перспективних рослин серед представників української флори. Рослинність Карпат надзвичайно багата та різноманітна, чимало представників карпатської флори мають корисні та цілющі властивості, тому протягом багатьох століть їх застосовують у народній медицині. Серед рослин, які поширені в Карпатах, зустрічаються релікти, ендеміки, а також рідкісні та зникаючі види, що потребують охорони та заходів щодо їх збереження. Рослини родини *Ranunculaceae*, зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. є представниками такої флори та перспективними об'єктами для досліджень.

Це унікальні, надзвичайно рідкісні та одні з найпопулярніших лікарських рослин Українських Карпат, які активно використовуються народною медициною. На українському ринку лікарських препаратів відсутні лікарські засоби на основі сировини *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., оскільки це рідкісні види лікарських рослин, що знаходяться на межі вимирання. Обсяги лікарської рослинної сировини дуже обмежені та не підлягають комерційному використанню. Сировинні запаси в Україні недостатні для ведення промислової заготівлі для близько 650 видів лікарських рослин, для майже 100 видів сировинні запаси відсутні.

Певний внесок у вирішення проблеми поповнення ресурсів лікарських рослин робить біотехнологія, яка використовує клітини, живі організми та біологічні процеси з метою одержання вискоєфективної продукції з

запрограмованими властивостями. Останнім часом поширюються технології промислового вирощування *in vitro* на штучних живильних середовищах ізольованих від рослини клітин, тканин та органів. Ці технології дають можливість використовуючи ізольований стан об'єктів культивування в умовах *in vitro*, керувати диференціацією та морфогенезом рослини, спрямовувати їх на досягнення визначених цілей, проводити генетичну трансформацію.

Зміна парадигми лікування, розуміння доцільності комплексного впливу на різні ланки патологічного ланцюга, відмова від монотерапії призводять до збільшення значення фітопрепаратів, які за визначенням містять комбінацію різноманітних БАР, здатних спричинити синергічний ефект, що значно посилюється при поєднанні двох і більше рослинних компонентів.

Тому пошук і розробка нових шляхів одержання та використання рослин родини *Ranunculaceae* для отримання БАР в системі *in vitro* є актуальним завданням сучасної фармації. Одержання альтернативних сировинних джерел БАР - калюсних біомас з введених в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., їх комплексне фітохімічне дослідження та встановлення їх фармакологічної активності дозволить збільшити арсенал ЛЗ на фармацевтичному ринку України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана як частина фундаментальних досліджень кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» «Синтез, дослідження, технологія та біотехнологія нових фармацевтичних субстанцій, органічних сполук і функціональних матеріалів, яким притаманні біологічна активність та комплекс інших практично цінних властивостей». Дисертація виконана в межах науково-дослідних робіт «Біотехнологічні та фітохімічні аспекти дослідження процесу одержання біологічно активних сполук з лікарських рослин» (№0119U101965), «Створення нових лікарських засобів, фіто- та біопрепаратів» (№0119U101957), «Розробка та вдосконалення технологій одержання рослинних екстрактів та фітопрепаратів» (№0119U102132).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було одержання альтернативних сировинних джерел БАР - калюсних біомас з введених в культуру *in vitro* рослин родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., їх фітохімічне дослідження та встановлення їх фармакологічної активності.

Для досягнення мети необхідно було виконати такі завдання:

- здійснити аналіз сучасних літературних даних щодо ботанічних ознак, географічного поширення, хімічного складу і застосування у медицині рослин родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.;

- провести аналіз методологічних підходів до культивування із застосуванням методу культури клітин і тканин лікарських рослин;

- ввести в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. та дослідити параметри росту експлантів та калюсної культури, підібрати оптимальні умови для експлантів та оптимізувати склад живильного середовища;

- одержати калюсні біомаси досліджуваних лікарських рослин;

- підібрати оптимальні умови екстракції та одержати відповідні екстракти з трави *Anemone nemorosa* L., коренів і трави *Pulsatilla alba* Reichenb., трави *Delphinium elatum* L. і, відповідно, їх калюсних біомас;

- провести якісний фітохімічний аналіз, а також кількісне визначення вмісту БАР у рослинній сировині, калюсних біомасах та одержаних екстрактах досліджуваних рослин;

- вивчити біологічну активність і фармакологічну дію екстрактів з рослинної сировини та відповідних калюсних біомас, які були одержані з *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.;

Об'єкт дослідження - комплексне фітохімічне дослідження рослинної сировини та калюсної біомаси *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., субстанцій на їх основі.

Предмет дослідження – біологічно активні речовини ЛРС та одержаних калюсних біомас з введених в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.; вибір оптимальних параметрів одержання екстрактів, стандартизація одержаних калюсних біомас та екстрактів і вивчення їх фармакологічної активності.

Методи дослідження. Для ідентифікації та визначення кількісного вмісту БАР використовували наступні методи - хроматографічні: тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, газорідинна хроматографія; хімічні реакції: кольорові, осадові, комплексоутворення; спектральні, фізичні, технологічні та біофармацевтичні методи. Фармакологічні дослідження проводили *in vivo* та *in vitro*. Для обробки результатів експериментальних досліджень застосовували математично-статистичні методи. При підборі оптимальних параметрів екстракції БАР використовували технологічні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше для рослин родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. науково обґрунтовано та розроблено біотехнологічні способи одержання БАР в системі *in vitro*. Вперше було проведено фітохімічне вивчення БАР калюсних біомас (КБ) та рослинної сировини досліджуваних рослин родини *Ranunculaceae*. Встановлено, що у КБ та рослинній сировині *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. присутні флавоноїди, дубильні речовини, гідроксикоричні кислоти, гідрохінонпохідні, алкалоїди, антоціани, ліпофільні речовини, сполуки стероїдної структури. Вперше досліджено біологічну активність та фармакологічну дію екстрактів з КБ та рослинної сировини *A. nemorosa*, *D. elatum*, *P. alba*. На основі проведених фітохімічних, фармакологічних, біотехнологічних досліджень доведено можливість та доцільність використання КБ досліджуваних видів рослин як рівноцінної лікарської сировини.

При проведенні досліджень було:

- введено в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.;
- досліджено параметри росту експлантів та калюсних культур, підібрано стерилізуючі агенти для експлантів та оптимізовано склад живильного середовища;
- одержано КБ та проведено її стандартизацію;
- здійснено комплексне фітохімічне дослідження отриманих КБ;
- вивчено біологічну активність отриманих екстрактів ЛРС та КБ.

Вперше проведено порівняльне фітохімічне та фармакологічне дослідження ЛРС та КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено методики культивування в умовах *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. Для кожної з рослин встановлено оптимальні умови культивування: схему стратифікації та стерилізації насіння; оптимальний склад живильного середовища, вміст регуляторів росту та їх концентрацію; оптимальні технологічні умови процесу. Одержано КБ з корневих, листових, стеблових, черешкових експлантів. Встановлено оптимальні умови одержання екстрактів з КБ та ЛРС досліджуваних рослин. Вперше досліджено гостру токсичність екстрактів, встановлено антимікробну, фунгіцидну, антиоксидантну, протизапальну, гепатопротекторну, гіпоазотемічну дії.

Здійснено стандартизацію одержаних калюсних біомас та екстрактів *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb.

Практичні результати впроваджено на ТзОВ «Технолаб» (акт впровадження від 11.06.2020р.). Фрагменти роботи впроваджено в наукову роботу та навчальний процес Запорізького державного медичного університету (акти впровадження від 19.02.2020 р. та 11.03.2020 р.), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акти впровадження від 03.09.2020р., 07.09.2020 р. та 10.09.2020 р.), Національного фармацевтичного університету (акти впровадження від 10.09.2020р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Дисертанту належить вирішальна роль у визначенні мети дослідження та шляхів її реалізації, плануванні та проведенні експерименту, інтерпретації та узагальненні одержаних результатів, формуванні основних положень і висновків, що захищаються. Результати, опубліковані у співавторстві, використані у роботі тільки в межах особистого внеску.

Безпосередньо автором здійснено інформаційно-патентний пошук та аналітичний огляд наукової літератури щодо розповсюдження, хімічного складу та використання *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. у медицині та фармації; встановлено основні групи БАР та їх кількісний вміст у ЛРС та КБ; розроблено оптимальні параметри одержання екстрактів з рослинної сировини та калюсної біомаси, проведено їх стандартизацію; інтерпретацію фізико-хімічних, хроматографічних даних; обробку результатів біологічних досліджень і підготовку матеріалів до публікацій, що відображено у наукових працях, опублікованих у вітчизняних та іноземних виданнях.

Дисертантом самостійно одержано та здійснено аналіз результатів експериментальних досліджень і систематизовано їх у вигляді таблиць, рисунків, фотознімків. В опублікованих наукових працях особистий внесок здобувача відображено в списку публікацій дисертаційної роботи.

Постановка завдань, планування, аналіз та обговорення результатів дослідження, формування основних положень та висновків роботи здійснювались разом з науковим керівником д.х.н., проф. В.П. Новіковим.

Хроматографічні дослідження та визначення антиоксидантної дії проведені у співпраці з проф. П. Вечореком в Університеті Ополе (Польща). Біологічні дослідження – з д.м.н., проф. О.Р. Піняжком та с.н.с. І.О. Нектегаєвим (Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на VI Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2016); міжнародній

науково-практичній конференції «Хімічна технологія та інженерія» (м. Львів, 2017); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Біологічні дослідження – 2017» (Львів, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє» (Харків, 2017); XI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття»; 1-й Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2017); науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018); VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2018); V Міжнародної науково-технічної конференції «Стан і перспективи харчової науки та промисловості» (Тернопіль, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 7 статей (із них 3 - у наукових фахових виданнях України та 2 в іноземному виданні, що входить до наукометричних баз), 13 тез доповідей.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 7 статей, з них 2 статті у закордонних виданнях: 1 стаття – у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 1 стаття – у виданні, що входить до наукометричної бази Web of Science; 3 - у наукових фахових виданнях України, 13 тез доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 237 сторінках друкованого тексту, вона складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту – 170 сторінок. Робота проілюстрована 39 таблицями, 37 рисунками. Список використаних літературних джерел включає 201 найменування, з яких 109 кирилицею та 92 латиною.

РОЗДІЛ 1

РОСЛИНИ РОДИНИ *RANUNCULACEAE* – ПЕРСПЕКТИВНІ ОБ’ЄКТИ ФАРМАКОГНОСТИЧНИХ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

(Літературний огляд)

1.1. Лікарські рослини родини *Ranunculaceae* Juss. як об’єкт фармакогностичних досліджень

Родина *Ranunculaceae* Juss. (українська назва родини – жовтецеві) представлена багаторічними, дво- та рідше однорічними трав’янистими рослинами, окремі види є ліанами, кущами, напівкущами (наприклад, рослини роду *Clematis*), є серед жовтецевих і водні рослини (наприклад, жовтець водяний (*Ranunculus aquatilis*) [1, 66].

Родина налічує за різними даними до 66 родів та близько 2500 видів [2], що поширені по всьому світу. Первинна диференціація цієї родини мала місце ще у крейдовий період [30, 202]. У формуванні сучасних родів цієї родини найвизначнішу роль зіграли флористичні центри у Східній Азії, а також в Північній та Південній Америці [144, 131, 165, 197]. На теперішній час *Ranunculaceae* розповсюджені переважно в помірних і прохолодних кліматичних областях північної півкулі. Але окремі види зустрічаються у тропічному кліматі і виживають в умовах крайньої півночі [181]. Близько 75% родів родини є типовими для флори східної Азії [133, 176]. В Україні зростають рослини 25 родів родини *Ranunculaceae*, які налічують близько 150 видів у різних природних зонах та адміністративних територіях [27, 28, 49, 61, 118, 167, 191]. У флорі Західної України родина *Ranunculaceae* представлена двома підродинами, 10 трибами, 22 родами та 102 видами [72]. Вивченням сімейства *Ranunculaceae* займалися багато авторів, існує кілька основних значущих робіт, які відіграли важливу роль у становленні систематики та дозволили визначити його обсяг і межі. Вперше повна систематизація родини *Ranunculaceae*, що складалась з 5 триб, була запропонована А. Декандром у 1824р., у родину було об’єднано 28 родів, у тому

числі десять досі неописаних [65]. Значні вклади у систематику внесені Прантлем, Лангле, Зіманом [45, 65]. Особливий внесок у вирішення питань філогенії родини *Ranunculaceae* зробив М. Тамура, підсумком робіт якого стала система, що складається з 5 підродин, 10 триб і 14 підтриб [187]. Філогенетичні дослідження з урахуванням усіх отриманих на даний момент молекулярно-генетичних даних тривають, над ними працюють різні групи науковців ботаніків-систематиків, найбільш відомою з яких є Angiosperm Phylogeny Group (APG). Система APG (I-IV) також визнає таку родину, її розміщують в порядку жовтецевоцвіті (*Ranunculales*), серед еудікотів [112]. З урахуванням даних секвенування ядерної ДНК побудована попередня система родини *Ranunculaceae*, котра включає у себе 14 підродин, 26 триб, 61 рід [39].

Із врахуванням сучасних молекулярногенетичних даних та результатів морфо-таксономічних сформовано позицію, відповідно до якої у флорі Західної України родина *Ranunculaceae* представлена 2 підродинами, 10 трибами, 22 родами та 102 видами [72].

Нові, які не були раніше описані, види рослин родини жовтецевих відкривають науковці і в останні роки [93].

Характеристика рослин родини *Ranunculaceae* Juss. детально розглядається в книзі «Екофлора України» [28]. Морфологічні ознаки [44, 91], притаманні родині жовтецевих наведено на рис. 1.1.

Органи рослин даної групи, які розміщені під землею (рис.1.1.1) можуть бути мичкуватою кореневою системою або стрижневим коренем, у деяких видів, наприклад, горицвіту, – це кореневища, у пшінки – це коренебульби, у рутвиці – це столони, у гімносперміуму – бульби [142]. Листки зазвичай чергові, однак іноді супротивні; прості – цілісні, або складні - цілісні або пірчasto- чи пальчastолопатові [66, 91, 142]. Як правило, прилистки відсутні. Розташування листків переважно чергове, лише у видів роду ломонос – супротивне, в прикореневій розетці (2). На листках часто наявні гідатоци – водяні продишки, як правило, аномоцитного типу (3). – пильчasto-зубчасті або залозисто-пильчасті, зубчасті або цілокраї [142].

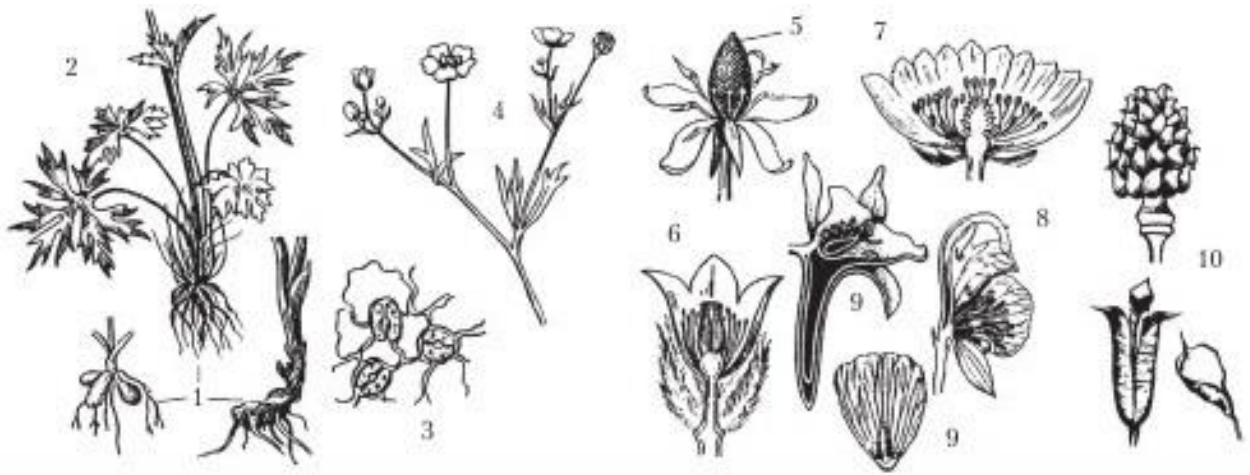


Рис. 1.1. Морфологічні ознаки родини *Ranunculaceae*: 1) - підземні органи; 2) - розташування листків; 3) - водяні продири; 4) - суцвіття; 5) - квітколоже; 6-7) - оцвітина; 8) - чашолистки аконіту; 9) - нектарники; 10) – плоди

Квітки поодинокі, деколи формують суцвіття (4) типу китиць, волоть тощо. Квітколоже (5), як правило, опукле, на ньому частини квітки можуть розташовуватись спіралью - геміциклічно [66, 91, 142]. Для більшості рослин з родини *Ranunculaceae* характерні дводомні квітки правильні або неправильні, двостатеві, зрідка одностатеві; вони можуть бути яскравими або непримітними, білатерально чи радіально симетричними. Листочків оцвітини буває від трьох до п'ятнадцяти, зовнішніх - від двох, внутрішніх - від одної до тринадцяти. Тичинок від одної до понад ніж 500. Жіночі квітки іноді зі стамінодіями. Плодолистиків від одного до понад ніж 100. Зав'язь верхня, одногніздна або 3–5- гніздна [66]. Оцвітина є простою (6), як правило, віночкоподібною (4,5,6) або подвійною (7). Чашолистки у деяких видів, наприклад, жовтецю, опадають, в інших - залишаються при плодах, як наприклад у чемеринника [142]. Інколи чашолистки є пелюсткоподібними, можуть утворювати шпору, як наприклад у дельфінію, чи шолом (8) як в аконіту. Пелюстки у більшості видів є жовтого кольору. У жовтецевих є нектарники (9) у вигляді шпори (сокирки, дельфіній), лійки (чемерник), ріжків (чорнушка), ямки, прикритої (як у жовтеця), або неприкритої (як у пшінки) лусочками тощо. Тичинки є вільними та розташовуються по спіралі – квітки геміциклічні. Наприклад, в жовтецю оцвітина має колове розташування, а

маточки та тичинки – спіральне. Маточок може бути багато (апокарпний гiнецей), але, наприклад, у сокирок, як виняток, – монокарпний, iнодi плодолистки можуть зростатися (як у чорнушки) [142]. Плід (10) в рослин родини жовтецевих збірний, складається з багатонасінних листiвок або сiм'янок. В окремих видiв плід - коробочка або ягода [66, 91, 142]. У насiнинi велику частку займає бiлок, меншу – зародок. Плоди переносяться вiтром, водою, тваринами.

Значна частина рослин родини *Ranunculaceae* потребує охорони, вiдбувається скорочення популяцiй внаслiдок змiни клiмату, зокрема зменшення кiлькостi вологи, а також антропогенного впливу. За даними лiтературних джерел [27, 119] 24 види *Ranunculaceae* занесено до Червоної книги України, зокрема *Anemone narcissiflora* L., *Delphinium sergii* Wissjul., *Delphinium rossicum* L., *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill., *Pulsatilla taurica* Juz. та iншi [18]. До Червоного списку Мiжнародного союзу охорони природи та природних ресурсiв (IUCN Red List of Threatened Species) – *Aconitum firmum* Reichenb., *Delphinium pallasii*, *Ranunculus crimaeus*, до «Європейського Червоного списку тварин i рослин, що знаходяться пiд загрозою зникнення у свiтовому масштабi» (European Red List of Globally Threatened Animals and Plants) – *Ranunculus malinovskii*, *Pulsatilla taurica*; велика кiлькiсть видiв родини жовтецевих входить до перелiкiв рiзних мiжнародних конвенцiй [27].

Рослини родини *Ranunculaceae* мiстять фармакологiчно активнi сполуки та часто застосовуються як лiкарськi рослини [91, 160, 193]. Рослини родiв *Adonis* i *Heleborus* мiстять кардiоглiкозиди, родiв *Aconitum*, *Thalictrum* та *Cimicifuga* - рiзнi алкалоїди, роду *Clematis* - ранункулiн i сапонiни [127]. Бiологiчно активнi компоненти рослин цiєї родини представленi кiлькама репрезентативними групами та мiстять такi БАР як алкалоїди бензилзохінолінового ряду, ранункулiн, тритерпеноїдний сапонiн, алкалоїди дитерпенового ряду та iн. [128].

Рослини родини *Ranunculaceae* є вiдомими в етнофармакологiї багатьох народiв для лiкування дизентерiї, малярiї, оперiзуючого лишая, виразок, артриту, ларингiту, гепатиту, рiзноманiтних паразитарних захворювань тощо [99, 140, 177]. Цим рослинам притаманна протизапальна, протимiкробна,

аналгетична, седативна, антиоксидантна, протисудомна та антигістамінна активність [145, 153]. Вони входять до складу функціональних харчових композицій, що включають гомеопатичні інгредієнти [142].

Особливу увагу приділяють протипухлинній дії рослин родини *Ranunculaceae*. Відомо, що метаболіти представників родини *Ranunculaceae* є перспективними протипухлинними агентами, деякі з них модулюють сигнальні шляхи, які є ланкою ініціювання та прогресування раку; ці сполуки здатні посилювати протипухлинну активність клінічних препаратів, одночасно знижуючи їхню токсичну побічну дію [170]. Поширення протипухлинних сполук пов'язано з філогенетичною складовою: рослини родів *Anemone*, *Clematis*, *Nigella*, *Ranunculus*, *Pulsatilla* багаті на пентациклічні тритерпенові сапоніни; дитерпенові алкалоїди характерні для представників родів *Delphinium*, *Consolida* та *Aconitum*, але також зустрічаються в родах *Nigella* та *Thalictrum*; рослини родів *Actaea*, *Cimicifuga*, *Thalictrum* багаті на тетрациклічні тритерпени [173].

Багато видів з родини *Ranunculaceae* мають цінність і як декоративні рослини, зокрема такі представники родів *Ranunculus*, *Aconitum*, *Caltha*, *Nigella*, *Consolida*, *Cimicifuga*, *Clematis*, *Adonis*, *Aconitum* та інших [47, 75, 170, 186].

Найбільшими родами є *Ranunculus* (600 видів), *Delphinium* (365 видів), *Thalictrum* (330 видів), *Clematis* (325 видів) та *Aconitum* (300 видів) [32].

Дослідження БАР та можливість їх одержання з використанням біотехнологічних методів є невід'ємною частиною всебічного дослідження лікарських рослин, яке могло б забезпечити збереження та стале використання фармацевтичних ресурсів *Ranunculaceae*, а також розробку нового лікарського засобу з покращеними параметрами метаболізму ліків і фармакокінетики. Однак характеристики БАР, отриманих з рослин родини жовтецевих, досі не узагальнені. Чорний кохош (*Cimicifuga*) і жовтокорінь (*Hydrastis*) викликають побоювання з приводу їх взаємодії. Дослідження параметрів метаболізму і фармакокінетики інших родів *Ranunculaceae*, наприклад, *Nigella*, *Delphinium*, *Aconitum*, *Trollius* і *Coptis*, також швидко розширюються і стають все більш і більш клінічно актуальними. Незважаючи на те, що процеси абсорбції, розподілу, метаболізму,

виведення і токсичності сполук *Ranunculaceae* досить активно вивчаються, дослідження окремих родів, таких як *Aquilegia*, *Thalictrum* і *Clematis* відсутні [128].

Практично у кожному з родів родини *Ranunculaceae*, що представлені на теренах Західної України, є рослини, які мають набір цінних БАР та є перспективними для використання в офіційній медицині, однак досі не зайшли широкого застосування. Нашу увагу привернули *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb.

1.2. Ботанічна характеристика, розповсюдження, хімічний склад, застосування у народній та науковій медицині *Anemone nemorosa* L.

Anemone nemorosa L. (українська назва виду – анемона дібровна) – багаторічна трав'яниста рослина, яка входить до родини жовтецевих *Ranunculaceae* (рис. 1.2). У рослини прямостояче стебло, 10-25 см заввишки, та добре розвинене кореневище. Листки в анемони дібрової є переважно стебловими, найчастіше вони зібрані по три в кільце. Квітки мають приблизно 20-30 мм у діаметрі, є білого, блідо-рожевого, інколи лілового кольору і складаються з шести-восьми пелюсток, що на ніч закриваються й схиляються. Плоди – продовгуваті сім'янки з короткими носиками [2, 26, 43, 60, 190, 194]. Є ефемероїдом, цвіте у квітні-травні. Розмножується *A. nemorosa* L. кореневищами і насінням. Зацвітає на 10-12 рік після висівання насіння [106, 199].

Якщо навесні кореневище молодої рослини виду *A. nemorosa* L. залишається без наземної частини, рослина гине [164]. Це і стало причиною того, що рослина входить до списків рідкісних рослин у ряді областей України, зокрема в Дніпропетровській, Луганській, Сумській та Чернігівській областях як вид, що підлягає особливій охороні, хоча і не внесений до Червоної книги [77, 85].



Рис. 1.2. *Anemone nemorosa* L. Загальний вигляд. (Львівська обл., с. м. т. Винники)

Поширена в широколистяних лісах у зонах Полісся та Лісостепу (рис. 1.3).



Рис. 1.3. Територія поширення рослини *Anemone nemorosa* L.

Рослина є неофіційною [20]. У народній медицині використовують траву під час цвітіння.

До складу рослинної сировини *A. nemorosa* L. входять такі БАР: феноли, флавоноїди, алкалоїди, глікозиди (протоанемонін, анемонін, ранункулін, деякі типи сапонінів, таніни) [63, 64], вітамін С, смоли, органічні кислоти, наприклад,

хелідонова кислота (рис. 1.4), кумарини та інші. [106, 139]. А також в олії насіння анемони дібрової присутня γ -ліноленова кислота [192].

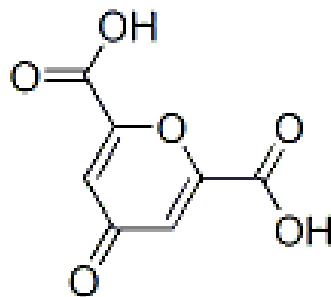


Рис. 1.4. Хелідонова кислота

Основною діючою речовиною в *A. nemorosa* L. є протоанемонін. Це в'язка безбарвна масляниста рідина з різким запахом. Frohne і Pfander описували протоанемонін як летку, маслянисту і отруйну субстанцію, дуже подібну до меркаптанів [135]. Протоанемонін має протимікробну (бактерицидну та бактеріостатичну) дію і є активним проти грампозитивних та кислотостійких бактерій, має фунгістатичну, антимутагенну, седативну дії, активізує макрофаги в організмі, однак, як вище сказано, є токсичним [100, 156, 157, 161]. Bobadilla Fazzini R. A. та інші, використовуючи як методи транскриптоміку та протеоміку, виявили, що протоанемонін істотно зменшує експресію генів і секрецію протеїнів, які знаходяться під контролем відчуття кворуму *Pseudomonas aeruginosa* [171].

При висушуванні рослинної сировини *A. nemorosa* L. протоанемонін перетворюється в анемонін (рис. 1.5).

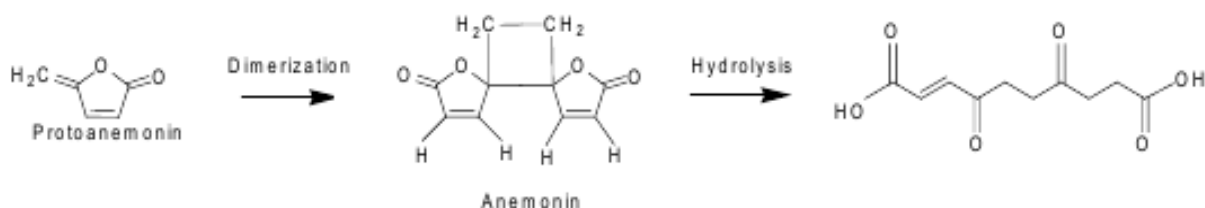


Рис. 1.5. Схема перетворення протоанемоніну в анемоні

Анемонін (рис. 1.6) за фізико-хімічними властивостями - це кристалічний порошок, забарвлений у білий колір, який погано розчиняється у звичайній воді, проте добре - в органічних розчинниках.

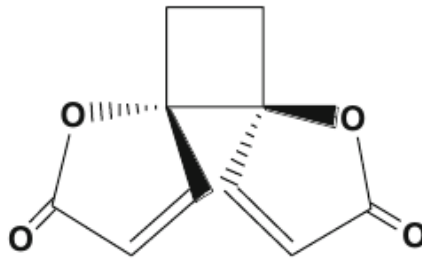


Рис. 1.6. Анемонін

Має виражену знеболюючу та спазмолітичну, фунгіцидну, проте, меншу, ніж у протоанемоніну седативну дію [162]. Відомі є застосування анемоніну при астмі, коклюші, рахіті, маткових кровотечах, асептичному запаленні та пов'язаних з ним болями [154, 180]. Liu Ying з колегами у своїх дослідженнях анемоніну дійшли висновку, що механізм дії анемоніну може завадити появі діареї, викликаній справжньою поліцитемією і *E.coli*, можливо впливає на регуляцію виявлення епідермального фактору росту EGFR та трансформуючого фактору росту бета TGF β 1 [198].

Доведено також, що анемонін інгібує синтез меланіну через зниження активності тирозинази і може бути застосований як компонент косметичного засобу для усунення гіперпігментації [115]. Анемонін спроможний інгібувати синтез оксиду азоту (NO) модуляцією експресії iNOS (індуцибельної синтази оксиду азоту) [116]. Це може пояснити його протизапальну дію. Також відомо, що анемонін інгібує ендотелін-1 (ET-1) та молекули міжмолекулярної адгезії (ICAM-1) в мікросудинних ендотеліальних клітинах кишечника щурів, запобігаючи їх дисфункції. Припускається, що анемонін може бути перспективним у лікуванні захворювань, в патогенезі яких важливу роль відіграють ET-1 і NO, наприклад, серцево-судинних хвороб та артритів [129].

Dong Jia, Bin Han, Shaowei Yan та інші досліджували тварин в стані ішемії і показали, що після курсу анемоніну істотно відновлювався рівень деяких біохімічних параметрів, зменшувався розмір інфаркту мозку, а також покращувався неврологічний рубець [114]. Крім того, анемонін знаходили в плазмі та мозкових тканинах, а коефіцієнт розподілу мозок-плазма, який дорівнював 0,7 через 90 хв, дозволив припустити, що ця сполука може проникати

через гемато-енцефалічний бар'єр. Було зроблено висновок, що прийом анемоніну захищає від ішемії-реперфузії головного мозку у щурів завдяки антиоксидантним властивостям і подальшому пригніченню апоптозу. Отже анемонін може бути перспективним засобом у терапії ішемічної хвороби серця [114].

Kan Xiao, Shu Ting Cao, Le Fei Jiao та інші вивчали вплив анемоніну на поросят і довели, що його прийом зменшує експресію TNF- α , IL-6, IL-8 і IL-1 β м-РНК. Додаючи до курсу лікування анемонін, відмітили зменшення експресії TGF- β 1 м-РНК і протеїнів, експресії Smad4 і Smad7 м-РНК, а також епідермального фактору росту і рецепторів епідермального фактору росту (EGFR) м-РНК в слизовій оболонці тонкої кишки. Отже анемонін покращував відновлення слизової оболонки кишківника, зменшував кишкові запалення і пришвидшував загоєння [198].

Діапазон фармакологічної дії *A. nemorosa* L. є дуже широким. У народній медицині рослина застосовується внутрішньо у вигляді настоїв, настоянок, відварів як протипухлинний, знеболювальний та протизапальний, спазмолітичний, седативний, потогінний, бактерицидний, протимікробний, протигрибковий, відхаркувальний, діуретичний, абортивний засіб [117, 124]. Анемона дібровна використовується при запаленні легень, нирок, селезінки, очей, злоякісних виразках та новоутвореннях, серцевих захворюваннях, гарячці, при болях у шлунку, головних болях, радикуліті [117, 138].

Використовується у вигляді настоїв, настоянок, відварів трави для лікування апатичності, астми, водянки, гарячки, задишки, жовчнокам'яної хвороби, кашлюку, корости, порушеннях менструального циклу, оперізуючого лишая, паралічу, подагри, прокази, ревматичної подагри, статевої слабкості чоловіків і жінок, триденної лихоманки, хронічного сифілісу, при погіршенні зору та ін. *A. nemorosa* L. застосовують у комбінації з іншими рослинами у складі різних зборів при задишці, приступах астми, істеричних випадках та емоційній неврівноваженості. Зовнішньо застосовується спиртова настоянка при лікуванні ревматизму, подагри, дерматозів, як антисептичний засіб, соком кореневищ

анемони дібрової видаляють бородавки [102]. У гомеопатії анемону вживають як седативний, потогінний та діуретичний засіб.

Однак рослина отруйна. Листя мають наркотичну дію. Після висушування втрачає токсичність (вочевидь через перетворення протоанемоніну в анемонін).

Добре відомо, що настій анемони дібрової не можна приймати вагітним, оскільки вона має абортивний ефект, під час лактації, а також людям з нирковою недостатністю. Так як рослина отруйна, слід дотримуватися дозування і бути уважним до самопочуття [102].

Про використання рослинної сировини *A. nemorosa* L. згадують вже понад 200 років, як свідчать записи знаних лікарів-науковців тих часів: Culpeper (1720 р.), Motherby (1775 р.), Meurick (1799 р.), Porcher (1849 р.), Clapp (1850 р.). Свого часу анемона дібровна була уведена до провідних фармакопей: Единбурзької Фармакопеї (1804 р.); Фармакопеї Сполучених Штатів (1833 – 1834 р.р.). У багатьох країнах *A. nemorosa* L. була офіційною рослиною: у Росії (1803 р.), у Швеції (1817 р.), в Турині (1833 р.), включена у перше видання Медичного словника (1817 р.) [63, 113].

Різні біологічні аспекти *A. nemorosa* L. добре вивчені: поширення в природі, питання популяційної біології, можливості статевого та вегетативного розмноження і культивування, динаміка зростання і стійкість до висихання, моніторинг екосистем, генетична структура.

Таким чином, враховуючи вміст БАР, широкий спектр фармакологічної активності, а також досвід застосування у народній медицині, можна вважати, що *A. nemorosa* L. є перспективною рослинною сировиною для розроблення та виробництва фітопрепаратів.

1.3. Ботанічна характеристика, розповсюдження, хімічний склад, застосування у народній та науковій медицині *Delphinium elatum* L.

Delphinium elatum L. (українська назва виду – дельфіній високий, цар-зілля високе) – багаторічна трав'яниста рослина (рис. 1.7), стебло висотою 80-200 см,

деколи до 350 см, порожнисте, розгалужене, голе, місцями вкрите коротенькими жовтуватими волосками; коренева система – стрижнево-мичкувата; листки по 6-10 см завдовжки та 15-16 см завширшки, округлі, біля основи глибокосерцевидні, голі, по краях і по жилах волосисті, їхня пластинка розсічена на 3 частки: середня ромбічна, у верхній частині розсічена на великі загострені зубці, бічні частки широко розсічені приблизно на дві третини від своєї довжини на ромбічні нерівно загострені частини другого порядку. Китиця негуста, проста або в нижній частині гілляста; приквітники вузьколінійні, цілісні; листочки оцвітини яйцевидні, або еліптичні, 11-15 мм довжиною, блакитного, синього або фіолетового кольору. Цвіте в червні-липні. Плід – листянка, дозріває в серпні. Рослина розмножується генеративним та вегетативним шляхом. Ростає в лісовій зоні [63, 64].

Є рідкісним євразійський субальпійський монтанним видом, розповсюдженим на окремих територіях Франції, Хорватії, Словенії, Румунії, Швейцарії, Австрії, Чехії, Словаччини, Сербії, Польщі, Білорусі, Європейської частини Російської Федерації, Західного Сибіру, Казахстану, Киргизстану, Монголії. В Західній Канаді дельфіній високий введено в культуру [147].



Рис. 1.7. *Delphinium elatum* L. Загальний вигляд

Ареалом поширення рослини в Україні є територія Карпат, зокрема, гірські масиви Боржава, Мармароський, Горгани та Чивчини, розташовані у Івано-Франківській та Закарпатській областях (рис. 1.8) [72].



Рис. 1.8. Поширення *Delphinium elatum* L. на території України

Дельфіній високий (*Delphinium elatum* L. (incl. *D. nacladense* Zapał.)) як вразливий вид внесений до проекту «Переліку видів рослин та грибів, що заносяться до Червоної книги України» у 2020 році [85].

Природні популяції в Україні зменшуються через вирубку лісів і випас худоби. Насіння *D. elatum* L. проростає погано. На Західній Україні дельфіній високий є під охороною у заказниках (наприклад, у ландшафтному заказнику місцевого значення «Чивчино-Гринявський», у Верховинському районі Івано-Франківської області, а також у лісовому заказнику загальнодержавного значення «Росішний», у Воловецькому районі Закарпатської області). Вид культивується в ботанічних садах НАН України [98].

В народній медицині використовуються багато видів роду *Delphinium* для лікування захворювань центральної нервової системи та шлунково-кишкового тракту. Рослини мають протипухлинну, протизапальну та знеболювальну, кардіотонічну, судинорозширюючу, антигіпертензивну та інші дії. Дельфіній застосовується при отруєннях пестицидами, артриті, як знеболювальний засіб при м'язових болях та болях в суглобах, зубному та головному болю, діареї, інсульті та виразках. [10, 136, 155].

Протипухлинна активність *D. elatum* L. зумовлена високим вмістом у всіх частинах рослин дитерпенових та нордитерпенових алкалоїдів: дельфеліну, дельталіну, дельтаміну, елатину, метиллікаконітину. В насінні перелік БАР ще ширший: ацетилнудікаулін, аяконін, делектинін, делелатін, дельфелін, дельталін, еладін, еланін, елазин, елатін, ізодельфелін, лікоктонін, пачинін [195, 196]. Алкалоїди дельфінію високого, як свідчать результати наукових досліджень, мають цитостатичну дію на лінії ракових клітин легень, простати, носоглотки та молочної залози [136,137,155].

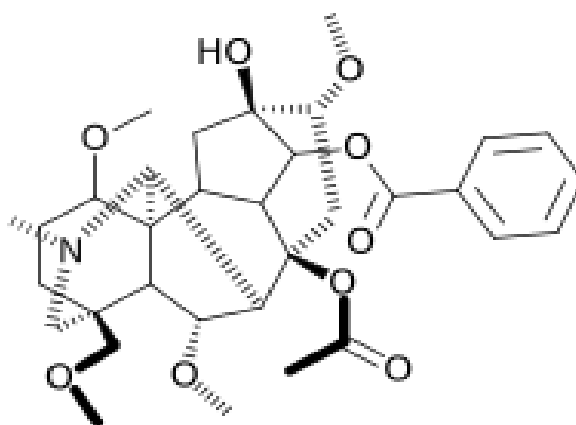


Рис. 1.9. Дельфінін

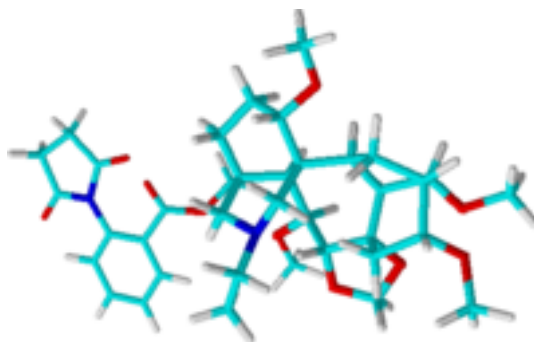


Рис. 1.10. Елатин

Ефірна олія *D. elatum* L. містить насичені вуглеводні: тетрадекан, пентадекан, гексадекан, трикозан, тетракозан та інші; карбонільні сполуки: нонанал, деканал, 6,10,14-триметилпентадекан-2-он; аліфатичні одноатомні спирти: октан-1-ол, нонан-1-ол, декан-1-ол, тетрадекан-1-ол, пентадекан-1-ол; ароматичні сполуки: дурол, диметилнафталін, міристицин та ін.; жирні кислоти: гексадеканову, пентадеканову, октадекадієнову; естери: етилнонаноат,

метилгексадеканоат, метилоктадекадієноат; моно- і сесквітерпеноїди: анетол, α -бергамотен, β -бісаболен, α -гімакален, геранін, ізоциклоцитраль, ліналоол, карвон, β -каріофілен, копаен, α -куркумен, оцимен; туйопсен, β -селінен, α -фарнезен, фарнезил ацетон; а також вищі ізопреноїди: геранілгераніол, сквален; та інш.[136].

Рослини токсичні для людей та тварин, оскільки містять нордистерпенові алкалоїди, які блокують нікотинові ацетилхолінові рецептори (nACh) в центральній та периферійній нервовій системі, гальмують нервово-м'язові синапси, що виражається у м'язовій слабкості, набряках, пригніченні дихання тощо [155].

Беручи до уваги широке застосування в народній медицині, вміст цінних БАР, спектр фармакологічної активності, можна зробити висновок, що *D. elatum* L. є перспективною сировиною для розроблення та виробництва фітопрепаратів [63,64].

1.4. Ботанічна характеристика, розповсюдження, хімічний склад, застосування у народній медицині *Pulsatilla alba* Reichenb.

Pulsatilla alba Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*, українська назва виду – сон білий або сон Шерфеля, сон альпійський) – багаторічна рослина, загальний вигляд рослини наведено на рис. 1.11.



Рис. 1.11. *Pulsatilla alba*. Загальний вигляд

Сон білий є гемікриптофітом. Рослина має виражений стрижневий корінь, а також відгалуження кореня (каудекс), від якого розходяться підземні пагони [1].

Листки з'являються наприкінці цвітіння, розташовані на довгих черешках і мають глибоко 2-роздільні загострені частки, прикореневі листки є довго черешкові з тричі-трійчасто-складними гладкими пластинками. Листки приквіткового покривала розташовані на розширених при основі вільних черешках, двічі-трійчасті (рис. 1.1). Генеративні пагони 7-25 см заввишки, пазушні. Листки, пагони густо опушені, як і пелюстки з зовнішнього боку. Квіти білі, поодинокі, прямостоячі. Оцвітина є широко розкритою, пелюстки довжиною 2-2,5 см, цвіте у квітні-травні, а на найвищих вершинах навіть до середини липня [1]. Плід складний, складається з горішків пірчасто опушеними остями. Рослини розмножуються насінням та/або столонами [1].

Зростає на луках субальпійського та альпійського поясів у гірських природних зонах Середньої Європи, на висотах 1650-1960 м над рівнем моря, на карбонатному субстраті. Відомі місця зростання в Українських Карпатах, на таких Карпатських хребтах як Черногора, Свидовці, Горгани тощо) [72, 106].



Рис. 1.12. Ареали поширення сну білого на території України

Зростає на схилах різної експозиції, переважно на слабо задернованих ділянках, кам'янистих відслоненнях та осипищах, в умовах помірного зволоження (мезофіт), в асоціаціях з *Cystopteridetum fragilis*, *Salicetum herbaceae*, *Salicetum retuso-reticulatae*, *Festucetum pictae*, *Primulo (minimae)-Caricetum curvulae*, *Caricetum sempervirentis* та ін.

Сон білий (сон Шерфеля, *Pulsatilla scherfelii*, *P. alba* Reichenb.) занесено до проекту «Переліку видів рослин та грибів, що заносяться до Червоної книги України» у 2020 році як рідкісний вид [85]. На даний час є під охороною у Карпатському біосферному заповіднику та Карпатському національному природному парку. Рослина декоративна, тому часто збирається на букети; при цьому особливо вразливими до зривання є молоді рослини, асимілююча поверхня генеративних пагонів яких становить до 30 % від загальної [76]. У деяких ботанічних садах України сон білий вводять у культуру, часто використовують як декоративну рослину [11].

Ця рослина є неофіційною [20]. Однак *P. alba* знайшов застосування в народній медицині [76], так само як і інші рослини цього роду, наприклад, простріл звичайний, який відомий своєю спазмолітичною дією [77]. У медицині використовують його коріння та листки [79].

P. alba містить БАР, серед яких ранункулін, що розщеплюється на глюкозу і протоанемонін, який при сушінні ЛРС перетворюється на анемонін (рис. 1.5). Крім ранункуліну рослина містить також тритерпенові сапоніни, ефірну олію, дубильні речовини, зокрема танін, вітамін С, органічні кислоти, флавоноїди, алкалоїди, фітонциди, смоли, макро- і мікроелементи [1]. Зокрема трава містить: ефірну олію, γ -лактони (ранункулін, протоанемонін), тритерпеноїди (ацетат р-амірину), стерини (ситостерин), хелідонову кислоту, сапоніни, кумарини, вітамін С; листя містить: камфору та глікозид ранункулін [81]. Крім того, до складу листя входять алкалоїди, фітонциди, вітаміни, сапоніни, дубильні і смолисті речовини, органічні кислоти; насіння містить жирну олію [82].

Приймають внутрішньо як протираковий, снодійний, протимікробний, протигрибковий, протизапальний та знеболювальний засіб [83]. В народній медицині *P. alba* використовується як сильний протипухлинний засіб для лікування раку різної локалізації (раку матки, грудей, шлунково-кишкового тракту, передміхурової залози, легень і т. д.) [84]. Вважають сильним засобом для лікування функціональних захворювань нервової системи: невралгії, мігрені, спазмофілії, безсоння, має снодійну, протимікробну і протигрибкову дію, знижує

кров'яний тиск, внутрішньочерепний тиск, розширює судини очного дна, лікує катаракту, глаукому, запалення внутрішнього вуха [85]. Спиртову настоянку, відвар коріння і трави рекомендують застосовувати при екземі, грибкових ураженнях шкіри. Відвар трави в народній медицині використовують при бронхіті, астмі, головному болі, подагрі, ревматизмі [86].

У Китаї відваром прострілу лікують дизентерію, набряки ниркового і серцевого походження, сік трави з медом використовують для лікування глаукоми [87]. Відвар п'ють при туберкульозі легенів, кору, зриві живота, зубного болю, венеричних і жіночих хворобах, а також відвар дають жінкам при важких пологах (діє як знеболююче і полегшує пологи) [88]. Сік зі свіжої трави, випаруваний в бані, використовують для лікування опіків, натирань занімілих частин тіла [89]. При прийомі всередину слід дотримуватися обережності, тому що свіжа рослина при передозуванні може викликати запалення слизової оболонки кишечника, нирок, а у великих дозах - параліч. При гломерулонефриті протипоказаний [90]. Використовується в народній косметиці як маска для обличчя для запаленої шкіри і при вуграх; для надання шкірі атласної гладкості; для вмивання; як ополіскувач для волосся [91]. У ветеринарії використовують як настоянки, яким властиві фунгіцидні на бактерицидні властивості [92].

Препарати сон-трави протипоказані в період вагітності, при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок. Важливо пам'ятати, що сон-трава – отруйна рослина. Безконтрольне застосування та самолікування можуть призвести до передозування та отруєння. Навіть вдихання парів свіжої трави може бути небезпечним для здоров'я [92].

Таким чином, враховуючи практику використання рослини *Pulsatilla alba* Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*) в народній медицині, наявність чисельних БАР та значну фармакологічну активність, можна визнати, що ця рослина є перспективною як сировина для розроблення та виробництва фітохімічних препаратів.

1.5. Культивування рослин родини *Ranunculaceae* Juss. в умовах *in vitro*.

Вищенаведений огляд наукових публікацій доводить, що рослини родини *Ranunculaceae*, зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*) є перспективними рослинами для одержання комплексів БАР та розроблення фітопрепаратів [89]. Ці рослини Українських Карпат активно використовуються у народній медицині. У цей же час на українському ринку лікарських препаратів відсутні лікарські засоби на основі сировини *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb., оскільки це рідкісні види лікарських рослин [77, 85, 103, 104, 105]. Обсяги лікарської рослинної сировини є обмежені та не підлягають комерційному використанню [88]. Альтернативним перспективним джерелом одержання біомаси цих рослин та продукованих ними БАР є використання біотехнологічних методів вирощування *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. в умовах *in vitro*[54].

Метод культивування клітин, тканин та органів рослин *in vitro* передбачає експлантацію об'єкту, ізольованого від рослинного організму, на живильне середовище певного складу, його культивування у визначених умовах оточуючого середовища та отримання цільових продуктів культивування, як то калюсна тканина, соматичні зародки тощо [90]. Теоретичну основу методології культури клітин, органів і тканин становить морфогенез *in vitro*. Соматичний ембріогенез є процесом асексуального розвитку зародишеподібних структур, як з репродуктивних, так і з соматичних тканин. Те, що початку ембріогенезу передують утворення багатоклітинних агрегатів відомо достатньо давно. Підтвердженням цього процесу є дані вивчення калюсу *Ranunculus sceleratus* L. методом електронної мікроскопії [94, 95]. Управління процесами «морфогенезу, диференціації, дедиференціації, росту та розвитку у експлантованих об'єктах, культивованих клітинах та тканинах здійснюється через варіювання якісного та кількісного складу компонентів живильних середовищ, зокрема, фітогормонів, вітамінів, вуглеводів, а також різноманітних технік експлантації і трансплантації, умов культивування» [93]. Всі операції з культивування рослинних об'єктів на штучному живильному середовищі проходять умовах *in vitro*, які виключають

контамінацію мікроорганізмами рослинних культивованих об'єктів [93, 96]. Основні принципи культивування рослинних об'єктів *in vitro* спрямовані на забезпечення їх всім необхідним для росту та розвитку, створення і підтримання асептичних умов культивування.

Унікальною особливістю культивованих клітин є їхня тотипотентність, здатність до регенерації цілісного організму через редиференціювання. Тотипотентність є основою прискореного мікроклонального розмноження та оздоровлення рослин, а також створення нових форм рослин методами клітинної селекції, генетичної інженерії тощо [97]. Ізольовані клітини, тканини та органи рослин у культурі *in vitro* зберігають здатність до біосинтезу метаболітів і є джерелом економічно важливих БАР. Вони також спроможні до біотрансформації, тобто здатні перетворювати дешеві продукти переробки чи відходи на цінні продукти. Наразі у виробництві широко використовують культури тканин і клітин для одержання як продукту нових форм рослин і/або біомаси [97]. Результати досліджень в області вивчення процесів органогенезу і соматичного ембріогенезу *in vitro*, виявлення закономірностей розвитку експлантів цілого ряду рослин у тому числі родини семейств *Ranunculaceae*, та їх регенерації наведено у [67]. У цій науковій праці представлено біотехнологічну схему розмноження і одержання рослин із родин *Ranunculaceae*, *Cannaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Actinidiaceae* через органогенез і соматичний ембріогенез.

За останні роки мікророзмноження продемонструвало вражаючий розвиток. Однак в даний час відомо, що високий відсоток мікророзмножених рослин може бути загублений або пошкоджений на стадії акліматизації, тобто під час перенесення з посудини культури тканин у ґрунт. Через особливе середовище *in vitro* важко виробляти рослини, які можна адаптувати до зовнішнього середовища [110]. Методами клітинної біотехнології створюється ЛРС з заданими властивостями. Наприклад, вирощування клітин у контрольованих умовах дозволяє одержувати калюсну біомасу, збагачену будь-якими макро- чи

мікроелементами, гормонами, регулювати її вітамінний та амінокислотний склад [110].

В окрему галузь виділено біотехнологію одержання з біомаси культивованих *in vitro* клітин особливо цінних БАР для використання у фармацевтичній, а також косметичній та харчовій промисловостях [100].

Біотехнологія рослин дає можливість використовувати їх природний феномен «біофабрик» БАР: біополімерів, флавоноів, алкалоїдів, вітамінів та ін., що синтезуються тільки рослинами. Рослинні клітини, вивільнені з тканини, дедиференційовані *in vitro*, позбавлені від впливу тканиноспецифічності, наближаються за своїм «біосинтетичним потенціалом» до мікробної клітини, яка якраз має підвищений біосинтез саме цільового продукту [87, 158].

Лікарською сировиною стає біомаса ізольованих клітин або органів лікарських рослин, що вирощуються у стерильних умовах *in vitro*. Прикладом отримання лікарського препарату на основі культури клітин вищих рослин є виробництво *in vitro* суспензійної культури клітин *Lithospermum*, яке здійснено в Японії. З цієї культури отримують нафтохіноновий пігмент – шиконін [86]. У багатьох країнах створено національні колекції рослинних клітин та тканин *in vitro* з метою підтримання їх в стані росту, а також поповнення новими штамми культур клітин рослин, для надання їх для науково дослідних проектів [87, 174].

Понад 30 років лабораторії по всьому світу намагаються виробляти натуральні продукти для комерційного застосування з рослинними клітинами та культурами органів. Комерційний успіх цього дослідження все ще дуже обмежений через занадто низький вихід продукції, що спричиняє великі виробничі витрати. Однак окремі види рослин виявились перспективними для утворення культур органів та одержання вторинних метаболітів із хорошими врожайми [86, 87]. За значний період дослідження культур клітин вищих рослин отримано понад сотню різних продуцентів цінних біологічно активних речовин. Встановлено, що клітини рослин *in vitro* можуть синтезувати практично всі класи вторинних метаболітів і сотні індивідуальних біологічно активних речовин з

різноманітною біологічною активністю. Вміст деяких БАР в культурі клітин перевищує такий в інтактній рослині [185, 200].

Роботи в цій галузі тривають у багатьох розвинених країнах світу: США, Англії, Франції, Німеччині, Росії, Японії, Індії, Китаї, Південній Кореї, Фінляндії, Угорщині та ін. В Україні дослідження з метою створення клітинних штамів - продуцентів БАР проводяться в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України з кінця минулого століття. Створено унікальні високопродуктивні штами женьшеню, родіоли рожевої, елеутерококу, полісціасу папоротлистоного, арнебії барвної, ряду тропічних видів раувольфії, маку приквітникового, унгернії Віктора, рути запашної та інших видів цінних лікарських рослин [108, 109].

Серед досліджуваних рослин є представники родини *Ranunculaceae*: аконіт, дельфіній, ломиніс, тирлич, арніка, відкашник та інші. Здійснено розмноження сортів ломиносу методами *in vitro*, доведено можливість регенерації рослин шляхом прямого і непрямого соматичного ембріогенезу [92, 123].

Існують дані щодо введення в культуру *in vitro* рослини з родини жовтецевих *Cimicifuga racemosa*, препарати якої мають перспективу застосування для негормональної корекції клімактеричних розладів [112].

Дослідження, пов'язані з культивуванням калюсних біомас проводяться у провідних наукових лабораторіях та ЗВО України [113-115], зокрема в Національному університеті «Львівська політехніка» [116, 117].

Треба зазначити, що використання біотехнологічних методів дозволить стандартизувати склад як лікарської сировини, так і готових фітопрепаратів, і вивести їх із групи лікарських засобів із дискутабельною ефективністю.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Рослини родини *Ranunculaceae* Juss., зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., є джерелом є великої кількості БАР, мають чисельні фармакологічні активності, здавна використовуються у народній медицині і є перспективною сировиною для виробництва фітопрепаратів. Однак, це рідкісні види лікарських рослин, запаси рослинної

сировини є обмежені, і на українському ринку ЛЗ на основі сировини *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. відсутні. Альтернативним джерелом одержання біомаси та продукованих цими рослинами БАР є культивування в умовах *in vitro*. Використання методу клітинних культур дозволить регулювати процес накопичення калюсної біомаси, оптимізувати умови вирощування з метою збільшення кількості цільового продукту, а також стандартизувати склад як лікарської сировини, так і готових фітопрепаратів.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Загальна методологія досліджень

Використання рослин родини *Ranunculaceae*, зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., а також синтезованих ними БАР у сучасній медицині постійно зростає. Найбільше зацікавлення викликають можливості створення ЛП з протипухлинною активністю, що підвищують тривалість і якість життя (адаптогени, біостимулятори, імуностимулятори), а також кардіологічні та протимікробні лікарські засоби.

Однак технологія виробництва лікарських засобів на основі ЛРС суттєво відрізняється від виробництва інших ЛЗ. Основними параметрами, що формують специфічність технологічних операцій, є варіативність показників якості вихідної сировини. Ці показники визначаються її природним походженням, умовами заготівлі та зберігання, пов'язані із різномірністю фізико-хімічних параметрів (питома вага, ступінь подрібнення, волога тощо). Це унеможлиблює застосування стандартних технологічних прийомів фармацевтичної розробки [58, 94, 96]. Особливої уваги потребує стандартизація ЛРС та одержаних на її основі субстанцій та засобів, приведення у відповідність до певного вмісту компонентів з відомою фармакологічною дією в межах прийнятності [95, 132].

Окремим важливим завданням є пошук поновлюваних джерел БАР рослинного походження. Культивування клітин, тканин і органів рослин родини *Ranunculaceae* в умовах *in vitro* є альтернативним способом виготовлення фітосировини на їх основі. Біомаса культивованих клітин є джерелом сировини контрольованої якості, збагаченої необхідними речовинами або позбавленої від них.

З метою вибору стратегії наукової роботи та визначення загальної методології дисертаційної роботи нами було встановлено певні етапи дослідження у відповідності до поставлених завдань.

Програмно-цільову структуру дисертаційної роботи наведено в табл. 2.1.

Програмно-цільова структура роботи

I етап	Обґрунтування стратегії вирішення поставлених завдань – вивчення ресурсної бази ЛРС, дослідження характеристик рослин родини <i>Ranunculaceae</i> , зокрема <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> Reichenb., огляд способів культивування біомас з метою одержання необхідних БАР, проведення порівняльного аналізу калюсної біомаси та рослинної сировини на вміст БАР; одержання та стандартизація екстрактів калюсних біомас та дослідження їх біологічної активності.		
II етап	Визначення об'єкту дослідження з урахуванням показників, необхідних для подальшого застосування у технології виробництва лікарських засобів на основі ЛРС - комплексне фітохімічне дослідження рослинної сировини та калюсної біомаси <i>Anemone nemorosa</i> L., <i>Delphinium elatum</i> L., <i>Pulsatilla alba</i> Reichenb., субстанцій на їх основі.		
III етап	Одержання препаратів (субстанцій, екстрактів та калюсів) на основі <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> .		
	Дослідження хімічного складу та числових показників доброякісності лікарської рослинної сировини.	Введення в культуру <i>in vitro</i> <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> Reichenb. Отримання калюсних біомас.	Одержання екстрактів з ЛРС та КБ <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> Reichenb.
IV етап	Проведення комплексу досліджень показників та властивостей рослинної сировини, калюсної біомаси та екстрактів <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> Reichenb.		
	Фітохімічні дослідження <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> Reichenb.: ідентифікація та кількісні визначення БАР.	Дослідження фармакологічної дії: антимікробної, антифунгальної, антиоксидантної, протизапальної та гепатопротекторної досліджуваних об'єктів.	Мікробіологічні дослідження: визначення мікробної чистоти, протимікробної та протигрибкової активності.
V етап	Стандартизація екстрактів та калюсних біомас <i>A. nemorosa</i> L., <i>D. elatum</i> L., <i>P. alba</i> Reichenb.		

2.2. Об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження у нашій роботі було комплексне фітохімічне дослідження рослинної сировини та калюсної біомаси *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., субстанцій на їх основі.

Як сировину використано траву, насіння та корені досліджуваних лікарських рослин родини *Ranunculacea*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. Заготівлю лікарської рослинної сировини було здійснено в різні фази вегетації, враховуючи її особливості щодо умов заготівлі та дотримуючись бережливого ставлення до флори гірських районів Івано-Франківської та Львівської областей. Сушіння відбувалось повітряно-тіньовим методом без штучного підігрівання сировини. Сировину було очищено від непотрібних частин продуктивної рослини, видалено дефектні та знебарвлені частини рослин, подрібнено та стандартизовано згідно вимог аналітично-нормативної документації [71]. Ідентифікація рослинної сировини проведена за макроскопічними ознаками [12, 13].

Для досліджень використано як об'єкти: траву *A. nemorosa* L., траву *D. elatum* L., траву *P. alba* Reichenb., відповідні калюсні біомаси досліджуваних рослин та екстракти на їх основі.

Як об'єкти для культивування *in vitro* використовували насіння *A. nemorosa* L., та *D. elatum* L., а також насіння і корінь *P. alba* Reichenb.

Об'єктами для проведення біологічних і фармакологічних досліджень були екстракти досліджуваної рослинної сировини та екстракти калюсних біомас.

2.3 Методи та методики досліджень

2.3.1. Визначення параметрів та показників якості лікарської рослинної сировини

Визначення параметрів ЛРС, а саме трави *A. nemorosa* L., трави *D. elatum* L., трави *P. alba* Reichenb., насіння *A. nemorosa* L., та *D. elatum* L., насіння і кореня *P. alba* Reichenb. проводили за методиками,

запропонованими у [18, 97]. Визначалась об'ємна маса, насипна маса, питома маса, пористість, нарізність, вільний об'єм шару.

Визначення показників якості ЛРС здійснювали за методиками, наведеними у ДФУ: втрата в масі при висушуванні (п. 2.2.32), зола загальна (п. 2.4.6), сторонні домішки (п.2.8.2), зола, не розчинна в кислоті хлористоводневій (п.2.4.16), важкі метали (п. 2.4.27) [97].

- Сторонні домішки: не більше 5,0 % [97].

- Втрата в масі при висушуванні. Визначення вмісту вологи проводили на 5-ти серіях сировини за методикою ДФУ, розділ 2.2.32. Вміст вологи не перевищував 10,0%. 1 г здрібненої на порошок сировини сушили при температурі 105 °С протягом 2 год. [97].

- Визначення вмісту золи загальної на 5-ти серіях сировини проводили за методикою ДФУ II видання, розділ 2.4.16. Вміст загальної золи не перевищував 10,0% [97].

- Визначення золи, нерозчинної у 10,0% розчині кислоти хлористоводневої проводили на 5-ти серіях сировини за методикою Доповнення 2 ДФУ II видання, розділ 2.8.1. Вміст золи, нерозчинної у 10,0% розчині кислоти хлористоводневої, не перевищував 2,0% [97].

- Визначення важких металів проводили на 5-ти серіях сировини за методикою Доповнення 2 ДФУ II видання, розділу 2.4.27. Визначали вміст кадмію, свинцю та ртуті. Вміст кадмію не перевищував 1,0 ppm, свинцю – був не більше 5,0 ppm, а ртуті – не більше 0,1 ppm [97].

- Вміст частинок, що проходять крізь сито з отворами діаметром 2 мм, не більше 6,0% [97].

- Числові показники. Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на рутин не менше 1,5%; втрата в масі при висушуванні не більше 13%; загальної золи не більше 9%; органічних домішок не більше 2%, мінеральних - не більше 1% [97].

- Зберігання. Сировину зберігають в добре провітрюваних приміщеннях, не більше 3 років [97].

2.3.2. Введення в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.

Для введення в культуру *in vitro* було використано наступну методику на основі [26]. Отримання експлантів з насіння в умовах *in vitro* із подальшим внесенням асептично оброблених тканин рослин та культивуванням у модифікованих середовищах на основі середовища Мурасиге-Скуга [128].

I. Підготовка насіннєвого матеріалу.

Стратифікацію насіння проводили чотирма методами:

1) Обробку насіння концентрованою сірчаною кислотою здійснювали протягом 1хв, занурювали в холодну воду і поміщали в холодильник на 48 год.

2) Обробку киплячою водою проводили протягом 2 хв і поміщали в холодильник на 48 год.

3) Пошкодження зовнішньої оболонки насіння здійснювали наждачним папером, після чого поміщали в холодильник на 48 год.

4) Замочування в холодній воді проводили протягом 1 доби.

Проводили стерилізацію насіння за наступними схемами:

а) Насіння поміщали у підготовану ємність зі стерильним 70 % етанолом та залишали на 1 хв, потім занурювали у відповідний стерилізуючий розчин на відповідний час за вибраною схемою (див. розділ 3), тоді витримували 10 хв у стерильній воді, тоді тричі промивали дистильованою водою.

б) Насіння занурювали у свіжоприготований розчин гіпохлориту натрію, (1частина 5% розчину і три частини води) → промивали мильним розчином → промите насіння поміщали у марлеві мішечки по 10 насінин → далі мішечки переносили в бокс на одну хвилину → поміщали в склянку з 70% етанолом → стерильним пінцетом переносили у склянки із стерилізуючим розчином і витримували 15-20 хв, дотримуючись умови, що об'єм насіння повинен займати одну четверту частину об'єму розчину → простерилізоване насіння промивали у стерильній дистильованій воді

протягом 10 хв, промивання повторювали тричі → відтиснули зайву вологу з проавтоклавованим паперовим фільтром.

II. Одержання експлантів з насіння в умовах in vitro.

Стерильне насіння переносили у чашки Петрі на безгормональне живильне стандартне агаризоване середовище Мурасиге-Скуга, які поміщали у термостат при температурі 23 °С та відсутності світла. Насіння вирощували протягом 2 тижнів в зазначених умовах.

Асептично вирощені проростки ділились на сегменти, що були експлантами для ініціації калюсогенезу [129].

III. Культивування рослини та отримання калюсної біомаси.

Експланти поміщали на оптимізоване живильне середовище. Для культивування мінеральну основу живильних середовищ доповнювали вітамінами, регуляторами росту, сахарозою (30%), мезоінозитом (100 мг/л). Одержані на підготовчому етапі результати дали можливість визначити найбільш сприятливі для росту експлантів компоненти живильного середовища. Внесено у середовище від 0,1 до 3,0 мг/л ауксинів - індолілоцтову кислоту, α -нафтил-1-оцтову кислоту, 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту у різних співвідношеннях та від 0,02 до 1 мг/л 6-фурфуриламінопурину (кінетину). У деяких зразках використано цитокінін 6-бензил-амінопурин і гіберелову кислоту. До складу середовищ внесено агар у кількості 8-9 г/л, рН середовища становив 5,7. Культивування проводили з фотоперіодом 16/8 год (освітлення / відсутність освітлення), при освітленні 3000 лк, температурі 26 °С ($\pm 2-3$ °С) та відносній вологості 60-70%. Тривалість культивування складала 45-60 діб. Здійснювали мікробіологічний і візуальний моніторинг з метою спостереження динаміки росту калюсу на оптимізованому живильному середовищі. Усі експерименти проведено в трьох повторах та результати опрацьовано статистично [130].

2.3.3. Стандартизація калюсної біомаси

Культура рослинних тканин ґрунтується на хаотичному поділі клітин, внаслідок чого з'являється калюсна тканина. Як свідчили органолептичний контроль та мікроскопування, паренхімні клітини дедиференціювались, починали ділитися і утворювали недиференційовану біомасу. Таким чином калюс являв собою недиференційовану біомасу, що виростала з експлантату на штучному поживному середовищі в асептичних умовах. Культуру калюсної тканини можна довго підтримувати, періодично поділяючи її на трансплантати. Однак, кожна окрема культура ізольованих тканин мала свої цитологічні, генетичні, морфологічні особливості. Культуру тканин рослин вирощували двома методами: поверхневим і суспензійним. Для першого методу використовували агаризовані живильні середовища, тонкі шари гелю, рідкі середовища. При суспензійному методі калюсна тканина безперервно вирощувалась у рідкому живильному середовищі. Окремою характеристикою є утворення метаболітів. Важливим фактором створення ефективної біотехнологічної системи є вибір компонентів живильного середовища: макро- та мікроелементів, фітогормонів, джерел вуглецю, оптимального для біосинтезу заданих БАР.

2.3.4. Методики одержання екстрактів *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.

У роботі було досліджено екстракти з рослинної сировини *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., а також з калюсних біомас, одержаних за методикою наведеною у п. 2.3.1.

В даній роботі використовували водні та водно-спиртові (вода-етанол) настойки з висушеної рослинної сировини, виготовлені методом мацерації [188], а також водно-спиртові та хлороформні екстракти, одержані безперервною (вичерпною) екстракцією у апараті Сокслета [189].

Як екстрагент для одержання настоянок використовували водно-етанольні розчини різної концентрації 20 %, 40 %, 70 % та 90 %, при

масовому співвідношенні сировини до екстрагенту як 20:1. Екстракти витримували у закритих скляних контейнерах в темному прохолодному місці. Одержані настойки освітлювали шляхом відстоювання та фільтрування. Залишок відтискали та об'єднували з фільтратом [131].

Одержання екстрактів з калюсної біомаси проводили мацерацією та вичерпною екстракцією. Для хімічного аналізу БАР використано калюс 1-го і 2-го пасажу.

Для отримання настоянки калюсної біомаси до 5,5 г сухої подрібненої КБ додавали 75 мл 70 % розчину етанолу, витримували 2 доби, потім суміш нагрівали протягом 30 хв на водяній бані, одержаний екстракт охолоджували.

Отримання екстрактів вичерпною екстракцією проводили в апараті Сокслета. Екстракцію проводили при співвідношенні сировина: екстрагент як 1:10 до повного виснаження вихідної сировини. Як екстрагенти використали водно спиртові розчини з концентраціями 20 %, 40 % та 70 %. У патрон екстрактора завантажували наважку сировини 50 г при використанні 500 мл розчинника.

Одержаний екстракт фільтрували та концентрували у вакуум-ротаторному випарювачі [133] при 40 °С.

Обрахунок екстрактивних речовин (масу, г) проводили згідно з формулою:

$$X = \frac{(A-B) \times 100}{B} \times 100\%, \quad (2.1)$$

де A – маса приймача з БАР, г;

B – маса пустого приймача, г;

B – наважка сировини, г.

Усі експерименти проведено в 5 повторах та результати опрацьовано статистично [130].

Для визначення суми поліфенолів та екстрактивних речовин екстрагування проводили наступним чином: 2,0 г сировини (точну наважку) відбирали з кожної отриманої фракції та поміщали в колбу ємкістю 100 мл,

додавали очищену воду у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:50. На водяному нагрівнику нагрівали зі зворотнім холодильником при температурі кипіння екстрагенту протягом 15 хв, при цьому періодично перемішуючи. Одержану витяжку охолоджували та фільтрували, в разі необхідності доводили водою до початкового об'єму.

2.3.5. Методики визначення стандартних показників екстрактів

З метою стандартизації екстрактів визначали наступні показники відповідно до вимог ДФУ [22].

Для екстрактів визначали сухий залишок, вміст важких металів, мікробіологічну чистоту, проводили їх ідентифікацію хроматографічним методом і визначали кількісний вміст біологічно активних речовин.

Важкі метали. Дані визначень для досліджуваних об'єктів – екстрактів ЛРС та КБ не більше 0,01 % (ДФУ, 2.4.8, метод А).

Сухий залишок. Дослідження проводили згідно вимог ДФУ 2.8.16. Брали 2,0 г досліджуваних екстрактів та вносили у попередньо зважений бюкс, насухо випарювали на водяній бані з подальшим сушінням у сушильній шафі протягом 3 год при температурі 100-105 °С. Бюкс охолоджували в ексикаторі та зважували.

Мікробіологічну чистоту визначали за методикою, наведеною у п. 2.3.8.1.

Екстракти трави досліджуваних рослин *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. піддавали фітохімічному аналізу (див. п.2.3.5. - п.2.3.7.).

Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ [22].

2.3.6. Дослідження якісного складу екстрактів

I. Для попередньої оцінки якісного складу екстрактів виконали якісні реакції згідно з стандартними методиками [48].

Для визначення фенольних зв'язків [35]:

- до 1 мл екстракту додають 1% розчин феруму (III) хлориду, у присутності поліфенолів спостерігають появу фіолетового забарвлення;

- до 1 мл екстракту 3-5 крапель щойно приготованої суміші рівних об'ємів розчинів 1% феруму (III) хлориду та 1% калію фериціаніду і 10 крапель концентрованої нітратної кислоти, у присутності поліфенолів спостерігають появу темно-бурого забарвлення;

- до 1 мл екстракту 2-4 краплі 1% розчину ваніліну в концентрованій хлоридній кислоті, у присутності поліфенолів спостерігають появу червоного забарвлення.

Для виявлення кислот до 1 мл екстракту додають 2-3 краплини 0,05% розчину бромтимолового синього і спостерігають появу жовтого забарвлення.

Для ідентифікації дубильних речовин:

- до 2 мл водних витяжок краплями додають 2 мл щойно приготованого 1% розчину желатини і 2 краплі 10% розчину хлоридної кислоти, в присутності дубильних речовин спостерігають утворення осаду;

- до 3 мл водних витяжок додають краплями розчин хініну гідрохлориду, в присутності дубильних речовин спостерігають утворення осаду (помутніння);

- до 1 мл водних витяжок додають 2 краплі розчину заліза (III)-амонію сульфату, в присутності дубильних речовин спостерігають чорно-синє забарвлення;

- до 2 мл екстракту по краплях додають бромну воду (5 г/л) до появи запаху бромю, в присутності конденсованих дубильних речовин спостерігають утворення осаду.

Для виявлення алкалоїдів:

- з реактивом Вагнера та Бушарда (розчин йоду в розчині калію йодиду) у присутності дельсиміну спостерігають цегляно-червоне забарвлення;

- з реактивом Драгендорфа (розчин вісмуту нітрату основного, калію йодиду та кислоти оцтової) у присутності елатину спостерігають коричневе забарвлення;
- з реактивом Майєра (розчин дихлориду ртуті та йодиду калію) у присутності делартину спостерігають дрібнодисперсний світло-жовтий осад;
- з реактивом Марме (розчин кадмію йодиду в калію йодиді) у присутності кондельфіну спостерігають білий осад.

II. Тонкошарова хроматографія [135] застосовувалась для ідентифікації фенольних сполук за таких умов: проводилась на пластинках Silica gel 60 20×20 см, як елюент використовували: суміш розчинників етилацетат – метанол – вода (100:6:20), або суміш хлороформ – етилацетат – мурашина кислота (5:4:1), розділення речовин спостерігали при денному та УФ-світлі до і після обробки церійфосфомолібденовим реактивом складу: 12 г $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 г $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ у 1000 мл 10% H_2SO_4 .

2.3.7. Кількісні визначення БАР

2.3.7.1. Кількісний вміст суми фенолів

Кількісне визначення фенольних сполук спектрофотометричним методом у перерахунку на галову (3,4,5-триоксибензойну) кислоту проводили за методикою з реактивом Фоліна-Чокальтеу [35].

Готували стандартний розчин галової кислоти, для чого 0,1г триоксибензойної кислоти розчиняли у дистильованій воді у мірній колбі місткістю 100 мл (доводили до мітки при температурі 20 °С). Зі стандартного розчину готували розведені розчини з концентраціями від 1 мг/мл до 0,1 мг/мл. Брали проби об'ємом 0,02 мл усіх розведених розчинів, додавали до кожної по 1,58 мл води очищеної та 0,1 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу. Витримували проби 8 хв без доступу світла, додавали по 0,3мл насиченого розчину карбонату натрію і знову поміщали в темне місце на 2 год. Таким же чином готували розчини досліджуваних екстрактів. Вимірювання проводили

в кюветі товщиною 10 мм при 760 нм на спектрофотометрі Spectrophotometer DH 640B Beckman. Обчислення проводили за рівнянням лінії тренду графічної залежності оптичної густини розчинів галової кислоти від їх концентрації.

Усі експерименти проведено в 3 повторах та результати опрацьовано статистично [130].

2.3.7.2. Кількісне визначення флавоноїдів.

Кількісне визначення флавоноїдів проводили спектрометричним методом [136] за методикою Кріста Мюллера. Готували контрольний розчин складу: 0,8 мл метанолу, 0,2 мл етанолу 96%, 60 мкл розчину натрію нітриту з концентрацією 5%. Свіжоприготований розчин витримували 5 хв, додавали 60 мкл розчину алюмінію хлориду з концентрацією 10%. Витримували 5 хв., додавали 0,4 мл 1М розчину натрію гідроксиду та 0,48 мл етанолу. Витримували протягом 5 хв без доступу світла.

Для приготування досліджуваного розчину до 0,8 мл метанолу додавали 0,2 мл розчину, що складався з 500 мкл екстракту та 1500 мкл етанолу, 60 мкл розчину натрію нітриту з концентрацією 5%. Тоді, як і стандартний розчин, витримували 5 хв., додавали 0,4 мл 1М розчину натрію гідроксиду та 0,48 мл етанолу. Витримували протягом 5 хв. Обчислення проводили за рівнянням лінії тренду графічної залежності оптичної густини розчинів кверцетину від їх концентрації. Оптичну густину розчинів вимірювали при 510 нм. Експерименти проведено в п'яти повторах та результати опрацьовано статистично [130].

2.3.7.3. Кількісне визначення гідроксикоричних кислот.

Для кількісного визначення гідроксикоричних кислот використали спектрофотометричний метод. Вимірювання проводили за довжини хвилі 327 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Точну наважку, а саме 2,5 г ЛРС або КБ, просіювали крізь сито з діаметром отворів 1 мм, поміщали в колбу місткістю 200 мл. Туди ж додали 60 мл води очищеної. Колбу приєднували до зворотнього холодильника та протягом 15 хв нагрівали на водяному нагрівнику. Екстрагування проводили ще двічі при тих самих умовах. Витяжки об'єднували і фільтрували. Фільтрат переносили у мірну колбу місткістю 200 мл і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (розчин А).

У мірну колбу місткістю 25 мл вносили 1 мл розчину А і розчиняли у 20% етиловому спирті, доводили об'єм розчину тим самим розчинником до мітки. Оптичну густину одержаного розчину вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 327 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Сумарний вміст (у %) гідроксикоричних кислот (X) у перерахунку на хлорогенову кислоту обчислювали за формулою (3.2):

$$X = \frac{G_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{G_0 \cdot m_1 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)}, \quad (2.1)$$

де G_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

m_0 – наважка стандартного зразка кислоти хлорогенової, г;

G_0 – оптична густина розчину кислоти хлорогенової;

m_1 – наважка сировини, г;

W – втрата в масі при висушуванні, %.

Експерименти проведено в п'яти повторах та результати опрацьовано статистично [78, 108].

2.3.7.4. Кількісне визначення антоціанів.

Вміст антоціанів визначали спектрофотометрично [112]. До 5 г сировини (точна наважка) додавали 95 мл метанолу та протягом 30 хв механічно розмішували. Фільтрували в мірну колбу на 100 мл. Фільтр ополоскали і об'єм розчину довели метанолом до 100 мл. Приготували 50-кратне розведення цього розчину в розчині 0,1% хлористоводневої кислоти в метанолі.

Оптичну густину розчину вимірювали за 528 нм, використовуючи як компенсаційну рідину розчин 0,1% хлористоводневої кислоти в метанолі. Вміст антоціанів (у %) у перерахунку на ціанідин-3-О-глюкозиду хлорид розраховували за формулою:

$$X = \frac{G \times 5000}{718 \times m} \cdot 100\% , \quad (2.2)$$

де G – оптична густина випробуваного розчину за довжини хвилі 528 нм;

m - маса наважки випробуваної сировини, г.

Використовують питомий показник поглинання ціанідин-3-О-глюкозиду хлориду що становить 718.

Експерименти проведено в п'яти повторах та результати опрацьовано статистично.

2.3.7.5. Кількісне визначення дубильних речовин.

Кількісне визначення дубильних речовин (танінів) проводили спектрофотометрично у перерахунку на пірогалол [124].

До 10 мл профільтрованого екстракту додавали 0,1 г шкірного порошку і енергійно струшували протягом 60 хв. Знов фільтрували, відбирали 5 мл фільтрату і доводили водою очищеною до 25 мл (P1).

Змішували 2 мл P1, 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву (ФМВР) і 10 мл води очищеної і доводили розчином натрію карбонату до 25 мл, одержували розчин P2. Оптичну густину P2 вимірювали через 30 хв.

Розчин порівняння: брали свіжоприготований розчин 0,05 г у 100 мл води дистильованої (P3), 5 мл P1 розводили водою очищеною до 100 мл (P4).

Суміш 2 мл P4, 1 мл ФМВР і 10 мл води доводили розчином натрію карбонату до 25 мл (P5). Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину P5 при 760 нм.

Вміст танінів (X), у перерахунку на пірогалол обчислювали за формулою:

$$X = \frac{62,5 \cdot (G_1 - G_2) \cdot m_2}{G_3 \cdot m_1}, \quad (2.3)$$

де m_1 – маса досліджуваного зразка, г;

m_2 – маса пірогалолу, г;

$(G_1 - G_2)$ – різниця оптичних густин стандартного (відомого) та досліджуваного розчину;

G_3 – оптична густина розчину порівняння.

Експерименти проведено в п'яти повторах та результати опрацьовано статистично [130].

2.3.7.6. Кількісне визначення гідрокінонпохідних сполук.

Визначення проводили спектрофотометрично [29].

Вихідний розчин готують наступним чином: до 0.4 г подрібненої досліджуваної сировини додавали 50 мл води очищеної, витримують на киплячій водянній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв (P1). Охолоджують та кількісно переносять за допомогою води очищеної у мірну колбу місткістю 250 мл, доводять водою до позначки та перемішують. Витримують до осадження частинок і використовують надосадову рідину (P2). 5.0 мл розчину P2 поміщають у ділильну лійку, додають 45 мл води, 1 мл розчину 2 % (м/об) розчину амінопіразолону, 0.5 мл розчину аміаку розведеного та 1 мл розчину 8 % (м/об) калію фероціаніду, ретельно перемішуючи після додавання кожного з реактивів (P3). Витримують протягом 5 хв, одержаний водний шар струшують не менше як із трьома порціями, по 25 мл кожна, хлороформу, хлороформний шар кожний раз фільтрують крізь попередньо промитий хлороформом фільтр у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину хлороформом до позначки та перемішують (P4).

Для порівняння використовують як вихідний розчин арбутину (0.015 г, точна наважка) у 100 мл води очищеної, з яким проводять операції аналогічні тим, які здійснюють для одержання Р2, Р3, Р4.

Оптичну густина вимірюють за довжини хвилі 455 нм, використовуючи як компенсаційну рідину хлороформ.

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

$$X = \frac{G \times m_0 \times 2,5 \times P}{G_0 \times m_0}, \quad (2.4)$$

де: G — оптична густина випробовуваного розчину;

G₀ — оптична густина розчину порівняння;

m₀ — маса арбутину, г;

P — вміст арбутину безводного у зразку арбутину, %;

m — маса досліджуваної проби, г.

Експерименти проведено в п'яти повторах та результати опрацьовано статистично [130].

2.3.7.7. Високоєфективна рідинна хроматографія

Аналіз вмісту фенолів та флавоноїдів проводили методом високоєфективної рідинної хроматографії [137] на рідинному хроматографі Ultimate 3000 Dionex, спорядженому фотодіодним детектором, із застосуванням програми 6.8 Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). До 0,2 мл готового екстракту додали 1,8 мл етанолу. До 100 мкл отриманого розчину додали 900 мкл метанолу і вносили в хроматограф. Ідентифікація БАР проводилась співставленням піків в УФ-діапазоні та часу утримання.

2.3.7.8. Газова хроматографія

Аналіз біологічно активних речовин ліофільної фракції проводили за допомогою газової хромато-мас спектрометрії [138] з використанням газового хроматографа Agilent Technology 6890 GC. Масовий селективний

детектор HP 5973. Компоненти розділяли в плавленому діоксиді кремнію. Використовувалась колонка Restek Rtx-5MS довжиною 30 м з внутрішнім діаметром 0,32 мм., нерухомою фазою товщиною 0,25 мкм, яка складалася з 95% поліметилсилоксану і 5% фенілполісилоксану. Газом-носієм був гелій. Швидкість газу-носія була 2,0 мл/хв. Термостат колони нагрівався за такою програмою: початкова температура 60°C витримується протягом 10 хвилин, підвищення температури відбувається зі швидкістю 20 °C/хв, кінцева температура 280 °C витримується протягом 30 хв. Температура детектора та випаровувача 280°C. БАР були ідентифіковані за часом їх утримання, через порівняння їх зі стандартами з бібліотек мас-спектрів NIST 05 і WILEY 2007, загальна кількість спектрів більше 470000.

2.3.8. Визначення антиоксидантної дії екстрактів

2.3.8.1. Визначення сумарної антиоксидантної дії екстрактів

Визначення загальної (сумарної) антиоксидантної дії екстрактів визначали за знешкодженням катіон-радикалу 2,2'-азино-біс(3-етиленбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) (АТБС) у відповідності до наступної методики [139]. АТБС - стабільний катіон-радикал, який отримують витримкою суміші, що містить діамонійної солі 2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти (ДС АТБС) і калію персульфату ($K_2S_2O_8$) у співвідношенні об'ємів розчинів 1:1, за умови, що концентрація ДС АТБС дорівнює 7 мМ, концентрація $K_2S_2O_8$ дорівнює 2,45 мМ. Витримування відбувається при кімнатній температурі та темному місці протягом 20 год. З'являється характерне темно-зелене або синьо-зелене забарвлення притаманне АТБС, оптична густина розчину має максимум поглинання (λ макс.) при довжині хвилі 734 нм. У присутності антиоксидантів забарвлений АТБС відновлюється до вихідної безбарвної форми.

Робочий розчин АТБС (Р1) був зроблений рівно через 20 год. У колбу об'ємом 100 мл внесли 1 мл розчину 3 і довели водою до мітки. Проведено виміри параметрів Р1 (калібрування).

Проведення дослідів здійснювали таким чином: до 100 мкл екстракту додали 1 мл Р1, одержали розчин для вимірювання Р2. Через 6 хв було зроблено вимірювання оптичної густини одержаного розчину. Оптичну густину визначали у порівнянні з контрольним розчином,

До 100 мкл екстракту додавали 1 мл дистильованої води. Вимірювали зміни оптичної густини при довжині хвилі 734 нм після витримання 6 хв у темному місці [140]. Антирадикальну активність розраховували за формулою:

$$X = \frac{G_0 - G_{\text{вим.}}}{G_0} \cdot 100\%, \quad (2.5)$$

де: де: G_0 – оптична густина розчину Р1; $G_{\text{вим.}} = G_{\text{досл.}} - G_{\text{контр.}}$; де $G_{\text{досл.}}$ – оптична густина досліджуваного розчину Р2; $G_{\text{контр.}}$ – оптична густина контрольного розчину.

Статистичну обробку виконували за допомогою комп'ютерної програми пакету статистичних функцій програми Microsoft Excel, 2019 з урахуванням середніх арифметичних величин M та стандартної похибки середнього арифметичного m у вигляді $(M \pm m)$ при $n=5$. Відмінності між експериментальними даними визначали за допомогою тесту Тьюкі однофакторного аналізу (ANOVA), відмінності вважали достовірними у випадку $P < 0,05$ [142].

2.3.8.2. Визначення часткової антиоксидантної дії екстрактів

Визначення часткової антиоксидантної дії (гідрофобних сполук) екстрактів проведено методом визначення радикал-поглинальної активності [141], що базується на реакції з відносно стабільним радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилом (DPPH). Розчин DPPH (використовується одразу після приготування) має глибокий фіолетовий колір. Молекули антиоксидантів

здатні відновлювати вільні радикали DPPH і перетворювати їх у безбарвний або слабо-жовтий продукт (як правило 2,2-дифеніл-1 гідразин або інші аналоги), що призводить до зменшення оптичної густини при довжині хвилі $\lambda_{\text{макс.}} = 517 \text{ нм}$.

Дослід проведено за наступною методикою.

До 500 мкл екстракту додавали 4,5 мл DPPH (концентрація 0,1 моль). Витримували одержану суміш в темному місці протягом 90 хв. Відбирали пробу, проводили вимірювання оптичної густини на приладі ULAB 108UV (спектрофотометрі).

Результати рахували за формулою

$$X = \frac{G_{\text{контр.}} - G_{\text{реч}}}{G_{\text{контр.}}} \cdot 100\%, \quad (2.5)$$

де: $G_{\text{контр.}}$ – оптична густина контрольного розчину вільного DPPH.

$G_{\text{реч.}}$ – оптична густина розчину DPPH з досліджуваною речовиною

Як еталони порівняння для усіх дослідів з визначення антиоксидантної активності використовувались аскорбінова кислота та кверцетин.

Статистичну обробку виконували за допомогою комп'ютерної програми пакету статистичних функцій програми Microsoft Excel, 2019 з урахуванням середніх арифметичних величин M та стандартної похибки середнього арифметичного m у вигляді $(M \pm m)$ при $n=5$. Відмінності між експериментальними даними визначали за допомогою тесту Тьюкі однофакторного аналізу (ANOVA), відмінності вважали достовірними у випадку $P < 0,05$ [142].

2.3.9. Мікробіологічні дослідження

2.3.9.1. Відсутність мікробної контамінації

Випробування на відсутність мікробного забруднення проводили згідно з вимогами [143].

10 мл засобу поміщали у флакон і доводили об'єм до 100 мл буферним розчином із натрію хлориду і пептону рН 7,0 та перемішували (зразок № 1).

Для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС) по 1 мл випробовуваного зразка №1 вносили в дві чашки Петрі, після чого додавали по 20 мл розплавленого і охолодженого до температури 4°C соєво-казеїнового агару.

Для визначення загального числа дріжджових і плісневих грибів по 1 мл випробовуваного зразка №1 вносили в дві чашки Петрі і додавали по 20 мл розплавленого і охолодженого до температури 45°C сабуро-декстрозного агару.

Посіви на соєво-казеїновому агарі інкубували протягом 3-5 діб при температурі 30°C, на сабуро-декстрозному агарі 5-7 діб при температурі 20°C.

Для виявлення *Escherichia coli* 10 мл випробовуваного зразка №1 поміщали в 100 мл соєво-казеїнового бульйону, інкубували протягом 18-24 год при температурі 30°C. Після закінчення інкубації струшували флакон і 1 мл його вмісту вносили в 100 мл бульйону Мак-Конкі. Інкубували протягом 24-48 год при температурі 40°C. Після закінчення інкубації пересівали на чашку з агаром Мак-Конкі. Посіви інкубували протягом 36 год при температурі 30°C.

В препараті дозволяється загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше, ніж 10^4 бактерій та не більш, ніж 10^2 грибів в 1 мл. Не дозволяється наявність бактерій *Escherichia coli* в 1 мл і *Salmonella* в 25 мл. Не дозволяється наявність *Staphylococcus aureus* в 1 мл. Не дозволяється наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл толерантних до жовчі грамнегативних бактерій: не більше 10^2 КУО/мл.

2.3.9.2. Визначення протимікробної та протигрибкової активності екстрактів

Протимікробну та протигрибкову дію екстрактів ЛРС надземних, підземних органів та екстрактів КБ анемони дібрової (*A. nemorosa* L.), сну білого (*P. alba* Reichenb.), дельфінію високого (*D. elatum* L.) визначали

методом дифузії в агар (відомим як метод «колодязів») та методом серійних розведень . (розщеплення резазурину в бульйоні), використовуючи 10 референс-культур та 4 клінічні ізоляти мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з інфекціями, що пов'язані з наданням медичної допомоги. Було використано такі референс-культури: *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 (F-49), *Staphylococcus epidermidis* 191, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus licheniformis* ВКПМ-7038, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Candida albicans* ATCC 885/653, *Candida albicans* ATCC 668-853; а також клінічні ізоляти: *Staphylococcus aureus* № 142, *Escherichia coli* №5, *Proteus vulgaris* 165, *Candida albicans* №60, *Candida membranifaciens* 117.

Всі клінічні ізоляти були полірезистентними до антибіотиків (multiple drug resistance (MDR)), з музею культур збудників інфекційних хвороб кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, а саме: *Candida albicans*, резистентних до ністатину (*nis*) та *Candida non-albicans*, резистентних до азолів (кетоконазол - *ket*). Агаліз здійснено відповідно до Європейських рекомендації критеріїв оцінювання ступеню антибіотикорезистентності [142]. У дослідженні використано по 5 штамів кожного типу клінічних штамів мікроорганізмів.

Метод дифузії в агар [143] передбачав внесення 50 мкл досліджуваного екстракту у лунку діаметром $5,5 \pm 0,5$ мм, з попередньо нанесеною на пластинку агару (МПА, Сабуро для грибків) суспензію культури мікроорганізму (McFarland 2.0).

Метод серійних розведень [140]. (Resazurin Reduction-Based Assay) передбачав внесення в 96-лункову планшетку по 50 мкл поживного середовища (бульйон Мюллера-Хінтона, глюкозний МПА для грибів), 100 мкл досліджуваного екстракту та 50 мл суспензії мікроорганізму (McFarland 2.0), з додаванням 15 мкл 0,02 % резазурину в кожен лунку. При рості культури мікроорганізмів в бульйоні відбувалось розщеплення резазурину, що викликало зміну кольору проби із синього на прозорий. В тих лунках, у котрих ріст мікроорганізмів пригнічувався БАР екстракту ЛРС чи КБ, росту

мікроорганізмів не відбувалось, отже колір індикатора зберігався синім. З кожної лунки (96 проб) після 24 годин інкубації було проведено посів на тверде поживне середовище з метою приблизного визначення мінімальної бактерицидної концентрації.

Визначення антибактеріальної активності за даною методикою проводилось тричі. Оцінку протимікробної активності екстрактів та інфузії проведено із врахуванням бактерицидної дії етилового спирту.

Статистичну обробку виконували за допомогою комп'ютерної програми пакету статистичних функцій програми Microsoft Excel, 2019. Визначали середню арифметичну величину M , похибку середньої арифметичної m , число спостережень n , t -критерій Стьюдента [145].

2.3.10. Визначення гострої токсичності

Дослідження гострої токсичності проведено на 78 білих щурах обох статей з масою тіла у межах 190–220 г. Тестовані спиртові екстракти вводили піддослідним тваринам одноразово внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда в дозах 5000, 10000 та 15000 мг/кг.

Статистичну обробку виконували за допомогою комп'ютерної програми пакету статистичних функцій програми Microsoft Excel, 2019. Визначали середню арифметичну величину M , похибку середньої арифметичної m , число спостережень n , t -критерій Стьюдента [145].

2.3.11. Дослідження фармакологічної активності

При дослідженні гіпоазотемічної активності використовували модель гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту [62, 125, 168].

Вивчення гепатопротекторної активності проводили на моделі гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту [62, 125, 168].

Для визначення протизапальної активності застосовували модель карагенінового набряку [62].

ВИСНОВКИ ДО РОДІЛУ 2

1. Сформульовано загальну стратегічну лінію роботи з культивування рослин родини *Ranunculaceae* в системі *in vitro* для отримання комплексу біологічно активних речовин, побудовано програмно-цільову структуру, визначено основні об'єкти та етапи роботи.

2. Розроблено методику введення в культуру *in vitro* рослин родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.

3. Наведено методики одержання екстрактів з рослинної сировини та калюсних біомас *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.

4. Визначено необхідні методи та умови проведення фітохімічних, мікробіологічних, біотехнологічних та фармакологічних досліджень, які дозволяють об'єктивно оцінювати якість одержаних калюсних біомас.

РОЗДІЛ 3.

ОДЕРЖАННЯ КАЛУСНОЇ БІОМАСИ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

РОДИНИ *RANUNCULACEAE*: *ANEMONE NEMOROSE* L., *DELPHINIUM ELATUM* L., *PULSATILLA ALBA* REICHENB.

Калюс - інтегрована система, що утворюється як екзогенно (в результаті проліферації поверхневих клітин різних тканин рослинного організму), так і ендогенно (в глибині тканин); спочатку складається з однорідних клітин, поступово перетворюються в систему груп гетерогенних клітин з видоспецифічними морфогенетичними потенціями, які реалізуються різними шляхами морфогенезу [53]. На теперішній час використання методу культури клітин і тканин, штучне стимулювання поділу клітин і вирощування їх у пересадочній культурі є надзвичайно актуальним. Культури клітин вищих рослин застосовуються для одержання рослинних БАР завдяки ряду переваг [4]. Тканинні та клітинні культури є значно простішими за цілий рослинний організм, існують можливості регулювання їх розвитку та контролювання метаболізму. Головною властивістю цих культур, що робить можливим їх застосування для подальшого одержання лікарських речовин, є здатність до синтезу вторинних речовин, що були притаманні вихідній рослині [14, 121].

Щоб зрозуміти процес, який відбувається під час вирощування ізольованих сегментів органів рослин і вміло керувати процесом синтезу вторинних метаболітів, необхідно знати якомога більше про структуру і біохімічну поведінку клітини експланту.

Вирощування культури тканини відбувається значно швидшими темпами у порівнянні з ростом цілої рослини. Кожній тканині притаманний певний рівень мітотичної активності, зміна якого нерідко має чітко виражений ритмічний характер. Існує пряма кореляція між інтенсивністю поділів клітин та накопиченням алкалоїдів у тканинах. Необхідно враховувати час доби (або сезонність), у який відбувається максимум мітозів, оскільки швидкий приріст біомаси ще не гарантує максимальний вміст у ній БАР. Певна культура

ізолюваних тканин має свої генетичні, морфологічні, цитологічні особливості та здатність до синтезу активних сполук. Тому необхідно всебічно вивчати особливості культивування кожної окремо взятої культури – продуценту БАР.

При введенні нової рослини в культуру важливі такі передумови, як здатність синтезувати продукти рослинного походження, що традиційно використовуються, наприклад, алкалоїди, вітаміни, глікозиди (антоціани, сапоніни тощо), полісахариди, фенольні сполуки (флавоноїди, дубильні речовини, хінони, ксантони тощо); можливість утворення принципово нових продуктів, котрі перевищують за якістю традиційні; здатність трансформувати дешеві попередники у кінцевий цінний продукт [9, 46].

Культура тканин вищих рослин має велике значення для швидкого клонального мікророзмноження *in vitro* цілих рослин, які є джерелом БАР. Для утворення тканин та органів, регенерації рослин найчастіше використовують зародки і бруньки, а також стеблові меристеми .

Здатність до синтезу необхідних продуктів метаболізму обов'язково залежить від вибраних експлантатів, специфічних обставин культивування клітин у кожному з пасажів, диференціації в процесі калюсогенезу [74].

Умови пророщування насіння мають відповідати природним. Оптимальними температурами для проростання в умовах досліду як правило вибирають відповідними до тих, що характерні для ареалу вибраного виду. Дуже часто для успішного проростання насіння потрібна короткотривала холодова стратифікація, обробка гіберелінами, зокрема гібереліновою кислотою (ГК) протягом п'яти і більше діб та/або пошкодження покривів насінини. Відомі також роботи щодо здатності до накопичення біомаси та БАР у присутності різних фітогормонів у живильному середовищі [4, 53, 74, 111]. Показано, що концентрація регуляторів росту в середовищі вирощування часто є вирішальним фактором накопичення вторинних метаболітів культурою клітин рослин. Тип і концентрація ауксину або цитокініну, або співвідношення ауксину до цитокініну значно змінюють зростання калюсу і продукцію вторинних метаболітів [53, 111].

3.1. Одержання калюсної біомаси *Anemone nemorosa* L.

Для введення в культуру *in vitro* *A. nemorosa* L. використано насіння рослини, яке було заготовлене у червні 2017-2018 років. Збір відбувався на території г. Гриняви (Гринявський гірський масив, Івано-Франківська область).

Насіння *A. nemorose* L. має дуже погану схожість. Для покращення цього показника насіння протягом доби стратифікували у розчині гіберелової кислоти (ГК) різних концентрацій: 0,1 г/л, 0,01 г/л та 0,001 г/л, час обробки був різним у межах 12-24 год, також насіння піддавали холодовій стратифікації і визначали його схожість. Також використовували різні стерилізуючі агенти – 30 % розчин перекису водню, 10 % розчин натрію гіпохлориту та 0,1 % розчин сулеми при різному часі експозиції у межах 10-20 хв. Після триразового ополіскування в стерильній дистильованій воді насіння висаджували у стерильні чашки Петрі на живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС). Умови пророщування були такі: температура – 20-23 °С, освітлення 2000 лк, вологість 70 %. Також проводили пророщування за відсутності освітлення при тій самій температурі та вологості. Відповідно до результатів дослідження, краще проростання насіння спостерігалось за умови освітлення. Схожість насіння збільшувалась при холодовій стратифікації (3-4 °С) протягом 60 діб та передпосівною обробкою розчинами ГК протягом 24 год.

У таблиці 3.1 подано результати проростання насіння залежно від різних умов стратифікації та використаного стерилізуючого агента: вихід життєздатних експлантів *A. nemorose* L. при використанні різних концентрацій ГК при стратифікації, стерилізуючих агентів і тривалості експозиції при внесенні у середовище.

Аналізуючи результати табл. 3.1 можна зробити висновок, що подальше збільшення концентрації ГК не дає кращого результату для проростання насіння. Тому використання розчину з вмістом 0,001 мг/л ГК є оптимальним для стратифікації насіння *A. nemorose* L.

Порівнюючи різні стерилізуючі агенти найкращі результати з отримання життєздатних проростків отримано при обробці 30 % розчином H_2O_2 протягом 20 хв. Ефективність стерилізації склала 85 %. При використанні 0,1% розчину $HgCl_2$ ефективність складає 34-64 %, при використанні 10% розчину $NaClO$ відповідно - 20-56 %. Тому оптимальним був такий режим стерилізації: стерилізуючий агент – 30 % розчин H_2O_2 , час експозиції - 20 хв.

Одержані пророслі *in vitro* рослини використано як експланти для індукції калюсогенезу. Використано експланти із листкових пластинок (надалі – листкові експланти), із черешків листків (надалі – черешкові експланти), які висаджено на середовище МС з регуляторами росту: 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою (2,4-Д), індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК), 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК), кінетину (К) в різних концентраціях. Культивування проведено при температурі 23 °С, фотоперіоді «освітлення/відсутність освітлення» як 16/8 год, освітленні 3000 лк.

Частоту культивування визначали через 3 тижні як співвідношення кількості експлантів з калюсом до загальної кількості експлантів у відсотках.

Таблиця 3.1

Вихід життєздатних експлантів *A. nemorose* L. у залежності від технічних параметрів попередньої обробки насіння

Вміст фітогормонів (гіберелової кислоти), г/л	Стерилізуючий агент	Час експозиції, хв	Кількість життєздатних експлантів, %
0,1	30% розчин H_2O_2	10	68
		20	75
	10% розчин $NaClO$	10	20
		20	48
	0,1% розчин $HgCl_2$	10	34
		20	50

0,01	30% розчин H ₂ O ₂	10	76
		20	80
	10% розчин NaClO	10	28
		20	52
	0,1% розчин HgCl ₂	10	36
		20	57
0,001	30% розчин H ₂ O ₂	10	78
		20	85
	10% розчин NaClO	10	32
		20	56
	0,1% розчин HgCl ₂	10	40
		20	64

Використано 6 різних середовищ, вміст фітогормонів у яких наведено у таблиці 3.2. Використано оптимальні концентрації ІОК (1,0 мг/л) та НОК (0,2 мг/л) та протестовано середовища і з різним вмістом 2,4-Д (0,1-1,0 мг/л) та К (0,1-0,5 мг/л).

Таблиця 3.2

**Модифіковані середовища МС із фітогормонами
для одержання калюсної біомаси *A. nemorose* L.**

№ п/п зразка середовища МС	№1	№2	№3	№4	№5	№6
	Концентрація фітогормонів, мг/л					
Фітогормони						
ІОК	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
НОК	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2,4-Д	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
К	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1

Найкращі результати культивування отримано при використанні середовища із вмістом 0,1 мг/л 2,4-Д. На середовищі із вищим вмістом 0,5 мг/л та 1,0 мг/л калюс утворювався менш ефективно, лише на 20 добу. За умови присутності в середовищі 0,5 мг/л кінетину калюсна біомаса утворюється швидше та ефективність калюсогенезу вища, ніж при концентрації 0,1 мг/л кінетину. Тому найоптимальнішим середовищем для максимального утворення калюсної біомаси *A. nemorose* L. виявилось модифіковане середовище МС1 із вмістом фітогормонів 1,0 мг/л ІОК, 0,2 мг/л НОК, 0,1 мг/л 2,4-Д та 0,5 мг/л кінетину. Із збільшенням концентрації 2,4-Д та зменшенням концентрації кінетину ефективність калюсогенезу зменшувалась.

Порівнюючи результати утворення калюсної біомаси на експлантах різного типу, можна стверджувати, що на листових експлантах найкраще формується калюс, він утворюється жовто-коричневого кольору та щільної консистенції, на черешкових експлантах трохи менша ефективність калюсогенезу, але калюс також щільної структури, на кореневих експлантах спостерігається дуже низька ефективність калюсогенезу. Подальше пасування отриманого калюсу на кореневих експлантах виявилось неефективним, мало низьку проліферативну активність і такий калюс через 10-14 днів втрачав колір, чорнів та некротував.

При додаванні у середовище 2,4-Д на 5-6 добу культивування спостерігається візуально формування калюсу на листових та стеблових експлантах. На кореневих експлантах спостерігається дещо пізніше – на 12-14 добу.

Культивування проведено протягом 42 днів. Результати культивування різних типів експлантів *A. nemorose* L. наведено на рис. 3.1.

Високі результати ефективності калюсогенезу пов'язані із використанням як регуляторів росту ауксинів НОК і ІОК. Встановлено, що усі використані комбінації фітогормонів стимулювали утворення калюсу на експлантах *A. nemorose* L. Доповнення середовища цитокінінами: 2,4-Д та К,

пришвидшували процес калюсогенезу, особливо на листових та черешкових експлантах. На середовищі МС №1 найвищий приріст калюсної біомаси був на листових експлантах - 73,8 %, дещо нижчим на черешкових експлантах - 65,3 %, та найнижчим на корневих експлантах - 41,5 %. На середовищі МС №2, у якому концентрація 2,4-Д (0,5 мг/л) є вищою, залежність також відслідковується, але нижчою є ефективність калюсогенезу – на листових експлантах - 58,4%, на черешкових - 52,7%, на корневих - 37,9 %. На середовищі МС №3, у якому концентрація 2,4-Д становить 1,0 мг/л, спостерігається ще нижча ефективність калюсогенезу – на листових експлантах - 31,7 %, на черешкових - 33,3 % і на корневих - 18,0 %.

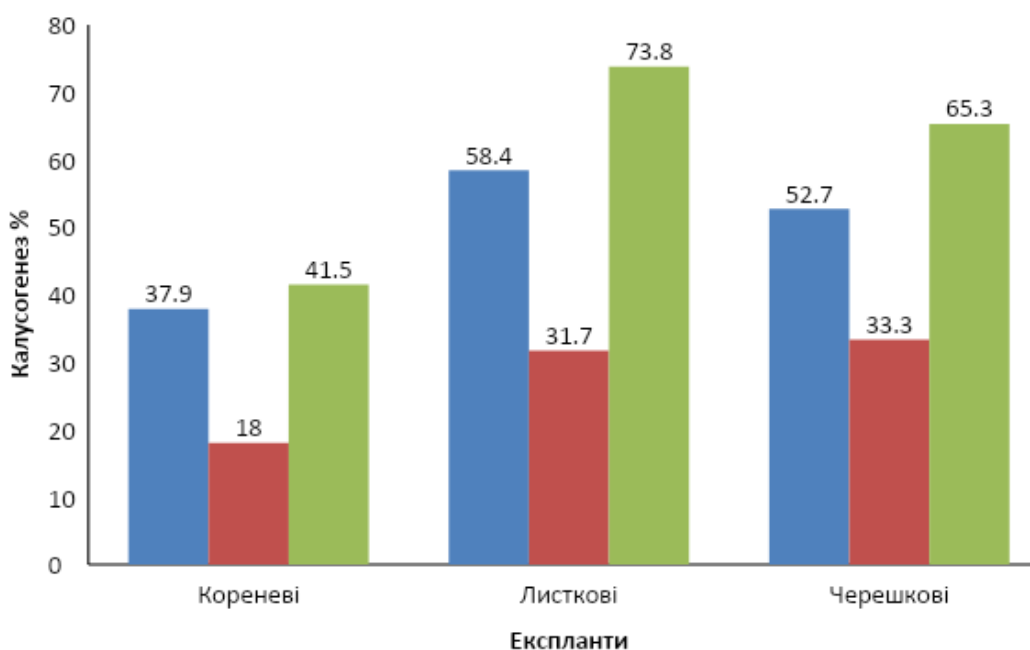


Рис. 3.1. Ефективність калюсогенезу різних типів експлантів *A. nemorose* L. на зразках модифікованих живильних середовищ: на МС №2 – сині стовпчики діаграми, на МС №3 - червоні, на МС №1-зелені

На рис. 3.2. наведено фотографії калюсної біомаси *A. nemorose* L. на живильному середовищі МС №1 на 42 добу культивування. Одержана калюсна біомаса має пухку консистенцію та коричнево-жовтий колір. Встановлено, що максимальний приріст біомаси складав 35 г сухої речовини на 1 л ЖС на 42 добу культивування. Ріст калюсу залежав від співвідношення і концентрації регуляторів росту та типу експланту.

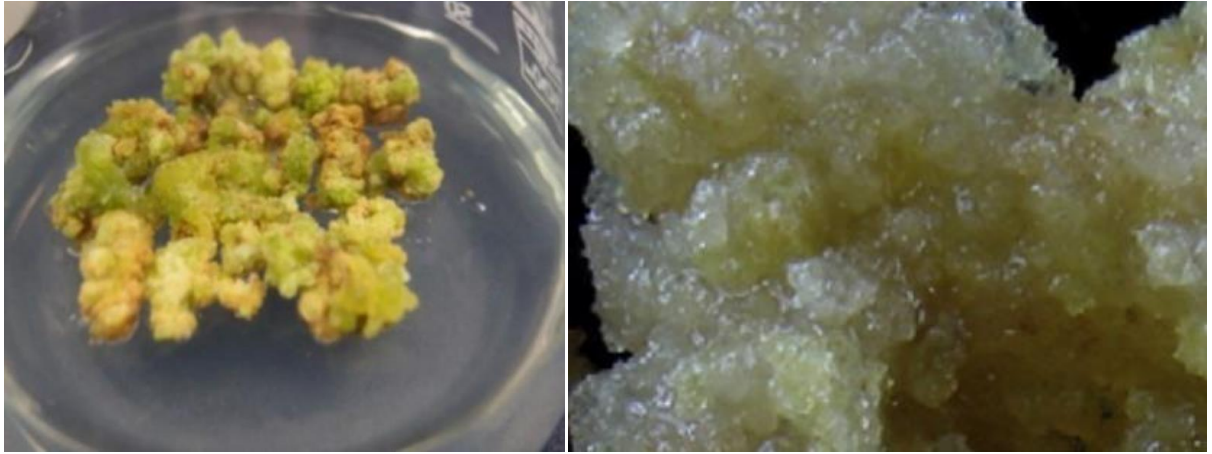


Рис. 3.2. Калюсна біомаса *A. nemorosa* L. з листкових експлантів на середовищі МС №1 на 42 добу культивування після 2 пасажу

Кожне пасування складало 3 тижні, калюсна біомаса була перенесена в стерильних умовах на середовище такого ж складу. На початкових етапах проліферації культури листкового та черешкового експлантів у деяких випадках з формуванням калюсу утворювали спонтанну регенерацію коренів на середовищах МС №5 та МС №6.

Режим освітлення забезпечується в умовах *in vitro* за допомогою люмінесцентних ламп та визначається за допомогою люкметра з врахуванням вимог материнської рослини до інтенсивності освітлення.

На 42 добу після 2 пасажу спостерігаємо інтенсивне одержання калюсної біомаси аморфної структури, масу паренхімних тонкостінних клітин, клітини після кількох поділів переходять на звичайний для цієї рослини цикл розвитку, тобто починається диференціація, ми можемо спостерігати позеленіння калюсної біомаси.

Час культивування пропонується для різних рослин різних. Тому у даному випадку запропоновано після 2 пасажу використовувати отриману біомасу для подальших досліджень по визначенню біологічно активних сполук. Усі експерименти проводились у трьох повторах та результати досліджень опрацьовувались статистично.

Калюсну біомасу *A. nemorosa* L. знімали з середовища, висушували при температурі 40 °С до пухкої маси, яка легко розсипається при продавлюванні

між пальцями, та ваговим методом визначали отриману масу. Залишкова вологість після висушування має складати не більше 12%.

Отже, в результаті введення в культуру *in vitro* *A. nemorosa* встановлено, що оптимальним середовищем для одержання калюсної біомаси є середовище МС, доповнене 1,0 мг/л ІОК, 0,2 мг/л НОК, 0,1 мг/л 2,4-Д та 0,5 мг/л К. Тривалість культивування складає 42 доби при температурі 23 °С, фотоперіоді 16/8 год, освітленні 3000 лк. Приріст біомаси становив 35 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 42 добу культивування.

3.2. Одержання калюсної біомаси *Delphinium elatum* L.

Для введення в культуру *in vitro* *D. elatum* L. було використано насіння та траву рослини, яку заготовлено на території г. Ігровець (гірський масив Горгани, Івано-Франківська область) у липні-серпні 2017-2018 років на висоті 1200-1500 м над рівнем моря.

Перед внесенням насіння *D. elatum* L. в культуру підібрано схему передпосівної обробки та стерилізації для максимального одержання асептичних експлантів для індукції калюсогенезу.

З метою покращення проростання насіння дельфініуму високого проведено передпосівну обробку такими трьома способами:

- обробка концентрованою сульфатною кислотою протягом 1 хв з наступним зануренням у холодну воду та витримкою в холодильнику протягом 48 год (схема 1);
- обробка киплячою водою протягом 2 хв і витримка в холодильнику протягом 48 год (схема 2);
- механічна обробка шляхом пошкодження оболонки насіння, змочування холодною стерильною водою та витримка в холодильнику протягом 48 год (схема 3).

По закінченні передпосівної обробки за одною з наведених схем насінини стерилізували, використовуючи такі стерилізуючі агенти як: 30%

розчин H_2O_2 , 10% розчин $NaClO$ та 0,1 % розчин $HgCl_2$ при різній тривалості експозиції у межах 10-20 хв та промивали триразово у стерилізованій дистильованій воді. Перед використанням стерилізуючих агентів насіння стерилізували у 70 % етанолі протягом 2-3 хв.

Потім насіння переносили в чашки Петрі на агаризоване поживне середовище МС та інкубували при фотоперіоді 16/8, температурі $24 \pm 1^\circ C$, освітленні 2000 лк і відносній вологості повітря 70% протягом 50 діб. Для проведення експерименту використано по 100 насінин для кожного окремого досліду. Визначали в процесі проростання насіння ефективність стерилізації (відсоток асептичного насіння відносно загальної кількості насіння) та ефективність проростання (відсоток пророслого насіння від загальної кількості насіння). Щодня проводили візуальне спостереження та видаляли інфіковане насіння з чашок Петрі.

У таблиці 3.3. подано результати виходу життєздатних експлантів після передпосівної обробки насіння та використання стерилізуючих агентів.

Таблиця 3.3

Вихід життєздатних експлантів при використанні різної схеми передпосівної обробки насіння *D. elatum* L., стерилізуючих агентів та часу експозиції

Спосіб обробки насіння	Стерилізуючий агент	Час експозиції, хв	Кількість життєздатних експлантів, %
Схема 1	30% розчин H_2O_2	10	33
		20	65
	10% розчин $NaClO$	10	26
		20	47
	0,1% розчин $HgCl_2$	10	36
		20	70

Схема 2	30% розчин	10	30
	H ₂ O ₂	20	61
	10% розчин	10	32
	NaClO	20	59
	0,1% розчин	10	39
	HgCl ₂	20	74
Схема 3	30% розчин	10	42
	H ₂ O ₂	20	71
	10% розчин	10	34
	NaClO	20	65
	0,1% розчин	10	46
	HgCl ₂	20	84

Найкращі результати отримано при використанні схеми 3 та стерилізуючого агента 10 % розчину натрію гіпохлориту протягом 20 хвилин. Тому найоптимальнішою схемою передпосівної обробки та стерилізації насіння *D. elatum* для одержання життєздатних експлантів запропоновано: механічна обробка шляхом пошкодження оболонки насіння, змочування холодною стерильною водою та витримка в холодильнику протягом 48 год з подальшою стерилізацією протягом 2-3 хв у 70% етанолі, протягом 20 хв у 10 % розчині натрію гіпохлориту та триразове промивання у стерилізованій дистильованій воді.

Одержані життєздатні проростки використано як експланти для ініціації калусогенезу при подальшому культивуванні. Кожен паросток розділено на сегменти, а саме корінець, меристематична верхівка та гіпокотиль, та введено в середовище МС з додаванням регуляторів росту. Як регулятори росту використано кінетин (К), 6-бензінамінопурин (БАП), 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д) та нафтилоцтову кислоту (НОК) у різних концентраціях. Джерелом вуглецю була глюкоза (розчин з

концентрацією 30 г/л). Культивування проводили протягом 35 діб у наступних умовах: фотоперіод 16/8 год, освітлення 2000 лк, температура 25±2 °С, відносна вологість 70 %. Частоту калюсогенезу визначено як відношення кількості експлантів із калюсом до їх загальної кількості.

Приготовлено шість середовищ для культивування. Використано регулятори росту в таких концентраціях: К – 0,5 мг/л, БАП - від 1,0 до 10,0 мг/л, НОК - від 0,2 до 1,0 мг/л, 2,4-Д від 0,1 до 1,0 мг/л. Вміст фітогормонів у різних зразках модифікованих середовищ МС* для культивування *D. elatum* L. наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Модифіковані середовища Мурасиге-Скуга з фітогормонами для одержання калюсної біомаси *D. elatum* L.

№ п/п зразка середовища МС Фітогормони	№1*	№2*	№3*	№4*	№5*	№6*
	Концентрація фітогормонів, мг/л					
БАП, мг/л	1,0	10,0	5,0	10,0	10,0	10,0
НОК, мг/л	0,2	–	0,6	–	1,0	–
2,4-Д, мг/л	–	0,1	–	0,5	–	1,0

Під час культивування спостерігались значні зміни в інтенсивності ростових процесів в залежності від використаного живильного середовища. Встановлено, що найкращі результати отримано при використанні середовищ МС№1* та МС№2*. При збільшенні концентрації регуляторів росту спостерігається зниження ефективності калюсоутворення. Тому при використанні НОК у концентрації 0,2 мг/л спостерігається високий індекс росту калюсної біомаси, а при збільшенні до 0,6 мг/л та 1,0 мг/л приріст калюсної біомаси зменшується. Також така залежність прослідковується при використанні більших кількостей 2,4-Д. Найоптимальніша концентрація 2,4-

Д 0,1 мг/л; при використанні 0,5 мг/л та 1,0 мг/л калюсогенез сповільнюється вдвічі.

На середовищі МС№1* після 50 діб культивування одержуємо калюсну біомасу: щільну, пористу, з нерівною поверхнею, жовто-зеленого кольору (рис. 3.3). Частинки розміром 0,5–1,3 см, невизначеної форми, зі специфічним запахом та кисло-солодким, терпким смаком. Маса калюсної біомаси становить 94 г на 1 л культурального середовища.

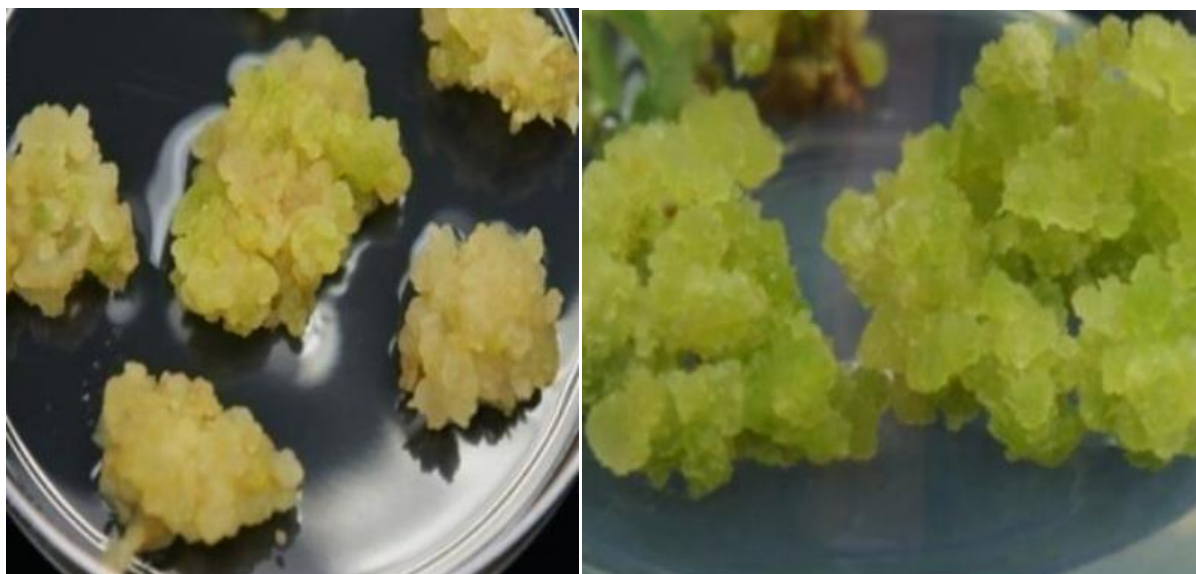


Рис. 3.3. Калюсна біомаса *D. elatum* L. з листкових експлантів на середовищі МС№1* на 50 добу культивування після 3 пасажу

Встановлено, що для культивування калюсної культури *D. elatum* L. оптимальним є живильне середовище МС№1* з додаванням 1,0 мг/л БАП та 0,2 мг/л НОК при температурі 25 ± 2 °С, освітленні 2000 лк, 16/8 годинному фотоперіоді і відносній вологості повітря 70 %, на якому спостерігались найвищі значення індексу росту, і, відповідно, найменший час подвоєння біомаси калюсів. Тривалість 50 діб. Також висока ефективність одержання калюсної біомаси спостерігається на середовищі МС№2*, яке доповнене 10,0 мг/л БАП та 1,0 мг/л 2,4-Д.

При збільшенні концентрації НОК від 0,2 мг/л до 0,6 мг/л та 1,0 мг/л спостерігається зменшення індексу росту та збільшення часу подвоєння

калюсної біомаси. Також при збільшенні концентрації 2,4-Д від 0,1 мг/л до 0,5 мг/л та 1,0 мг/л зменшується ефективність калюсогенезу.

Час культивування для експлантів дельфінію високого рекомендовано 50 діб. Тому у даному випадку запропоновано після 3 пасажу використовувати отриману біомасу для одержання екстрактів та подальших досліджень. Усі експерименти проводились у трьох повторях та результати досліджень опрацьовувались статистично.

Калюсну біомасу *D. elatum* L. висушували при температурі 40 °С до пухкої маси, яка легко розсипається при продавлюванні між пальцями, та ваговим методом визначали отриману масу. Залишкова вологість після висушування має складати не більше 12 %.

Отже, в результаті введення в культуру *in vitro* *D. elatum* L. встановлено, що оптимальним середовищем для одержання калюсної біомаси є середовище МС, доповнене 1,0 мг/л БАП та 0,2 мг/л НОК. Тривалість культивування складає 50 діб при температурі 25 °С, фотоперіоді 16/8 год, освітленні 2000 лк. Приріст біомаси складає 94 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 50 добу культивування.

3.3. Одержання калюсної біомаси *Pulsatilla alba* Reichenb.

Для введення в культуру *in vitro* *P. alba* використано насіння, зібране з природних місць проростання (гірський хребет Східні Beskidi, Українські Карпати, Львівська область) у липні-серпні 2017-2018 років.

Насіння сну білого потребує обов'язкової обробки за допомогою холодової стратифікації протягом 60-90 діб; внесення у стерильну культуру значно підвищує показники проростання насіння.

Для отримання асептичних проростків насіння *P. alba* стратифікували у розчині ГК з концентраціями 1,0 г/л; 0,1 г/л; 0,01 г/л; 0,001 г/л, протягом однієї доби, по закінченню стерилізували етанолом протягом 5 хв та 15 % і 20 % розчинами H₂O₂ протягом 10 хв, перенесли у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище МС. У кожну чашку Петрі внесено

близько двадцяти насінин *P. alba*. Насіння пророщували при освітленні 1000 лк при температурі 23-24 °С, вологості 80 %, а також у термостаті при цій же температурі за відсутності освітлення.

Встановили, що найоптимальнішими умовами передпосівної обробки насіння *P. alba* є: стратифікація у розчині ГК в концентрації 10 мг/л протягом 24 год, стерилізація етанолом 5 хв, додаткова обробка H₂O₂ 30 % розчином протягом 20 хв. Проростання насіння *P. alba* спостерігається протягом 3-4 тижнів, на живильному середовищі МС при температурі 24-26 °С і освітленні 2000 лк.

Для вегетативного розмноження використовували вирощені з насіння асептичні рослини віком 1,5-2 місяці, які живцювали і висаджували на агаризоване живильне середовище МС, доповнене фітогормонами - ІОК, К, БАП, НОК, ГК.

З метою індукції калюсоутворення використовували листкові, черешкові і кореневі експланти, які висаджували на середовище МС, доповнене різними фітогормонами у різних комбінаціях і концентраціях. Частоту калюсогенезу визначали як співвідношення кількості експлантів з калюсом до загальної кількості експлантів через 3 тижні культивування.

Культури інкубували у темряві при 25-26,5 °С. Їхнє субкультивування проводили через кожні 3 тижні. Отримані результати опрацьовували статистично.

Відомо, що чинники, які впливають на період спокою насіння *P. alba*., відрізняються при пророщуванні навіть різних партій одного цього виду. Дослідження сезонної періодичності проростання насіння, його схожості та залежності цих процесів від різних чинників дозволяє в контрольованих умовах цілеспрямовано стимулювати проростання насіння у різні пори року та отримувати життєздатні проростки. Даний підхід використано при введенні в культуру *in vitro* рослині *P. alba*.

Було досліджено вплив групи чинників: строків висаджування, дії розчину ГК – 100 і 1000 мг/л та освітлення на схожість насіння *P. alba*.

При відпрацюванні умов стерилізації насіння оптимальною виявилася обробка протягом 5 хв етиловим спиртом та 10 хв 15 % розчином H_2O_2 . Ефективність стерилізації становила 99,4 %. Аналіз результатів досліджень показав, що насіння краще проростає в умовах освітлення. Холодова стратифікація при 5-7°C протягом 1,5-2 місяців та передпосівна обробка насіння *P. alba* розчинами ГК протягом однієї доби підвищує його схожість. При цьому більш ефективним для порушення періоду спокою є використання концентрації 1000 мг/л – схожість насіння при цьому була в 1,5-2 рази вищою. Дані про сезонну динаміку проростання насіння *P. alba* в умовах *in vitro* представлено на рис. 3.4.

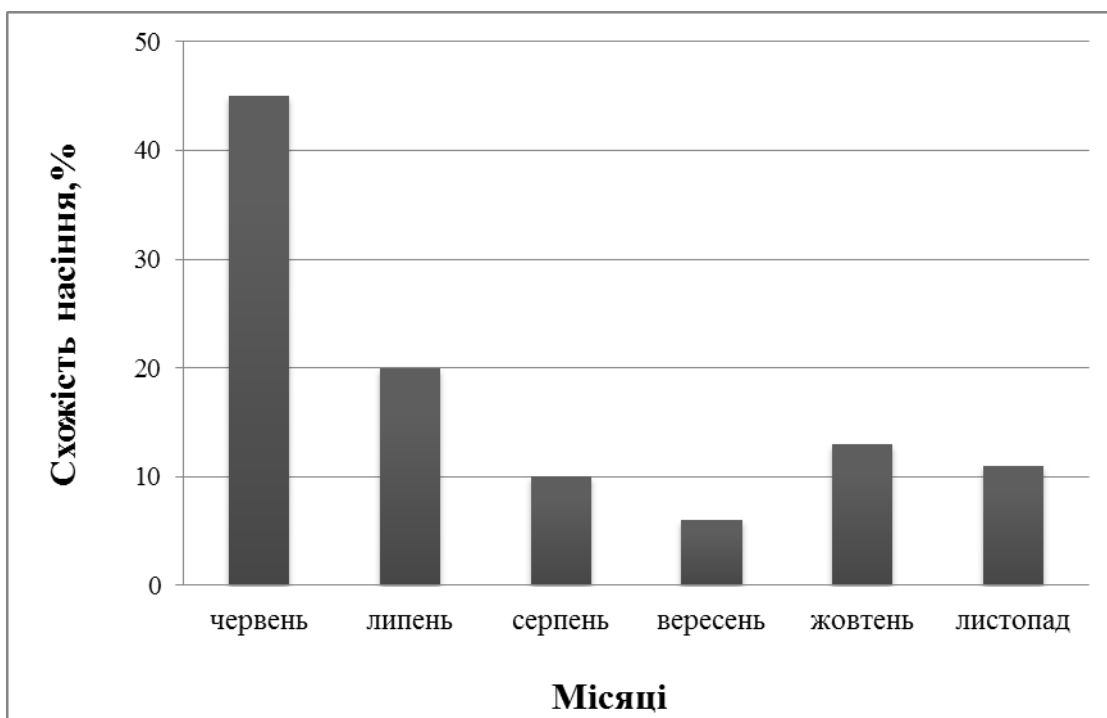


Рис. 3.4. Динаміка проростання насіння *P. alba in vitro*

Як видно з рис. 3.4, найвищим показник проростання насіння на живильному середовищі МС без фітогормонів був у червні - 45 %, схожість насіння у липні становить 20 %, у серпні – 10 %, а у вересні вона зменшувалася до 5 %. Два останні осінні місяці є несприятливі для проростання насіння. Перші сходи кожного разу спостерігалися на 7–13 добу.

Використання різних схем передпосівної обробки насіння *P. alba* у наших дослідженнях не призводило до появи в умовах *in vitro* аномальних проростків. Отже, завдяки поєднанню двох факторів, що порушують спокій насіння – холодової стратифікації при температурі 5-7°C протягом 1,5-2 місяців та обробки розчином ГК з концентрацією 1000 мг/л протягом однієї доби, нам вдалося підвищити схожість насіння до 45 % і отримати життєздатні проростки *P. alba* на безфітогормональному живильному середовищі МС.

Встановлено, що більш сприятливим для росту рослин *P. alba in vitro*, порівняно з рідким, було агаризоване середовище, доповнене 0,1 мг/л НОК. Використання ГК сприяло підвищенню інтенсивності інтеркалярного росту *P. alba*: протягом 30 діб вирощування у середовищі з 0,5 мг/л ГК довжина рослин збільшувалася у 2,7 рази, тоді як у без ГК – лише в 1,9 разу.

Оптимальним для вегетативного розмноження *in vitro* рослин *P. alba* виявилось модифіковане живильне середовище МС№1** з 0,2 мг/л ІОК, 0,5 мг/л ГК та 0,1 мг/л НОК; для росту і вкорінення живців – середовище МС№2**, доповнене 0,1 мг/л НОК.

У результаті тестування середовищ МС№1** та МС№2**, доповнених різними фітогормонами, найвищу інтенсивність калюсогенезу виявлено при використанні 2,4-Д у концентраціях 0,1-1,0 мг/л.

Показано, що за умови присутності у середовищі 0,1 мг/л 2,4-Д уже на 4-5 добу (середовище МС№1**) чи на 2-3 добу (МС№2**) на листових і черешкових експлантах *P. alba* спостерігали формування калюсу. Індукція калюсогенезу на корневих експлантах відбувалася пізніше – через 6-8 діб. Використання підвищених концентрацій 2,4-Д: 0,5 мг/л і 1,0 мг/л. було менш ефективним, калюс утворювався лише на 23-25 добу.

Відсоток калюсогенезу на усіх типах експлантів був найвищим на живильному середовищі МС№1**, доповненому 0,1 мг/л 2,4-Д, і зменшувався із підвищенням концентрації ауксину. Подібні результати були отримані при тестуванні середовища МС№2**. Найвищу

калюсоутворювальну активність при використанні різних концентрацій 2,4-Д у середовищах мали листові експланти.

У випадку доповнення живильних середовищ МС№1** та МС№2** 0,1 мг/л 2,4-Д утворений на експлантах калюс був світло-жовтого кольору, пухкої консистенції; при використанні вищих концентрацій – жовто-коричневого кольору, щільної консистенції. Однак, подальше пасування отриманого калюсу на цих же середовищах виявилось неефективним. Він характеризувався мінімальною проліферативною активністю і некротував через 7-8 діб (0,5 мг/л і 1,0 мг/л 2,4-Д) та 10-12 діб (0,1 мг/л 2,4-Д).

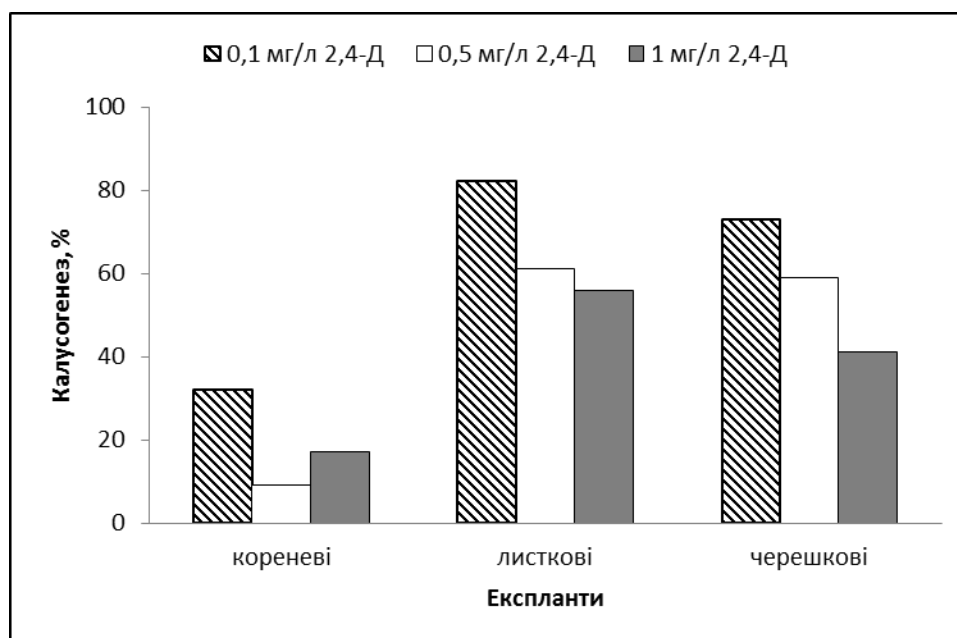


Рис. 3.5. Індукція калюсоутворення з експлантів рослин *P. alba* на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями 2,4-Д

Доповнення середовища комбінаціями різних концентрацій 2,4-Д і БАП було малоефективним для калусогенезу: формування калюсу або взагалі не відбувалося, або проходило досить повільно; калюс, що утворювався, був нежиттєздатним, щільної консистенції, швидко некротував. Оптимальним серед протестованих фітогормонів було використання розчинів НОК з концентраціями у межах 2-10 мг/л, і кінетину з концентрацією у межах 0,2-1 мг/л. Встановлено, що усі комбінації концентрацій цих

фітогормонів стимулювали утворення калюсу на експлантах *P. alba*. На середовищах з концентраціями НОК 2-3 мг/л та кінетину 0,2-0,5 мг/л калюсогенез розпочинався через 10-15 діб. Підвищення концентрацій НОК і кінетину до 4 мг/л та 1 мг/л відповідно значно пришвидшувало цей процес: на корневих експлантах калюс утворювався на 7-9 добу, на черешкових експлантах – на 7-8 добу, а на листкових експлантах – на 3-7 добу.

Доповнення живильного середовища 4 мг/л НОК і 1 мг/л К у найбільшій мірі сприяло ефективному калюсогенезу. Його відсоток був найвищим на листових експлантах - 79,7 %, дещо нижчим на корневих - 77,1 % (рис. 3.6). Утворені калюси мали світло-жовте забарвлення та пухку консистенцію і характеризувався проліферативною активністю. Тривалість пасування для усіх калюсів становила 3 тижні. Встановлено, що живильні середовища МС№1** та МС№2**, доповнені 0,1 мг/л 2,4-Д, забезпечували інтенсивний калюсогенез з листкових і черешкових експлантів *P. alba*. Оптимальним із протестованих як для індукції з різних типів експлантів, так і для проліферації калюсу *P. alba*, було середовище МС, що містило 4 мг/л НОК і 1 мг/л К. Згідно з дослідженнями інших авторів, оптимальним не лише для утворення калюсу з коренів, меристематичних верхівок і гіпокотилів, але й для його росту було середовище МС, доповнене кінетином, ІОК та НОК.

На початкових етапах проліферації (під час 1-3 пасажів) культури кореневого і листового походження поряд із приростом калюсу ми спостерігали спонтанну регенерацію коренів.

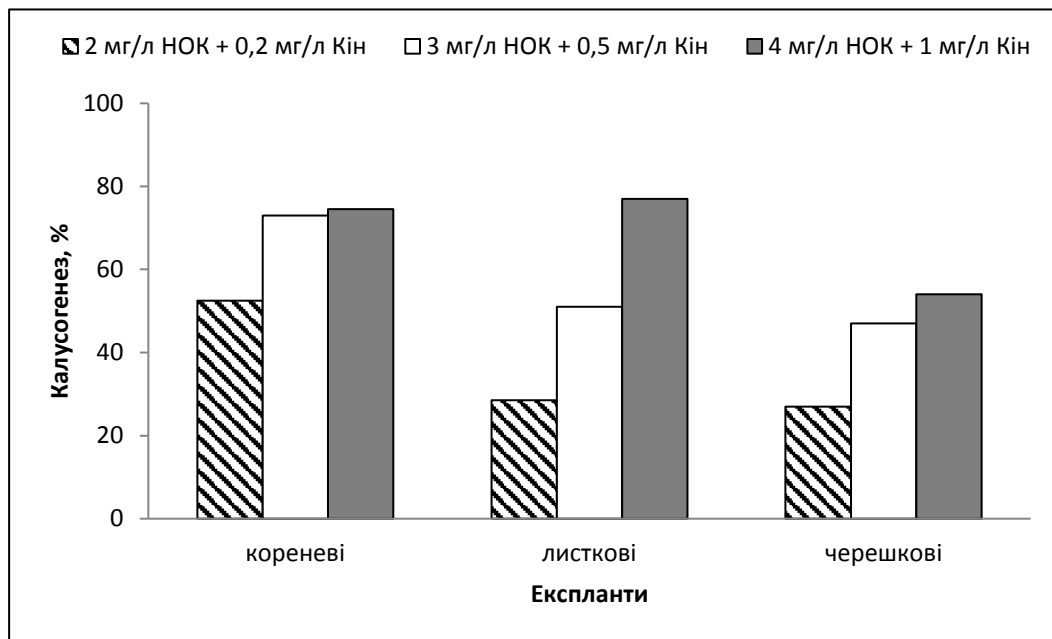


Рис. 3.6. Індукція калусоутворення з експлантів рослин *P. alba* на живильному середовищі МС, доповненому НОК і К

На рис. 3.7 подано фотографії калусної біомаси *P. alba* на живильному середовищі МС на 40 добу культивування. Одержана калусна біомаса має пухку консистенцію та жовтий колір. Встановлено, що максимальний приріст біомаси складає 68 г сухої речовини на 1 л ЖС на 40 добу культивування. Ріст калусу залежав від співвідношення і концентрації регуляторів росту та типу експланту.



Рис. 3.7. Калусна біомаса *P. alba* з листових експлантів на середовищі МС№1** на 40 добу культивування після 2 пасажу.

Встановлено, що для культивування калусної культури *P. alba* оптимальним є живильне середовище МС з додаванням 4,0 мг/л НОК та 1,0

мг/л кінетину, та умови: температура 24 ± 1 °С, освітлення 2000 лк, фотоперіод 16/8 год і відносна вологість повітря 70 %. Тривалість становила 40 діб.

Оптимальними ЖС вважали ті, які дозволяли отримати найвищу частоту калюсогенезу, тобто спостерігалось утворення калюсу у максимальній кількості експлантів. Виявлено для різних видів досліджуваних рослин родини *Ranunculaceae* відмінності у концентраціях фітогормонів, необхідних для проліферації калюсів. Але правильно підібрана концентрація та співвідношення цитокінів та ауксинів дають можливість отримувати максимальний приріст калюсної біомаси за короткий час.

Одержані калюсні культури *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. стали об'єктами подальших досліджень щодо одержання екстрактів та ідентифікації БАР.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

1. Введено в культуру в умовах *in vitro* рослини родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. Підібрано стерилізуючі агенти для максимального отримання життєздатних експлантів. Вивчено вплив регуляторів росту на ріст калюсної біомаси, встановлено умови культивування для кожної рослини з найвищим виходом калюсної біомаси. Для кожної рослини підібрано схему стратифікації та стерилізації. Також підібрано регулятори росту та їх концентрацію, отримано калюсні біомаси з корневих, листкових, стеблових, черешкових експлантів.

2. При дослідженні культивування в *in vitro* *Anemone nemorosa* L. встановлено, що оптимальним середовищем для культивування є живильне середовище МС з 1,0 мг/л ІОК, 0,2 мг/л НОК, 0,1 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л К. Тривалість культивування 42 доби при температурі 23 °С та фотоперіоді 16/8 (світло/темрява). Встановлено, що приріст калюсної біомаси становить 35 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 42 добу

культивування. Приріст калюсної біомаси залежав від співвідношення і концентрації регуляторів росту та типу експланту.

3. При дослідженні культивування *in vitro Delphinium elatum L.* встановлено, що оптимальним середовищем для культивування є живильне середовище МС з додаванням 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК і 0,5 мг/л К. Тривалість культивування складає 50 діб при температурі 25°C і фотоперіоді 16/8 (світло/темрява), освітленні 2000 лк і відносній вологості 70%. Приріст калюсної біомаси складає 94 г сухої речовини на 1 л живильного середовища.

4. При отриманні калюсної біомаси *Pulsatilla alba Reichenb.* оптимальним для культивування є живильне середовище МС з додаванням регуляторів росту – 4,0 мг/л НОК і 1,0 мг/л К. Тривалість культивування складає 40 діб при температурі 25°C та 16 годинному фотоперіоді 16/8 (світло/темрява). Приріст біомаси складає 68 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 40 добу культивування. Ріст калюсної біомаси залежав від співвідношення та концентрації регуляторів росту та типу експланту.

РОЗДІЛ 4

ЕКСТРАКЦІЯ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ І КАЛЮСНИХ БІОМАС ДОСЛІДЖУВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

Результати попередніх фармакогностичних досліджень дозволяють вважати, що рослинна сировина та калюсна маса *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. є джерелами БАР. Як свідчить проведений нами аналіз наукових публікацій [101], калюсна маса досліджуваних об'єктів містить часто більше цінних речовин, ніж вихідні рослини. Однак, незважаючи на підвищений інтерес виробників до культивування рослинних клітин, відомо відносно небагато таких технологій, що доведені до стадії виробництва [105]. З метою практичного просування біотехнології рослин необхідним є усунення факторів, що лімітують їх впровадження, а саме - удосконалення технологічних процесів. Важливою технологічною стадією є екстрагування. Дослідженню механізму та закономірностей процесу екстрагування БАР з лікарської рослинної сировини і, зокрема, з калюсної біомаси з метою одержання комплексних екстрактів і на їх основі лікарських фітозасобів, присвячено велику кількість праць науковців і технологів [36, 37, 52, 149, 150].

4.1. Підбір умов екстракції рослинної сировини *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. та їх калюсних біомас

Екстракція сировини досліджуваних лікарських рослин супроводжується процесом переходу БАР в екстрагент. На даний процес впливає ряд технологічних параметрів, які визначають швидкість і повноту екстрагування: селективність та фізико-хімічні властивості екстрагенту, модуль екстрагент:сировина і різниця концентрацій, метод екстрагування, гідродинамічні умови, поверхня розділення фаз, температурний режим тощо. Ефективність екстракції залежить також від технологічних властивостей сировини: вологості, насипної густини до та після усадки, насипного об'єму

до та після усадки, коефіцієнтів набухання та поглинання, ступеня подрібнення ЛРС та інших параметрів [160,161]. Підбір екстрагенту здійснюється відповідно до природи, ступеня гідрофільності БАР у сировині. Більша частина біологічно активних речовин в досліджуваних рослинах є гідрофільними, тому очищена вода, спирт етиловий та інші полярні екстрагенти будуть ефективно їх екстрагувати. Екстрагент має вплив не тільки на екстрагування окремих груп чи конкретних речовин, але й на загальний вихід екстрактивних речовин. Важливим є також кількість екстрагенту, співвідношення (загальний модуль) між екстрагентом та ЛРС, які є необхідними для повноти екстрагування діючих речовин [36, 37, 52, 149, 150, 152].

Важливим технологічним параметром є ступінь подрібнення ЛРС, оптимальні розміри частинок надають можливість кращого проникнення екстрагенту в клітинні структури і збільшення поверхні екстрагування [160, 161].

Для вибору оптимальних параметрів екстракції БАР з *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. було вивчено вплив окремих чинників, а саме: розмірів окремих фракцій частинок сировини (ЛРС, КБ), природу екстрагента, час екстракції, співвідношення екстрагент:сировина, кратність екстракції. Проводили визначення вмісту суми поліфенолів та екстрактивних речовин у досліджуваних зразках на кожному кроці дослідження. Кількісний вміст суми поліфенолів визначали спектрофотометрично в перерахунку на галову кислоту. Кількісний вміст екстрактивних речовин визначали за фармакопейною методикою.

Висушену досліджувану сировину подрібнювали на ріжучих подрібнювачах та млинку типу “Ексцельсіор” і просіювали крізь сита з отворами діаметром 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7 мм. Одержували водну витяжку за методикою, наведеною в п. 2.3.4.

Результати дослідження впливу розмірів частинок певної фракції досліджуваної сировини на повноту екстракції БАР наведені в табл. 4.1 - 4.3.

Таблиця 4.1

**Результати впливу розмірів частинок сировини з
A. nemorosae L. на вміст БАР у екстрактах**

Розміри частинок у фракції	Сума поліфенольних сполук, % $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n=5$		Вміст екстрактивних речовин, % $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n=5$	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
0,25 - 0,5мм	4,22± 0,01	4,19± 0,03	15,15 ± 1,04	15,07 ± 1,21
0,5 - 1мм	3,82± 0,02	3,90± 0,01	15,50 ± 1,96	15,68 ± 2,1
1 - 2 мм	4,62± 0,06	4,52± 0,02	15,94 ± 1,21	15,76 ± 1,36
2 - 3 мм	4,12 ± 0,04	4,09 ± 0,04	15,01 ± 2,16	15,08 ± 1,96
3 - 5 мм	4,52± 0,03	4,50± 0,01	15,88 ± 1,7	15,82 ± 1,3
5 - 7 мм	4,14± 0,05	4,19± 0,02	15,73 ± 1,03	15,93 ± 1,47
> 7 мм	4,02± 0,02	4,1± 0,04	15,05 ± 2,28	15,15 ± 3,04

Дані досліджень свідчать, що оптимальним для сировини *A. nemorosae* L. є розмір частинок 1-2 мм, як для КБ, так і для ЛРС.

Таблиця 4.2

**Результати впливу розмірів частинок сировини з
D. elatum L. на вміст БАР у екстрактах**

Розміри частинок у фракції	Сума поліфенольних сполук, % $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n=5$		Вміст екстрактивних речовин, % $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n=5$	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
0,25 - 0,5 мм	2,21± 0,02	2,18± 0,05	9,97± 0,02	9,86± 0,03
0,5 - 1 мм	1,98± 0,02	2,0± 0,01	10,11± 0,02	10,18± 0,01
1 - 2 мм	2,62± 0,02	2,64± 0,03	10,34± 0,02	10,29± 0,04
2 - 3 мм	2,17± 0,02	2,19± 0,02	10,37± 0,02	10,41± 0,02

3 - 5 мм	2,53± 0,02	2,60± 0,04	10,26± 0,02	10,28± 0,01
5 - 7 мм	2,19± 0,02	2,21± 0,01	10,22± 0,02	10,26± 0,01
> 7 мм	2,28± 0,02	2,30± 0,03	9,89± 0,02	9,84± 0,03

Одержані результати демонструють, що оптимальним розмірами частинок сировини *D. elatum* L. є 1-2 мм для ЛРС та 2-3 мм для КБ.

Таблиця 4.3

**Результати впливу розмірів частинок сировини з
P. alba Reichenb. на вміст БАР у екстрактах**

Розміри частинок у фракції	Сума поліфенольних сполук, % $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n=5$		Вміст екстрактивних речовин, % $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n=5$	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
0,25 - 0,5мм	2,22± 0,01	2,17± 0,01	7,15 ± 0,94	7,10 ± 0,94
0,5 - 1мм	1,82± 0,02	1,78± 0,02	7,50 ± 1,26	7,21 ± 1,26
1 - 2 мм	2,62± 0,01	2,62± 0,01	7,88 ± 0,16	7,88 ± 0,16
2 - 3 мм	2,12 ± 0,01	2,08 ± 0,01	7,01 ± 0,16	6,91 ± 0,16
3 - 5 мм	2,52± 0,01	2,44± 0,01	7,94 ± 1,01	7,68 ± 1,01
5 - 7 мм	2,14± 0,01	2,12± 0,01	7,73 ± 0,81	7,56 ± 0,81
> 7 мм	2,02± 0,01	2,00± 0,01	7,05 ± 1,24	7,00 ± 1,24

Оптимальним розмірами частинок сировини для *P. alba* є 1 - 2 мм для ЛРС і 3 – 5 мм для КБ.

Відповідно до попередньо проведених досліджень та врахувавши оптимальний ступінь подрібнення досліджуваної сировини, одержання витяжок здійснювали згідно описаної вище методики. З метою вибору оптимального екстрагента було використано різні розчинники: воду очищену та водно-етанольні розчини з вмістом етилового спирту 20%, 40%, 70%, 90%, оскільки хімічний склад сировини в більшій мірі представлено

поліфенольними сполуками. В табл. 4.4-4.6 представлено результати дослідження залежності вмісту екстрактивних речовин у витяжках з ЛРС та КБ досліджуваних рослин від екстрагуючого агенту.

Таблиця 4.4

Вміст БАР та поліфенолів у екстрактах з *A. nemorosae* L. при використанні різних екстрагентів

Екстрагент	Вміст екстрактивних речовин і БАР, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5			
	Екстрактивні речовини		Сума поліфенолів	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
Вода очищена	3,97 ± 0,01	3,94 ± 0,02	13,58 ± 0,03	13,86 ± 0,02
20% спирт	4,07 ± 0,03	4,08 ± 0,04	13,98 ± 0,06	13,91 ± 0,04
40% спирт	4,62 ± 0,06	4,52 ± 0,02	15,94 ± 1,21	15,76 ± 1,36
70% спирт	4,94 ± 0,01	4,96 ± 0,03	14,68 ± 0,09	14,42 ± 0,05
90% спирт	4,28 ± 0,02	4,32 ± 0,06	14,18 ± 0,02	14,04 ± 0,01

Результати досліджень свідчать, що з метою одержання найбільшого виходу БАР доцільно використовувати як екстрагенти 40% спирт та 70% спирт.

Таблиця 4.5.

Вміст БАР та поліфенолів у екстрактах з *D. elatum* L. при використанні різних екстрагентів

Екстрагент	Вміст екстрактивних речовин і БАР, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5			
	Екстрактивні речовини		Сума поліфенолів	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
Вода очищена	10,01 ± 0,02	10,00 ± 0,01	2,03 ± 0,02	2,06 ± 0,04
20% спирт	10,17 ± 0,02	10,11 ± 0,02	2,27 ± 0,02	2,29 ± 0,02
40% спирт	10,34 ± 0,02	10,29 ± 0,02	2,62 ± 0,02	2,64 ± 0,03

Продовження табл. 4.2

70% спирт	10,22± 0,02	10,26± 0,01	2,49± 0,01	2,41± 0,01
90% спирт	9,79± 0,02	9,74± 0,03	2,38± 0,03	2,33± 0,02

Результати досліджень вказують, що найбільший вихід БАР спостерігається при використанні як екстрагента 40% етилового спирту як для рослинної сировини, так і для калюсної біомаси.

Таблиця 4.6

Вміст БАР та поліфенолів у екстрактах з *P. alba* Reichenb. при використанні різних екстрагентів

Екстрагент	Вміст екстрактивних речовин і БАР, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5			
	Екстрактивні речовини		Сума поліфенолів	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
Вода очищена	6,33 ± 0,01	6,26± 0,04	2,12 ± 0,01	2,08± 0,03
20% спирт	7,04 ± 0,03	6,99± 0,02	1,82 ± 0,02	1,41± 0,01
40% спирт	7,14 ± 1,3	7,04± 0,03	2,02 ± 0,02	2,06± 0,01
70% спирт	7,21 ± 0,03	7,27± 0,01	2,52 ± 0,03	2,59± 0,04
90% спирт	6,09 ± 1,1	6,03± 0,03	1,74 ± 0,02	1,81± 0,01

Результати проведених досліджень свідчать, що оптимальним екстрагентом для максимального виходу БАР з ЛРС і КБ *P. alba* є 70% етиловий спирт.

З метою визначення оптимального співвідношення між екстрагентами і сировиною використано співвідношення 1:5; 1:10; 1:20; 1:30. Результати дослідження представлено в табл. 4.7.

**Результати вибору оптимального співвідношення
між екстрагентом і досліджуваною сировиною**

Екстрагент	Співвідношення між сировиною і екстрагентом	Вміст БАР і екстрактивних речовин, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 8			
		Сума поліфенолів		Екстрактивні речовини	
		ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
<i>Anemona nemorosa</i> L.					
40% спирт	1:5	4,52 ± 0,01	4,51 ± 0,02	15,69 ± 1,01	15,63 ± 1,10
	1:10	4,61 ± 0,05	4,60 ± 0,09	15,71 ± 1,09	15,73 ± 1,03
	1:20	4,66 ± 0,07	4,68 ± 0,10	15,81 ± 0,98	15,83 ± 0,92
	1:30	4,60 ± 0,01	4,59 ± 0,08	15,72 ± 1,11	15,72 ± 1,07
70% спирт	1:5	4,40 ± 0,02	4,41 ± 0,03	15,70 ± 1,32	15,71 ± 1,04
	1:10	4,47 ± 0,03	4,46 ± 0,06	15,76 ± 1,17	15,78 ± 1,04
	1:20	4,50 ± 0,02	4,53 ± 0,01	15,86 ± 1,66	15,94 ± 1,02
	1:30	4,48 ± 0,05	4,49 ± 0,01	15,80 ± 1,29	15,81 ± 1,31
<i>Delphinium elatum</i> L.					
40% спирт	1:5	4,41 ± 0,04	4,42 ± 0,06	10,78 ± 1,16	10,72 ± 1,11
	1:10	4,48 ± 0,03	4,49 ± 0,07	10,90 ± 1,02	10,92 ± 1,09
	1:20	4,51 ± 0,02	4,53 ± 0,01	11,10 ± 1,03	11,09 ± 1,14
	1:30	4,47 ± 0,05	4,46 ± 0,02	10,34 ± 0,02	10,39 ± 0,02
<i>Pulsatilla alba</i> Reichenb.					
70% спирт	1:5	2,38 ± 0,06	2,31 ± 0,01	7,86 ± 1,17	7,84 ± 1,24
	1:10	2,53 ± 0,08	2,59 ± 0,07	7,90 ± 1,09	7,93 ± 1,50
	1:20	2,66 ± 0,01	2,68 ± 0,19	8,04 ± 1,07	8,01 ± 1,27
	1:30	2,52 ± 0,06	2,54 ± 0,02	7,91 ± 0,06	7,92 ± 0,05

Одержані результати демонструють, що оптимальним співвідношенням між досліджуваною сировиною і відповідними екстрагентами для ЛРС і КБ *A. nemorosae* L. є 1:20, як при використанні 40% етилового спирту, так і при використанні 70% етилового спирту. Між сировиною (ЛРС і КБ) *D. elatum* L. та відповідним екстрагентом оптимальне співвідношення становить - 1:20, а при використанні сировини (ЛРС, КБ) *P. alba* та 70 % етилового спирту як екстрагенту оптимальним співвідношення спостерігалось - 1:10.

Для визначення часу екстракції максимальної кількості БАР з досліджуваних об'єктів сировину настоювали у експериментально підібраних співвідношеннях сировина-екстрагент протягом 30 хв, 60 хв, 90 хв, 120 хв, 150 хв на водяному нагрівачі. Перемішували періодично та визначали вміст суми поліфенолів і екстрактивних речовин. Результати дослідження залежності вмісту БАР від часу екстракції одержаних витяжок для досліджуваних об'єктів представлено в табл. 4.8 – 4.10.

Таблиця 4.8

Результати залежності виходу БАР з *A. nemorosae* L. від тривалості екстрагування(екстрагент - 40% етиловий спирт)

Час екстракції, хв	Вміст БАР і екстрактивних речовин, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5			
	Сума поліфенолів		Екстрактивні речовини	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
30	3,82 ± 0,02	3,87± 0,06	14,91± 0,98	14,94± 0,08
60	4,09 ± 0,04	4,10± 0,06	15,22± 0,46	15,24± 0,18
90	4,62 ± 0,06	4,61± 0,08	15,81 ± 0,98	15,83 ± 0,92
120	4,56 ± 0,01	4,54± 0,03	15,77 ± 0,08	15,78 ± 0,04
150	4,57 ± 0,17	4,58± 0,15	15,71 ± 0,46	15,73 ± 0,11

В результаті проведених досліджень встановлено, що оптимальною тривалістю екстрагування при екстрагенті 40 % етиловому спирті з повнотою виділення БАР для ЛРС (трави) та КБ *A. nemorosae* L. є 90 хв.

Таблиця 4.9

Результати залежності виходу БАР з *D. elatum* L. від тривалості екстрагування (екстрагент - 40% етиловий спирт)

Час екстракції, хв	Вміст БАР і екстрактивних речовин, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5			
	Сума поліфенолів		Екстрактивні речовини	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
30	4,02 ± 0,04	4,03 ± 0,06	10,91 ± 0,28	10,94 ± 0,03
60	4,19 ± 0,12	4,20 ± 0,11	11,12 ± 0,04	11,14 ± 0,01
90	4,52 ± 0,06	4,51 ± 0,08	11,81 ± 0,38	11,83 ± 0,62
120	4,46 ± 0,07	4,44 ± 0,01	11,77 ± 0,01	11,78 ± 0,04
150	4,44 ± 0,18	4,43 ± 0,05	11,71 ± 0,41	11,73 ± 0,36

Результати експериментальних досліджень свідчать, що оптимальним часом екстракції БАР з ЛРС (трави) та КБ *D. elatum* L. є 90 хв при використанні як екстрагента 40% спирту.

Таблиця 4.10.

Результати залежності виходу БАР з *P. alba* від тривалості екстрагування (екстрагент - 70% етиловий спирт)

Час екстракції, хв	Вміст БАР і екстрактивних речовин, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5			
	Сума поліфенолів		Екстрактивні речовини	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
30	1,82 ± 0,12	1,87 ± 0,31	7,31 ± 0,08	7,34 ± 0,02
60	2,09 ± 0,02	2,10 ± 0,01	7,62 ± 0,36	7,64 ± 0,28
90	2,42 ± 0,05	2,41 ± 0,03	7,91 ± 0,05	7,93 ± 0,02
120	2,66 ± 0,01	2,68 ± 0,19	8,04 ± 0,07	8,01 ± 0,27
150	2,57 ± 0,12	2,58 ± 0,05	8,01 ± 0,11	8,00 ± 0,01

Відповідно до одержаних результатів дослідження оптимальним часом для одноразової екстракції з повнотою виділення БАР для ЛРС (трави) та КБ *P. alba* є 120 хв.

Встановлено, що оптимальними умовами для виділення комплексу БАР з ЛРС та КБ *A. nemorosa* L. є екстракція подрібненої сировини (ЛРС, КБ) 40% етиловим спиртом протягом 90 хв, оптимальне співвідношення між сировиною та екстрагентом є 1:20; з ЛРС та КБ *D. elatum* - екстракція 40% етиловим спиртом, протягом 90 хв, оптимальне співвідношення між сировиною та екстрагентом є 1:20; з ЛРС та КБ *P. alba* - екстракція 70% етиловим спиртом, протягом 120 хв, співвідношення сировина:екстрагент - 1:10.

4.2. Стандартизація екстрактів з рослинної сировини *Anemona nemorosae*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* та їх калюсних біомас

З метою стандартизації екстрактів, отриманих з ЛРС та КБ *Anemona nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*, у відповідності до вимог ДФУ, визначали та дослідили певні числові показники згідно ДФУ. Визначили вміст важких металів, сухий залишок, мікробіологічну чистоту, ідентифікували біологічно активні речовини та хроматографічним методом визначали їх кількісний вміст згідно з методиками наведеними у п.2.3.4.

Опис. Екстракти трави *Anemona nemorosa* – прозорі рідини жовтувато-коричневого кольору з слабким запахом. Екстракти КБ *Anemona nemorosa* – рідини жовтуватих кольорів з слабким запахом. Екстракти трави *Delphinium elatum* – прозорі рідини від світло-зеленого до темно-зеленого кольору. Екстракти КБ *Delphinium elatum* – світло-зелені рідини. Екстракти трави *Pulsatilla alba* – прозорі рідини буро-зеленого кольору з слабким запахом, екстракти КБ *Pulsatilla alba* – зелені рідини, без запаху.

Сухий залишок екстракту трави *Anemona nemorosa* був не менше 1,5%, екстракту КБ *Anemona nemorosa* - не менше 1,3%, екстракту трави *Delphinium elatum* – не менше 5,0%, екстракту КБ *Delphinium elatum* – не менше 4,5%, екстракту трави *Pulsatilla alba* - 1,5%, екстракту КБ *Pulsatilla alba* - 1,2%.

Дослідження на мікробіологічну чистоту проводили відповідно до вимог ДФУ, 2.6.12, 2.6.13, 2.6.31 за методикою наведеною у п. 2.3.8.1.

Загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів в препараті відповідала вимогам (не більшою ніж 10^4 бактерій та не більшою ніж 10^2 грибів в 1 мл). Були відсутні бактерії *Escherichia coli* в 1 мл; *Salmonella* в 25 мл; *Staphylococcus aureus* в 1 мл та толерантні до жовчі грамнегативні бактерії *Pseudomonas aeruginosa* (не більше 10^2 КУО/мл).

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

1. Встановлено оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Anemone nemorosa* L., а саме: подрібнення до розмірів частинок сировини 1-2 мм, як для КБ, так і для ЛРС, екстрагування 40% спиртом етиловим протягом 90 хв в колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:20. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $15,81 \pm 0,98$ %, з КБ - $15,83 \pm 0,92$ % становив $4,62 \pm 0,06$ %; поліфенолів з ЛРС - $4,62 \pm 0,6$ %, з КБ - $4,61 \pm 0,08$ % у перерахунку на суху речовину.

2. Оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Delphinium elatum* L. вибрано наступні: подрібнення сировини до розмірів частинок 1-2 мм для ЛРС та 2-3 мм для КБ, екстрагування 40% етиловим спиртом у колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі протягом 90 хв при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:20. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $11,81 \pm 0,38$ %, з КБ - $11,83 \pm 0,62$ %; поліфенолів з ЛРС - $4,52 \pm 0,06$ %, з КБ - $4,51 \pm 0,08$ % у перерахунку на суху речовину.

3. Оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Pulsatilla alba* встановлено наступні: подрібнення сировини до розмірів частинок 1-2 мм для ЛРС і 3-5 мм для КБ, екстрагування 70% етиловим спиртом в колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі протягом 120 хв при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:10. За цих умов

вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $8,04 \pm 0,07$ %, з КБ - $8,01 \pm 0,27$ %; поліфенолів з ЛРС - $2,66 \pm 0,01$ %, з КБ - $2,68 \pm 0,19$ % у перерахунку на суху речовину.

4. Одержані з ЛРС та КБ *Anemona nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. екстракти стандартизовано за наступними показниками: вміст важких металів, сухий залишок, мікробіологічна чистота.

РОЗДІЛ 5

ФІТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ, КАЛЮСНИХ БІОМАС ТА ЕКСТРАКТІВ *ANEMONE NEMOROSA* L., *DELPHINIUM ELATUM* L., *PULSATILLA ALBA* Reichenb.

Виділення фітохімічних речовин з рослин родини *Ranunculaceae*: *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. і *P. alba* Reichenb., їх ідентифікація, кількісний аналіз, стандартизація є невід'ємною умовою майбутнього створення високоефективних фітопрепаратів. Проведений у першому розділі аналіз літературних джерел дає можливість очікувати, що рослинна сировина і калюсна біомаса містять значні кількості цінних БАР, а технології одержання вторинних БАР з неорганізованих калюсів або суспензійних культур добре опрацьовані. Однак, у ряді випадків, вторинні метаболіти не утворюються, так як необхідною умовою їх акумулювання є диференціація клітин. Тому серед завдань дисертаційного дослідження були не тільки вибір найкращого способу культивування та розроблення технологічних умов, котрі уможливили б посилення біосинтезу вторинних метаболітів, але й оцінка вмісту цих біологічно активних сполук. Дослідження якісного та кількісного вмісту БАР у екстрактах з ЛРС та калусної біомаси вибраних рослин проводились у рамках співпраці в Опольському Університеті (м. Ополье, Польща).

5.1. Первинна оцінка вмісту БАР у екстрактах з ЛРС та КБ

Первинне дослідження якісного вмісту екстрактів було здійснено за допомогою показових якісних реакцій, методики яких наведені в п.2.3.5.

Встановлено наявність у ЛРС і КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. і *P. alba* Reichenb. фенольних сполук: флавоноїдів, дубильних речовин, гідроксикоричних кислот; а також гідрохінон похідних, алкалоїдів, антоціанів. Хромонів, кумаринів, сапонінів у досліджуваних об'єктах не

виявлено. Про наявність або відсутність таких сполук у всіх досліджуваних екстрактах свідчили результати спостережень (табл. Г.1, дод. Г).

Присутність у всіх екстрактах кислот підтверджена додаванням 0,05% розчину бромтимолового синього та спостереженням жовтого забарвлення.

Якісний склад екстрактів досліджено методом ТШХ за методикою, наведеною у п. 2.3.5. На рис. 5.1 наведено приклад хроматограми різних екстрактів *A. nemorosa* L.

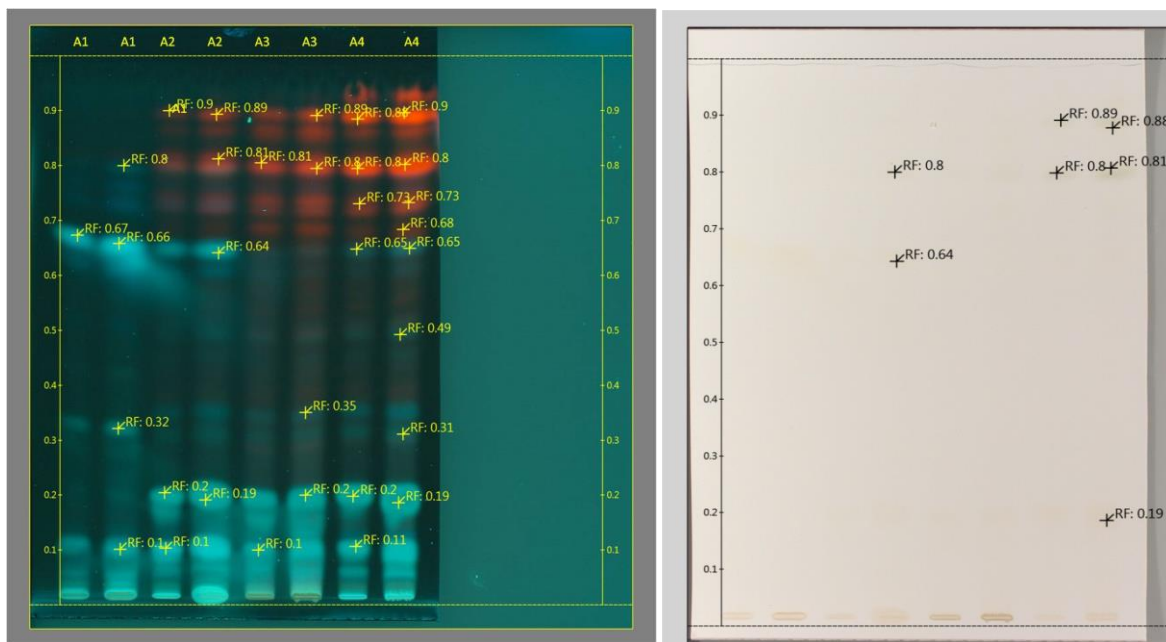


Рис. 5.1. Хроматограма екстрактів з ЛРС *A. nemorosa* L. при УФ-світлі та при денному світлі. Елюент: етилацетат – метанол – вода (100:6:20)

Як видно з рис. 5.1 за результатами ТШХ в екстрактах з ЛРС та КБ *A. nemorosa* L. ідентифіковано: у зразках А1-А4 – галову кислоту ($R_f=0,1$), *n*-кумарову кислоту ($R_f=0,66$), нарінгін ($R_f=0,2$); у зразках А2, А3, А4 – кавову кислоту ($R_f=0,2$), кверцетин ($R_f=0,8$).

У екстрактах з ЛРС та КБ *D. elatum* L. ідентифіковано кавову кислоту, ферулову кислоту, кверцетин і галангін.

У екстрактах з ЛРС та КБ кавову кислоту, кумарову кислоту, ферулову кислоту, кверцетин, галову кислоту.

5.2. Ідентифікація та кількісне визначення БАР методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

Розділення, ідентифікація та кількісне визначення фенольних сполук у водно-етанольних екстрактах проводили методом ВЕРХ на рідинному хроматографі Ultimate 3000 Dionex HPLC Systems з фотодіодним детектором із застосуванням програми 6.8 Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Хроматограми екстрактів з ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. і *P. alba* Reichenb. наведено на рис. 5.2-5.4. У екстрактах КБ та ЛРС *A. nemorosa* L. виявлено п'ять речовин фенольного характеру (кавова, ферулова, розмаринова кислоти, нарингенін, хризин). У екстрактах КБ та ЛРС *D. elatum* L. чотири сполуки (еллагова, розмаринова кислоти, хризин, нарингенін), чотири сполуки у екстрактах КБ та ЛРС *P. alba* (*n*-кумарова, кавова кислоти, нарингенін, хризин) (табл. Д.1, дод. Д).

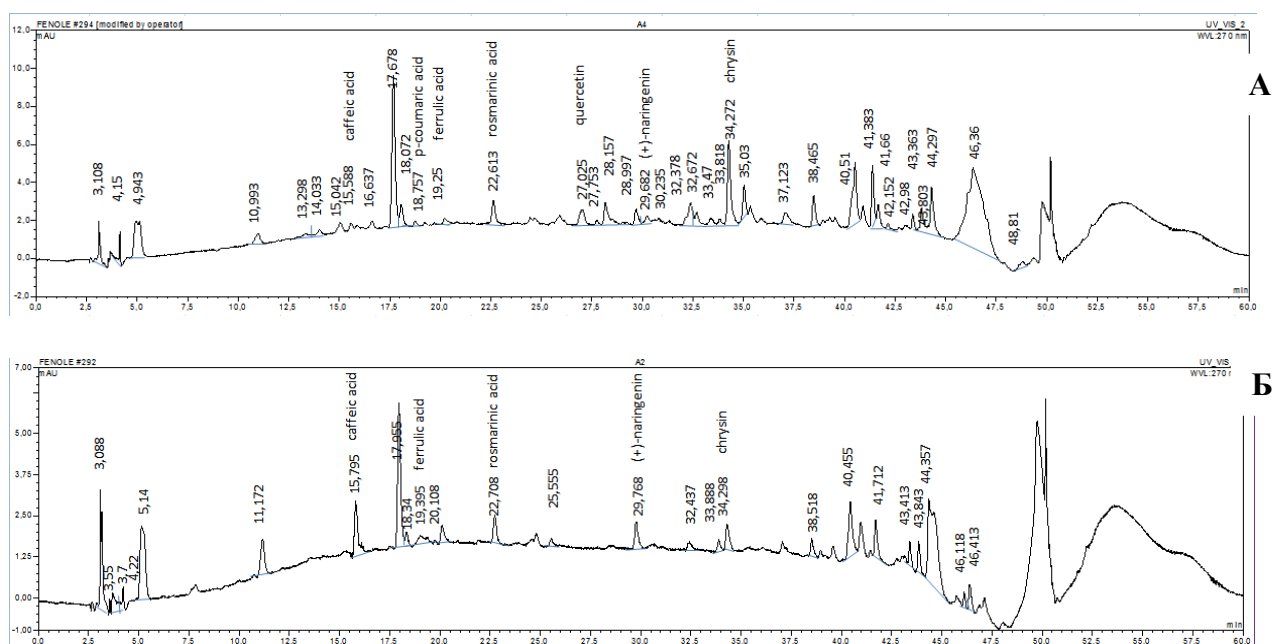


Рис. 5.2. Хроматограма (ВЕРХ) екстрактів *A. nemorosa* L.: А - ЛРС; Б – КБ

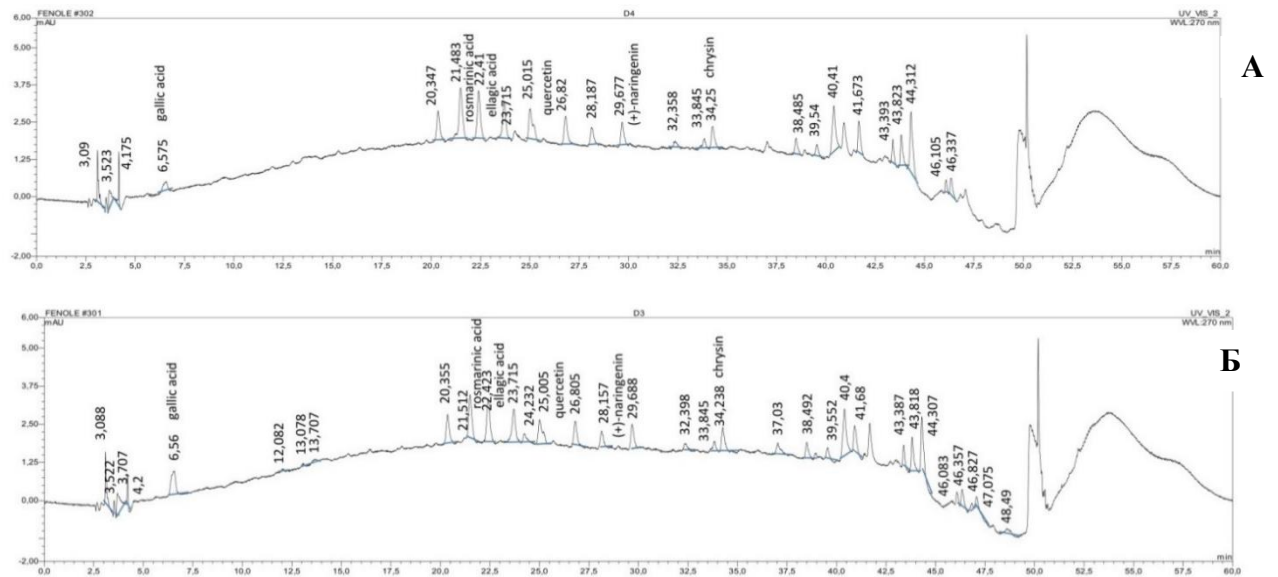


Рис. 5.3. Хроматограма (ВЕРХ) екстрактів *D. elatum* L.: А - ЛРС; Б – КБ

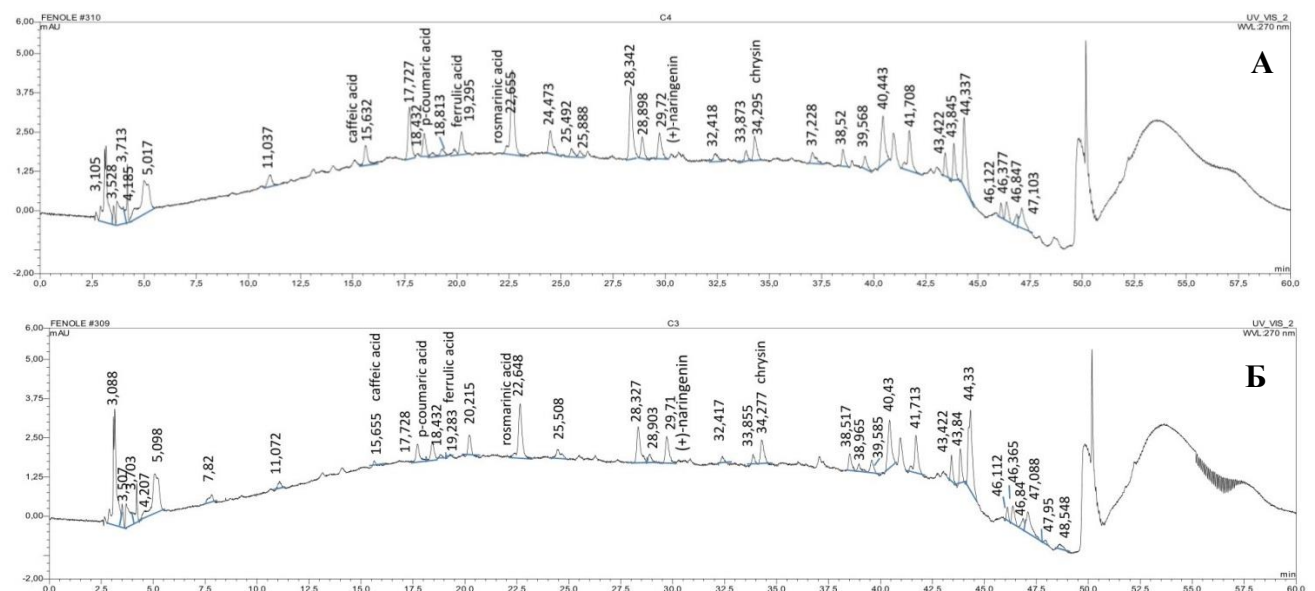


Рис. 5.4. Хроматограма (ВЕРХ) екстрактів *P. alba* Reichenb.: А - ЛРС; Б – КБ

Результати аналізу фенольних сполук методом ВЕРХ підтверджують практично рівноцінний якісний і кількісний їх вміст у екстрактах ЛРС і КБ досліджуваних об'єктів. За результатами ВЕРХ можна зробити висновок, що КБ може використовуватись як альтернативне джерело БАР фенольної природи.

5.3. Кількісні визначення БАР аналітичними методами

Сумарну кількість фенольних сполук було визначено відомим спектрофотометричним методом із застосуванням реактиву Фоліна-Чокальтеу [166]. Це простий, добре відомий високочутливий метод кількісного (інтегральна оцінка) визначення. Кількість фенолів визначали у перерахунку на галову кислоту за методикою наведеною у п.2.3.6.1.

Кількісний вміст флавоноїдів визначали за методикою Кріста Мюллера, наведеною в п. 2.3.6.2 у перерахунку на кверцетин.

Кількісне визначення гідроксикоричних здійснювали спектрофотометричним методом за методикою наведеною у п. 2.3.6.3 у перерахунку на хлорогенову кислоту.

Вміст дубильних речовин визначали відповідно до методики наведеної у п. 2.3.6.5, спектрофотометричним методом. Вміст танінів визначали у перерахунку на пірогалол.

Сумарний вміст гідрокінонових похідних проводили спектрофотометричним методом за методикою наведеною у п. 2.3.6.6.

Кількісне визначення антоціанів проводили спектрофотометричним методом відповідно до методики наведеної у п. 2.3.6.4.

Результати кількісного визначення БАР у досліджуваних об'єктах: ЛРС та КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. наведено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Результати кількісного визначення біологічно активних сполук у досліджуваних об'єктах

Вміст сполук, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 5	Досліджуваний об'єкт					
	<i>Anemone nemorosa</i> L.		<i>Delphinium elatum</i> L.		<i>Pulsatilla alba</i> Reichenb.	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
Сума фенольних сполук, мг галової кислоти в мл	1,2289 ± 0,01	1,2186 ± 0,02	2,6230 ± 0,02	2,4478 ± 0,01	4,4631 ± 0,02	4,2502 ± 0,01

Сума флавоноїдів, мг кверцетину в мл	0,0350 ± 0,01	0,0324 ± 0,02	2,0389 ± 0,01	1,9883 ± 0,02	3,7603 ± 0,02	3,4785 ± 0,02
Дубильні речовини (в перерахунку на танін), %	1,46 ± 0,02	1,50 ± 0,02	3,28 ± 0,02	3,16 ± 0,03	2,04 ± 0,02	2,00 ± 0,02
Сума гідрокси- коричних к-т (в перерахунку на хлорогенову кислоту), %	1,71 ± 0,02	1,69 ± 0,02	2,06 ± 0,02	2,09 ± 0,03	3,09 ± 0,02	2,98 ± 0,02
Сума гідрокінон- похідних сполук, %	0,47 ± 0,02	0,45 ± 0,02	1,71 ± 0,02	1,68 ± 0,02	0,96 ± 0,02	0,91 ± 0,02
Сума антоціанів (в перерахунку на ціанідину хлорид), %	0,032 ± 0,02	0,029 ± 0,02	0,050 ± 0,02	0,043 ± 0,03	0,024 ± 0,02	0,022 ± 0,02

5.4. Хромато-мас-спектрометрія.

Порівняльний аналіз компонентного складу легкої фракції екстрактів з ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. було зроблено на хроматографі Agilent Technology 6890 GC System. Дослідження сполук, отриманих методом газової хроматографії, із досліджуваних зразків проводилось із використанням бібліотечних мас-спектрів NIST 05 та WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів більше 470000.

На рис. 5.5.-5.7. наведено хроматограми хлороформних фракцій екстрактів *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb.

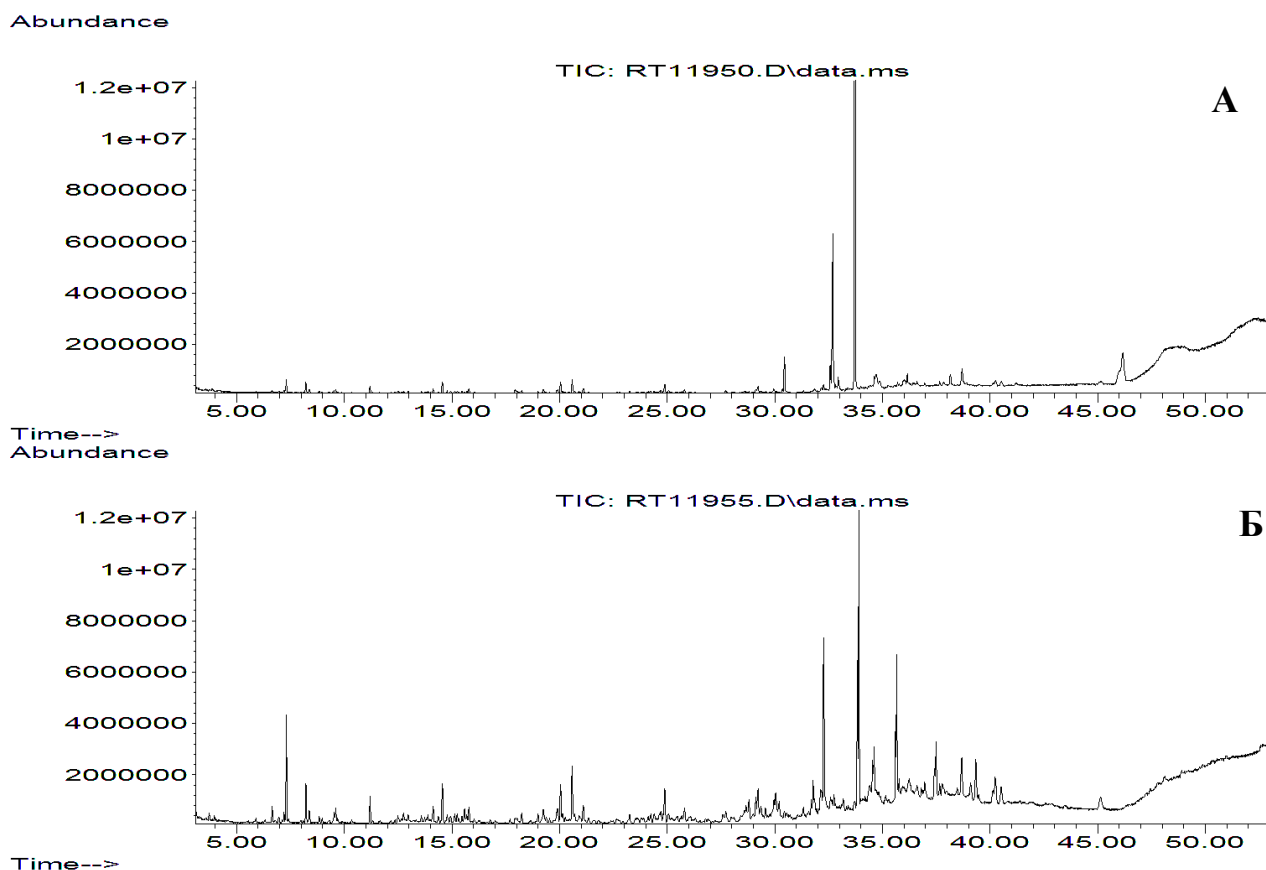


Рис. 5.5. Хроматограма хлороформної фракції *A. nemorosa* L.: А - ЛРС; Б – КБ.

При дослідженні компонентного складу хлороформних фракцій екстрактів КБ та ЛРС *Anemone nemorosa* L (рис. 5.5) було ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени. Найбільше у досліджуваних зразках виявили ацетилтрибутилцитрату – 31,21 %. (ЛРС) та 30,02 % (КБ). Також у екстракті ЛРС і КБ ідентифіковано естери: дибутиловий етер себацінової кислоти – 6,44 % та 6,01 % відповідно, нонадециловий естер 2,4-дифторбензойної кислоти – 3,47 % та 3,11 % відповідно, гептадециловий естер метоксиоцтової кислоти – 1,19 % та 1,03 % відповідно, тридециловий етер пеларгонієвої кислоти – 1,15 % та 1,08 % відповідно. Терпени у обох зразках представлені моноциклічним терпеном лімоненом- 0,52 % (ЛРС), 0,49 % (КБ) та дитерпеном римуеном 2,81 % (ЛРС), 2,77 % (КБ). Також ідентифіковано олеамід – 3,09 %. (ЛРС) та 2,99 % (КБ), дибутиловий етер себацінової кислоти 6,44 % (ЛРС) та 6,03 % (КБ), алкани: генейкозан 1,5 % (ЛРС) та 1,03 % (КБ),

тетракозан – 0,53 % (ЛРС) та 0,46 % (КБ), докозан – 0,39 % та 0,31 % (КБ), локсапін у кількості 1,92 % (ЛРС) та 1,78 % (КБ).

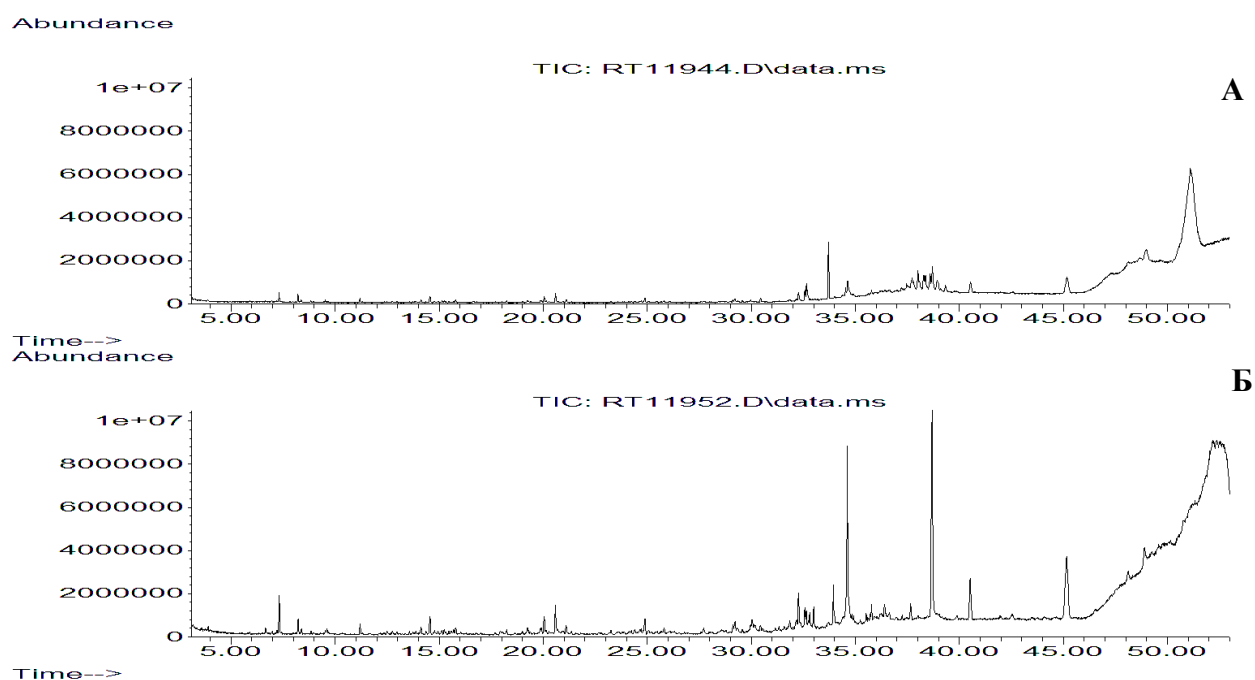


Рис. 5.6. Хроматограма хлороформної фракції *D. elatum* L.: А - ЛРС; Б – КБ

Як свідчать дані дослідження компонентного складу хлороформних фракцій екстрактів КБ та ЛРС *Delphinium elatum* (рис. 5.6) в досліджуваних екстрактах було ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, аміди, монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, нафталіну, тіазолу, бенздіазипіну та невелика кількість терпену. Аналізуючи одержані дані можна зробити висновок, що компонентний склад досліджуваних об'єктів представлений в основному парафіновими вуглеводнями, альдегідами та естерами жирних кислот та деяким вмістом терпенів. Так вміст генейкозану – 1,47 % (ЛРС) та 1,15 % (КБ), ейкозану – 3,22 % (ЛРС), 2,66 % (КБ), докозану – 1,88 % (ЛРС) та 4,75 % (КБ), гентріаконтану – 1,54% (ЛРС) та 1,46 % (КБ). Також ідентифіковано монотерпен лімонен - 0,29% (ЛРС) та 0,79% (КБ), пальмітинову кислоту – 0,14 % (ЛРС) та 0,49 % (КБ). У екстрактах КБ *Delphinium elatum* ідентифікували: октадекан - 3,93 %, трикозан 0,68 %, нонадекан 1,44 %, які не

ідентифікували у екстрактах ЛРС. Проте у екстрактах ЛРС ідентифіковано дезокси-дигідроестрон 1,63%, який не ідентифіковано у екстрактах КБ. Вміст нордекстрометорфану (2-метоксиморфінан) у досліджуваних зразках значно відрізнявся. Так, у екстракті ЛРС становив 34 %, а у екстракті КБ - 0,67 %. Також у екстрактах ЛРС і КБ спостерігався суттєво різний вміст олеїнової кислоти та становив 4,57 % та 0,39 % відповідно.

В досліджуваних екстрактах *Pulsatilla alba* (рис. 5.7) було ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, похідні тiazолу, бенздіазипіну, нафталіну та терпену.

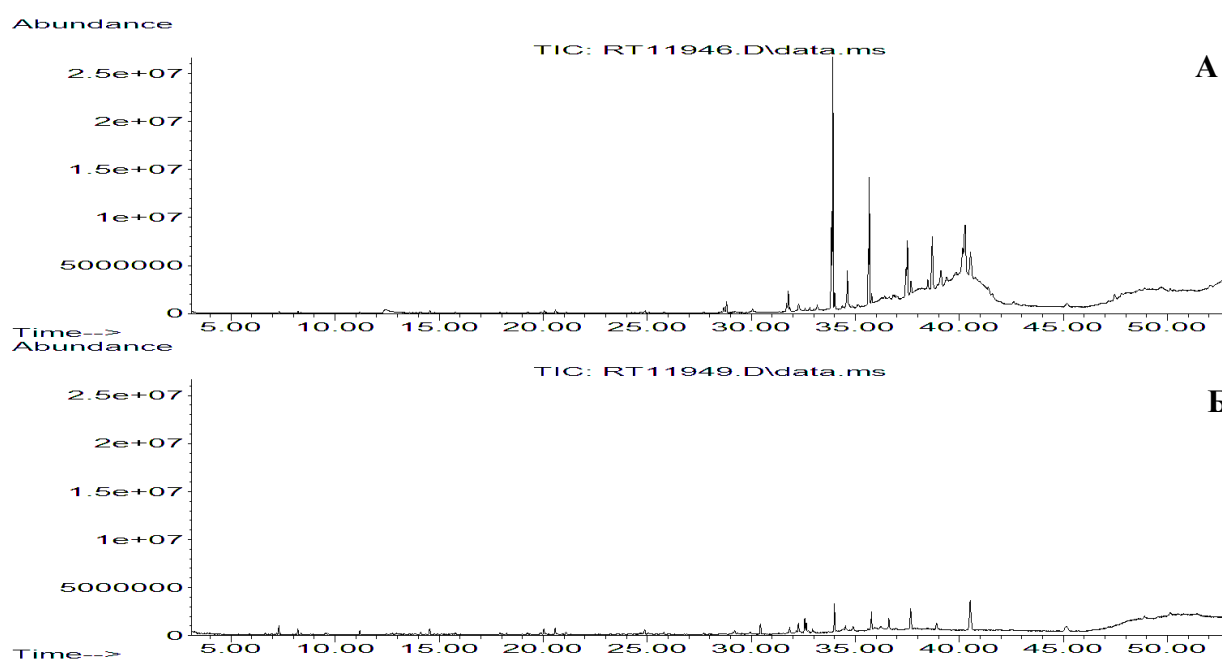


Рис. 5.7. Хроматограма хлороформної фракції *P. alba*: А - ЛРС; Б – КБ.

Аналізуючи одержані дані можна зробити висновок, що компонентний склад досліджуваних об'єктів представлений в основному парафіновими вуглеводнями, альдегідами та естерами жирних кислот та терпенами. Так вміст октадекану – 1,55 % (ЛРС) та 2,37 % (КБ), генейкозану – 1,77 % та 5,92 % (КБ), ейкозану – 0,18 % (ЛРС) та не ідентифіковано у екстракті КБ.

Гексакозан – 1,07 %; олеїламід – 1,48 %, лауриловий ангідрид – 2,18 %, каприловий альдегід – 0,2 %, декстрорфан - 5,44 %, пальмітинову кислоту –

0,17 %, цис-вакценову кислоту – 0,61 % та ерукову кислоту – 0,06 %, гексадециловий естер пеларгонової кислоти – 4,85 %, ундециловий естер пеларгонової кислоти – 2,31 %, міристилового ефіру – 1,54 %, пальмітинової кислоти 2,3-біс(ацетилокси)пропіл естеру – 4,17 %, етиловий ефір лаурилової кислоти – 0,34 % ідентифіковано тільки у екстракті ЛРС. Тетракозан – 7,8 %, докозан – 2,94 %, трикозану – 6,81 %, нонадекан – 1,53 %, пентадекан – 0,42 %, 2-метоксиморфінан - 0,87 %, етиловий естер арахінової кислоти – 2,16 %, етиловий естер пальмітинової кислоти – 1,31 %, етиловий естер стеаринової кислоти – 0,97 %, 1Н-Бензо[1,4]-діазепін-2(3Н)-он - 0,82 % ідентифіковані тільки у екстрактах КБ. Слід відмітити наявність у досліджуваних зразках слідів монотерпену: лімонену 0,04 % (ЛРС) та 0,88 % (КБ), що свідчить про значно збільшений його вміст у екстракті КБ.

Вміст виявлених речовин в екстрактах КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. є достатнім та практично рівноцінним з вмістом виявлених БАР в екстрактах ЛРС, що дозволяє використання КБ як сировини для одержання БАР.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5

1. В екстрактах з *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. встановлено наявність фенольних сполук: флавоноїдів, дубильних речовин, гідроксикоричних кислот, гідрохінон похідних, алкалоїдів, антоціанів. Ці сполуки присутні як в екстрактах з ЛРС, так і в екстрактах з КБ.

2. Визначено аналітичними методами у зразках екстрактів сумарний вміст фенольних сполук: $1,2289 \pm 0,01$ мг/мл у ЛРС і $1,2186 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *A. nemorosa* L., $2,6230 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $2,4478 \pm 0,01$ мг/мл у КБ *D. elatum* L., $4,4631 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $4,2502 \pm 0,01$ мг/мл у КБ *P. alba*; вміст флавоноїдів: $0,0350 \pm 0,01$ мг/мл у ЛРС і $0,0324 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *A. nemorosa* L., $2,0389 \pm 0,01$ у ЛРС і $1,9883 \pm 0,02$ у КБ *D. elatum* L., $3,7603 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $3,4785 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *P. alba*; вміст дубильних

речовин: $1,46 \pm 0,02$ % у ЛРС і $1,50 \pm 0,02$ % у КБ *A. nemorosa* L., $3,28 \pm 0,02$ % у ЛРС і $3,16 \pm 0,03$ % у КБ *D. elatum* L., $2,04 \pm 0,02$ % у ЛРС і $2,00 \pm 0,02$ % у КБ *P. alba*; сумарний вміст гідроксикоричних: $1,71 \pm 0,02$ % у ЛРС і $1,69 \pm 0,02$ % у КБ *A. nemorosa* L., $2,06 \pm 0,02$ % у ЛРС і $2,09 \pm 0,03$ % у КБ *D. elatum* L., $3,09 \pm 0,02$ % у ЛРС і $2,98 \pm 0,02$ % у КБ *P. alba*; сумарний вміст гідрохінонпохідних: $0,47 \pm 0,02$ % у ЛРС і $0,45 \pm 0,02$ % у КБ *A. nemorosa* L., $1,71 \pm 0,02$ % у ЛРС і $1,68 \pm 0,02$ % у КБ *D. elatum* L., $0,96 \pm 0,02$ % у ЛРС і $0,91 \pm 0,02$ % у КБ *P. alba*; вміст антоціанів $0,032 \pm 0,02$ % у ЛРС і $0,029 \pm 0,02$ % у КБ *A. nemorosa* L., $0,050 \pm 0,02$ % у ЛРС і $0,043 \pm 0,03$ % у КБ *D. elatum* L., $0,024 \pm 0,02$ % у ЛРС і $0,022 \pm 0,02$ % у КБ *P. alba*.

3. Проведено порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у екстрактах КБ та ЛРС методами ГРХ, ВЕРХ та ТШХ. За результатами ТШХ в екстрактах ЛРС і КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. ідентифіковані в екстрактах КБ сполуки є такими ж, як сполуки в екстрактах ЛРС. Методом ВЕРХ у екстрактах КБ та ЛРС визначено практично рівноцінний якісний і кількісний вміст сполук фенольного характеру, що потенційно дозволяє вважати КБ альтернативною сировиною для одержання БАР.

4. Досліджено компонентний склад летких фракцій екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. та проведено їх порівняльний аналіз методом ГРХ. В досліджуваних екстрактах *Anemone nemorosa* L. ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени; в екстрактах *Pulsatilla alba* Reichenb. - ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, похідні тіазолу, бенздіазипіну, нафталіну та терпену; в досліджуваних екстрактах *Delphinium elatum* L. ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, аміді, монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, нафталіну, тіазолу, бенздіазипіну та невелика кількість терпену. Визначені речовини у складі летких фракцій КБ та ЛРС

A. nemorosa L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. є в достатній кількості, проте відрізняються за компонентним складом.

РОЗДІЛ 6

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ І ФАРМАКОЛОГІЧНА ДІЯ ЕКСТРАКТІВ

Експериментальні дослідження гострої токсичності та фармакологічної активності екстрактів рослинної сировини і калюсної біомаси *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. проводились на базі Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького під керівництвом професора О. Р. Піняжко.

Усі досліді проводили відповідно до Законів України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та «Про ветеринарну медицину» [82, 84], правил "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою" [42, 83, 134] та інших настановчих документів щодо поводження з тваринами, що застосовуються у дослідних та наукових процедурах [32, 33, 79 - 81].

Дослідження фармакологічної дії проведені *in vivo* на білих щурах обох статей. Тварини утримувались у віварії, в належних умовах, із дотриманням санітарно-гігієнічних вимог до режиму харчування, із забезпеченням вільного доступу до води та корму. Як у дослідні, так і у контрольні групи відбирались здорові тварини, вага яких була у заданих межах. Відібрані групи щурів утримували в окремих клітках з сітчастою підлогою, забезпечених автопоїлками і годівницями. Спостереження за станом експериментальних тварин фіксували в лабораторні журнали щоденно [7, 41].

6.1. Вивчення гострої токсичності екстрактів

Для оцінки перспективи фармакологічного застосування екстрактів ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. як потенційних біологічно активних агентів, проведено дослідження їх гострої токсичності. Дослідження проведені на безпородних білих щурах обох статей масою 190-220 г. Перед експериментом тварини були поділені 36 груп по 6

тварин у кожній групі. Щурів позбавляли їжі за 24 год до введення препаратів екстрактів. Тестовані екстракти вводили одноразово внутрішньошлунково з допомогою металевого зонду в дозах 5000, 10000 та 15000 мг/кг. Кожна група тварин отримувала по одній дозі одного виду екстракту і одна група щурів (n=6) слугувала інтактною. Після введення препаратів тварин утримували ще 4 год без їжі з вільним доступом до води. При виборі дози під час вивчення гострої токсичності за умов внутрішньошлункового введення орієнтувались на максимальну дозу IV класу токсичності – 5000 мг/кг відповідно до методичних рекомендацій [40, 50, 57]. Спостереження за тваринами вели протягом двох тижнів. Реєстрували прояви порушень фізіологічного стану щурів, виживання, динаміку маси тіла. Під час експерименту тварин утримували на звичайному раціоні з вільним доступом до води та їжі.

Після внутрішньошлункового введення препарату в дозі 5000 мг/кг ознак інтоксикації у щурів не спостерігали: тварини були охайними, активними, мали задовільний апетит, реагували на звукові та світлові подразники, процеси сечовиділення і дефекації були в нормі, порушення дихання та судом не відзначали. Рефлекторна збудливість у всіх тварин була збережена.

Відразу після введення досліджуваних екстрактів у дозах 10000 та 15000 мг/кг спостерігалась нетривала рухова загальмованість тварин, пов'язана з перевантаженням шлунку значним об'ємом рідини, чого не спостерігалось при введенні в дозі 5000 мг/кг. В подальшому змін у зовнішньому вигляді, стані покривів тіла та динаміці маси тіла не відмічалось.

При спостереженні за тваринами протягом 2 тижнів не було встановлено загибелі в жодній з експериментальних груп (табл. Е.1, дод. Е). Порівняння поведінки щурів, споживання води та їжі піддослідними й інтактними тваринами показало відсутність відмінностей.

Спостереження за динамікою маси тіла щурів показало відсутність відмінностей при порівнянні з групою інтактного контролю, тварини обох груп рівномірно набирали масу (табл. Є.1, дод. Є).

Таким чином результати дослідження показали, що при внутрішньошлунковому введенні екстрактів з ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. в дозах 5000 мг/кг, 10000 мг/кг та 15000 мг/кг не викликають токсичних проявів у досліджуваних груп білих щурів. Отже, екстракти як із ЛРС, так і КБ можна віднести до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини).

6.2. Дослідження гепатопротекторної активності

Вивчення гепатопротекторних властивостей з ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. проводили на моделі гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту [62, 125, 168]. Експеримент проведений на 120 білих щурах обох статей лінії “Вістар” масою 180-220 гр. Перед експериментом тварини були поділені на 15 груп по 8 тварин у кожній групі. Тварини першої групи слугували інтактним контролем і отримували звичайний раціон віварію та питну воду “*ad libitum*”. У тварин 2-5 груп викликали розвиток гострого токсичного гепатиту, шляхом внутрішньошлункового одноразового введення тетрахлориду метану в дозі 10 мл/кг у вигляді 50 % олійного розчину. Тварини другої групи не отримували жодного лікування і їх використовували як «модельну патологію». Тварини 3-ої групи отримували лікування референс-препаратом класичним гепатопротекторним лікарським засобом рослинного походження “Карсил” (Sopharma JSC, Болгарія), в дозі 150 мг/кг внутрішньошлунково. Тварини 4 та 5 груп отримували 40 % та 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Anemone nemorosa* L. (А-2 і А-3 відповідно); щури з шостої і сьомої груп отримували 40 % та 70 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *Anemone nemorosa* L. (А-21 і А-31 відповідно); 8 - 11 груп отримували 40 % та 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Delphinium elatum* L. (D2 і D3 відповідно), КБ *Delphinium elatum* L. (D21 і

D31 відповідно); 12 – 15 груп отримували 40 % та 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Pulsatilla alba* (P2 і P3 відповідно); КБ *Pulsatilla alba* (P21 і P31 відповідно) в дозі 2 мл/кг. Для оцінки розвитку патологічного процесу та впливу досліджуваних екстрактів на функцію печінки проводили визначення в сироватці крові: активностей трансаміназ – аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ); активностей гама-глутамілтрансферази (γ -ГТП), загальної лужної фосфатази (ЛФ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ); вмісту загального білка, загального білірубіну, загального холестерину та глюкози. Визначення рівнів вищеперерахованих біохімічних показників проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі CORMAY ACCENT-200 з використанням відповідних реагентів виробництва фірми CORMAY (Польща). Крім того, оцінювали клінічний прояв гепатиту за поведінкою тварин, їх апетитом, станом шкіри та консистенцією калових мас. Для експериментальних біохімічних досліджень відбирали кров.

Токсичний вплив CCl_4 на клітини печінки пов'язують в першу чергу з прооксидантною дією вільних радикалів, які утворюються внаслідок його метаболізму - трихлорметильного CCl_3 та високореактивного трихлорметилпероксильного CCl_3OO . Ці радикали здатні зв'язуватися з клітинними компонентами: білками, ліпідами, нуклеїновими кислотами та ініціювати процеси перекисного окислення [178].

В результаті проведеного дослідження встановлено, що гостре отруєння тетрахлорметаном у тварин групи “модельна патологія” спричинює достовірне збільшення активності АЛТ (у 12 разів), АСТ (у 5,7 разів), ЛФ (у 2 рази) та ЛДГ (у 1,6 разів) у порівнянні до групи інтактних тварин (табл. 6.3-6.5). Така картина є свідченням гострого запального процесу в печінці та цитолізу плазматичних мембран гепатоцитів. Одночасно в уражених тварин відмічалось недостовірне зниження рівнів загального білка та глюкози, суттєве, проте статистично недостовірне зростання рівнів γ -ГТП та загального білірубіну, а також достовірне зростання рівня загального холестерину (у 2 рази). Подібна динаміка зміни активності ферментів та концентрації метаболітів

спостерігалась у групі тварин, які отримували екстракт А-2, А-21, D-2, D-3, D-21, D-31 (табл. 6.3-6.4). Значення концентрацій вищеперерахованих біохімічних маркерів функцій та стану печінки при застосуванні вищевказаних екстрактів були дещо нижчими ніж у групі “модельна патологія” проте суттєво і позитивно не відрізнялись.

У групі тварин, які отримували референс-препарат “Карсил”, відмічалось достовірне зростання рівнів АЛТ, АСТ, ЛДГ, ЛФ та загального холестерину; недостовірне зростання рівнів γ -ГТП, загального білка, загального білірубину, та недостовірне зниження рівня глюкози по відношенню до групи інтактного контролю (табл.Ж.1-Ж.3, дод. Ж та рис. 6.1, 6.2).

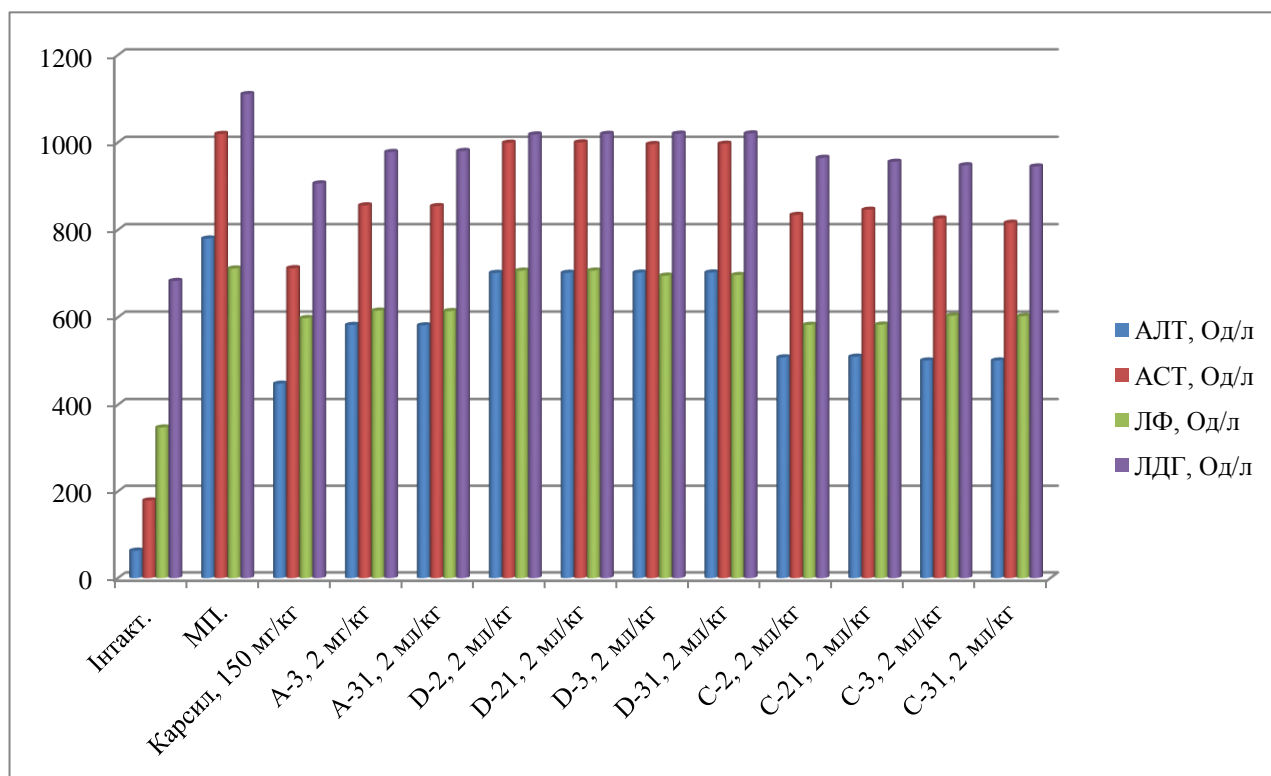


Рис. 6.1. Показники рівнів ЛДГ, ЛФ, АЛТ, АСТ в плазмі крові білих щурів при застосуванні екстрактів з ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. та референс-препарату на моделі гострого CCl_4 -індукованого токсичного гепатозу

У групі тварин, які отримували референс-препарат «Карсил» спостерігалось достовірне зростання рівнів АЛТ, АСТ, ЛДГ, ЛФ та загального

холестерину; недостовірне зростання рівнів γ -ГТП, загального білка, загального білірубину, та недостовірне зниження рівня глюкози по відношенню до групи інтактного контролю (табл. 6.3, 6.4, 6.5 та рис. 6.1, 6.2). Одночасно спостерігалась нормалізація біохімічних показників функції печінки та позитивна динаміка зниження активності ферментних систем по відношенню до групи «модельна патологія», що вказує на часткову гепатопротекцію, зумовлену ефектами екстракту плодів розторопші.

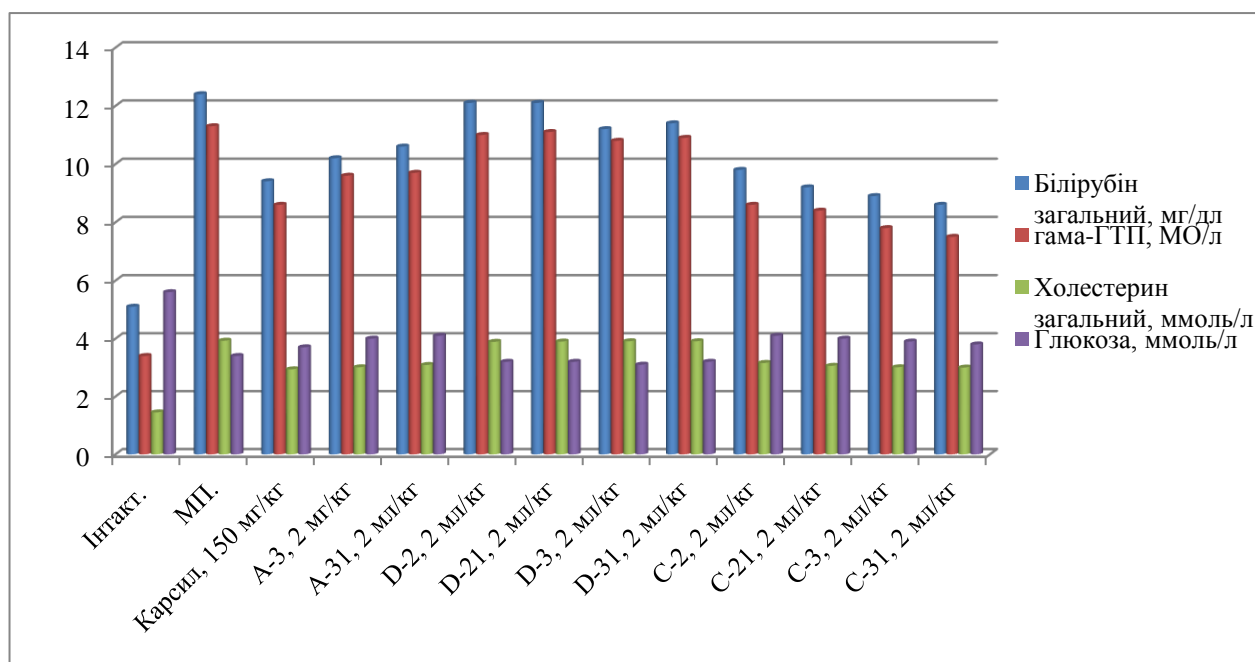


Рис. 6.2. Показники рівнів глюкози, загального холестерину, загального білірубину, γ -ГТП в плазмі крові білих щурів при застосуванні екстрактів з ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. та референс-препарату на моделі гострого CCl_4 -індукованого токсичного гепатозу

Так, рівні АЛТ та АСТ були достовірно нижчими на 43 % ($p \leq 0,05$) та 31 % ($p \leq 0,05$), по відношенню до рівнів групи «модельна патологія». Активність ЛФ та ЛДГ були нижчими на 16 % та 19 %, однак ці показники не були статистично достовірними. Відмічалось «недостовірне» зниження рівнів γ -ГТП та загального білірубину майже на 25 % по відношенню до тварин групи «модельна патологія».

У групі тварин, яким застосовували екстракти А-3, Р-2, Р-3, Р-21, Р-31 спостерігався біохімічний профіль наявності запального процесу з ефектами часткової протекції. Так, рівні АЛТ та АСТ при застосуванні екстрактів А-3, Р-2, Р-3, Р-21, Р-31 були достовірно нижчими на 25 % ($p \leq 0,05$), 24 % ($p \leq 0,05$), 26 % ($p \leq 0,05$), 23 % ($p \leq 0,05$), 25 % ($p \leq 0,05$) та 16 % ($p \leq 0,05$), 15 % ($p \leq 0,05$), 13 % ($p \leq 0,05$), 14 % ($p \leq 0,05$), 16 % ($p \leq 0,05$) відповідно, по відношенню до рівнів групи «модельна патологія», та були вищими на 30 % ($p \leq 0,001$), 28 % ($p \leq 0,001$), 29 % ($p \leq 0,001$), 31 % ($p \leq 0,001$), 30 % ($p \leq 0,001$) та 20 % ($p \geq 0,05$), 18 % ($p \geq 0,05$), 19 % ($p \geq 0,05$), 21 % ($p \geq 0,05$), 20 % ($p \geq 0,05$) відповідно, по відношенню до рівнів групи «Карсил». Значення активностей ЛФ, ЛДГ, γ -ГТП при застосуванні екстрактів А-3, Р-2, Р-3, Р-21, Р-31 були меншими на 14 %, 13 %, 12 %, 14 %, 15 % для ЛФ, 11 %, 10 %, 12 %, 9 %, 11 % для ЛДГ, 14 %, 12 %, 13 %, 12 %, 14 % для γ -ГТП відповідно, по відношенню до рівнів групи «модельна патологія», а також практично еквівалентними до рівнів групи «Карсил», проте не були статистично достовірними. В той же час відмічалось зростання рівня глюкози, що перевищувало аналогічний показник в групах «модельна патологія» та «Карсил» при застосуванні екстрактів А-3, А-31, Р-2, Р-21, Р-3, Р-31 на 23 %, 14 %, 18%, 19%, 18%, 17% відповідно ($p \geq 0,05$).

Таким чином, екстракти А-2, А-21, D-2, D-21, D-3, D-31 не проявили гепатопротекторного ефекту на моделі тетрахлорметанового гострого токсичного гепатозу. Тоді як екстракти А-3, А-31, Р-2, Р-21, Р-3, Р-31 виявляли помірні гепатопротекторні властивості та частково сприяли нормалізації функції печінки і могли б бути ефективним в якості профілактичного лікарського засобу для тривалого застосування при токсичних ураженнях.

6.3. Дослідження гіпоазотемічної активності

Вивчення гіпоазотемічної активності екстрактів рослинної сировини і калюсної біомаси *Anemone nemorosa* L. (А-2, А-21, А-3, А-31), *Delphinium elatum* L. (D-2, D-21, D-3, D-31), *Pulsatilla alba* Reichenb. (Р-2, Р-21, Р-3, Р-31) проводили на моделі сулемової нефропатії. Експеримент виконаний на 120

білих щурах обох статей з середньою масою 180-220 гр. Для дослідження тварини були поділені на 15 груп по 8 щурів в кожній. Тварини першої групи слугували інтактним контролем і отримували звичайний раціон віварію та питну воду *ad libitum*. Тваринам 2-7 груп одноразово внутрішньоочеревинно вводили розчин ртуті (II) хлориду у дозі 2 мг/кг. Тварини 2 групи слугували «модельною патологією» і не отримували ніякого лікування (з допомогою зонду вводили воду). Тварини 3 групи отримували внутрішньошлунково гіпоазотемічний і діуретичний лікарський засіб «Леспефрил» в дозі 2 мл/кг. Тваринам 4-15 груп внутрішньошлунково вводили досліджувані екстракти у дозах 2 мл/кг відповідно. Референс-препарат та досліджувані екстракти вводили 10 днів, починаючи з першого дня експерименту. По завершенні експерименту здійснювали забір біологічного матеріалу (сеча, кров) та виводили тварин з досліду шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Для моніторингу динаміки розвитку патології нирок проводили загальний аналіз сечі білих щурів з використанням тесту CITOLAB 11 та аналізатора CITOLAB READER 300 (Pharmasco Ltd., Україна). Для моніторингу видільної функції нирок проводили визначення концентрацій основних маркерів: креатиніну та сечовини в плазмі крові та сечі експериментальних тварин. Визначення креатиніну проводили ензиматичним колориметричним методом, вимірюючи інтенсивність забарвлення при довжині хвилі 546 нм; визначення сечовини проводили ферментативним кінетичним методом, з використанням уреази та глутаматдегідрогенази, вимірюючи швидкість зміни оптичної густини при довжині хвилі 340 нм з використанням реагентів фірми “CORMAY” та автоматичного біохімічного аналізатора CORMAY ACCENT-200 (PZ Cormay, Польща). Для моніторингу розвитку гострої ниркової недостатності проводили визначення вмісту іонів натрію в плазмі крові та сечі експериментальних тварин з допомогою іонселективного електродного аналізу (непрямий метод) з використанням аналізатора EASYLYTE PLUS Na/K/Cl, (Medica, США). При необхідності проводили розведення проб плазми та сечі для детекції вмісту електроліту згідно вимірювального діапазону аналізатора.

Введення лабораторним тваринам ртуті (II) хлориду викликає розвиток гострої ниркової недостатності, що супроводжується азотемією, олігурією, зниженням діурезу і швидкості клубочкової фільтрації, збільшенням вагового індексу нирок, з одночасною тимчасовою активацією ПОЛ в нирках [17,183].

В результаті проведеного дослідження встановлено, що при введенні щурам розчину ртуті (II) хлориду у дозі 2 мг/кг розвивається картина, характерна для гострої ниркової недостатності. У тварин групи «модельна патологія» спостерігається характерне зменшення добового діурезу та значне зростання питомої ваги виділюваної сечі (табл. 6.1 - 6.3).

Таблиця 6.1

Добовий діурез показники загальноклінічного аналізу сечі білих щурів при застосуванні екстрактів ЛРС та КБ *Anemone nemorosa* L. А-2, А-21, А-3, А-31 в умовах моделі сулемової нефропатії

Групи/ Показники	ІК	МП	Леспе- фрил, 2 мл/кг	А-2, 2 мл/кг	А-21, 2 мл/кг	А-3, 2 мл/кг	А-31, 2 мл/кг
Діурез, мл /100гр/доба	5,4±0,7	1,9±0,6* ^a	4,0±0,6	12,5±1,6 * ^a # ^b	11,5±1,8 * ^a # ^b	7,9±1,3 ^{#b}	7,6±1,1 ^{#b}
Питома вага	1015±5	>1030	1020±5	1000±5	1005±5	1010±5	1010±5
pH	6,9±0,3	8,1±0,2	7,9±0,3	7,0±0,2	7,0±0,3	7,1±0,3	7,1±0,2
Білок	N	N	N	N	N	N	N
Уробі-ліноген	N	N	N	N	N	N	N
Глюкоза	N	N	N	N	N	N	N
Білірубін	N	N	N	N	N	N	N
Кетони	N	N	N	N	N	N	N
Нітриди	N	N	N	N	N	N	N
ЗК	N	N	N	N	N	N	N

Примітки: ІК- інтактний контроль; МП- модельна патологія; ЗК-залишкова кров; N – не виявлено; * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,001$; ^a- по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b- по відношенню до групи “модельна патологія”.

Підвищується рН сечі до $8,1 \pm 0,2$. Також відмічається суттєве зростання рівнів креатиніну (в 2,3 рази) та сечовини (в 2,0 рази) в плазмі крові (табл. 6.4). В той же час концентрація креатиніну та сечовини в сечі у тварин групи «модельна патологія» мала тенденцію до зниження і була майже вдвічі меншою в порівнянні до інтактних тварин, що є свідченням порушень видільної функції нирок експериментальних тварин [62]. Також спостерігається чітке порушення транспорту іонів натрію, спричиненого введенням сулеми, що проявлялось у збільшенні рівня екскреції цього катіону та зниженням рівня його плазматичної концентрації.

Таблиця 6.2

Добовий діурез показники загальноклінічного аналізу сечі білих щурів при застосуванні екстрактів ЛРС та КБ *Delphinium elatum* L. D-2, D-21, D-3, D-31 в умовах моделі сулемової нефропатії

Групи/ Показники	ІК	МП	Леспе- фрил, 2 мл/кг	D-2, 2 мл/кг	D-21, 2 мл/кг	D-3, 2 мл/кг	D-31, 2 мл/кг
Діурез, мл /100гр/доба	$5,4 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,6^{*a}$	$4,0 \pm 0,6$	$11,7 \pm 1,0^{*a\#b}$	$11,8 \pm 1,2^{*a\#b}$	$7,7 \pm 0,9^{\#b}$	$7,9 \pm 0,6^{\#b}$
Питома вага	1015 ± 5	>1030	1020 ± 5	1005 ± 3	1007 ± 5	1007 ± 3	1008 ± 1
рН	$6,9 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,1$
Білок	N	N	N	N	N	N	N
Уробі- ліноген	N	N	N	N	N	N	N
Глюкоза	N	N	N	N	N	N	N
Білірубін	N	N	N	N	N	N	N
Кетони	N	N	N	N	N	N	N
Нітрити	N	N	N	N	N	N	N
ЗК	N	N	N	N	N	N	N

Примітки: ІК- інтактний контроль; МП- модельна патологія; ЗК-залишкова кров; N – не виявлено; * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,001$; ^a- по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b- по відношенню до групи “модельна патологія”.

Добовий діурез показники загальноклінічного аналізу сечі білих щурів при застосуванні екстрактів ЛРС та КБ *Pulsatilla alba* Reichenb. P-2, P-21, P-3, P-31 в умовах моделі сулемової нефропатії

Групи/ Показники	ІК	МП	Леспефрил, 2 мл/кг	P-2, 2 мл/кг	P-21, 2 мл/кг	P-3, 2 мл/кг	P-31, 2 мл/кг
<i>Діурез, мл /100гр/доба</i>	5,4±0,7	1,9±0,6* ^a	4,0±0,6	9,5±0,9 * ^a # ^b	9,0±1,1* ^a # ^b	6,1±1,6 ^{#b}	6,2±1,3 ^{#b}
<i>Питома вага</i>	1015±5	>1030	1020±5	1007±2	1009±1	1011±8	1012±3
<i>pH</i>	6,9±0,3	8,1±0,2	7,9±0,3	6,8±0,5	7,1±0,4	7,3±0,1	7,5±0,4
<i>Білок</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>Уробіліноген</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>Глюкоза</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>Білірубін</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>Кетони</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>Нітрити</i>	N	N	N	N	N	N	N
<i>ЗК</i>	N	N	N	N	N	N	N

Примітки: ІК- інтактний контроль; МП- модельна патологія; ЗК-залишкова кров; N – не виявлено; * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,001$; ^a- по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b- по відношенню до групи “модельна патологія”.

На фоні розвитку типової гострої ниркової недостатності тестовані екстракти характеризувались достовірним збільшенням добового діурезу по відношенню як до групи «модельна патологія», так і групи інтактних тварин (табл. 6.4). Також, при застосуванні всіх екстрактів відмічалась нормалізація кислотності сечі і значення показника pH у цих групах тварин наближалися до нейтрального.

Показники рівнів сечовини, креатиніну та натрію іонізованого в плазмі крові та сечі білих щурів при застосуванні екстрактів на моделі сулемової нефропатії (M±m, n = 8)

Групи/ Показники	Плазма крові			Сеча		
	Сечовина, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л	Na ⁺ , ммоль/л	Сечовина, ммоль/л	Креатинін, ммоль/л	Na ⁺ , ммоль/л
Інтактний контроль	5,4±0,8	43,6±2,9	145,8±1,5	86,3±5,9	12,6±2,3	74,6±3,1
Модельна патологія	10,3±0,3* ^a	101,5±7,0 ^{#a}	152,4±4,1	53,7±6,4* ^a	5,9±1,5* ^a	101,5±4,9 ^{#a}
Леспефрил	7,2±1,0	60,7±4,7 ^{*a#b}	145,3±3,9	71,6±6,9	10,3±1,9	86,2±4,2* ^a
A-2	9,7±0,4* ^a	83,1±8,0 ^{#a}	150,8±6,5	60,7±1,9* ^a	8,0±1,2	98,2±6,4* ^a
A-21	9,5±0,6* ^a	84,4±7,0 ^{#a}	154,1±6,1	63,2±6,1* ^a	7,7±0,6	96,3±7,6* ^a
A-3	8,3±0,8* ^a	94,1±7,4 ^{#a}	155,1±1,8	66,3±3,1* ^a	6,7±1,6* ^a	95,2±3,9* ^a
A-31	8,5±0,3* ^a	93,5±6,1 ^{#a}	146,4±2,8	60,2±7,5* ^a	6,8±6,1* ^a	92,5±3,3* ^a
D-2	9,4±0,2* ^a	88,3±6,9 ^{#a}	150,3±5,2	63,7±8,9* ^a	8,2±1,9	94,7±8,2* ^a
D-21	9,8±0,2* ^a	86,2±5,7 ^{#a}	154,6±3,6	61,5±1,6* ^a	7,9±0,2	92,8±9,1* ^a
D-3	9,1±0,3* ^a	90,9±6,4 ^{#a}	150,1±3,6	74,0±8,1* ^a	7,1±1,3* ^a	91,0±4,4* ^a
D-31	9,2±0,6* ^a	91,7±3,9 ^{#a}	139,4±4,3	66,0±4,0* ^a	6,1±2,7* ^a	92,6±4,7* ^a
P-2	9,3±0,2* ^a	89,6±7,5 ^{#a}	150,1±5,7	63,4±4,6* ^a	7,7±6,7	95,2±5,0* ^a
P-21	9,1±0,8* ^a	88,4±5,7 ^{#a}	153,8±3,4	61,2±5,7* ^a	7,1±0,5	93,4±3,3* ^a
P-3	9,6±0,5* ^a	91,2±8,4 ^{#a}	149,1±4,1	65,3±6,1* ^a	6,2±5,3* ^a	91,9±4,2* ^a
P-31	9,1±0,7* ^a	91,6±3,1 ^{#a}	151,4±0,3	67,2±2,0* ^a	5,9±2,8* ^a	94,5±1,8* ^a

Примітки: * p≤0,05; #p≤0,001; ^a- по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b- по відношенню до групи “модельна патологія”.

Рівні концентрацій креатиніну, сечовини та іонізованого натрію в плазмі крові в групах тварин, що отримували екстракти рослинної сировини і калюсної

біомаси *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. були нижчими по відношенню до рівня групи «модельна патологія», проте вищими по відношенню до групи інтактних тварин. Подібна тенденція для названих показників спостерігалась і в сечі (табл. 6.4).

Отже, в результаті проведених досліджень гіпоазотемічної активності досліджуваних екстрактів на моделі сулемової нефропатії, встановлено, що тестовані екстракти володіють виразним діуретичним ефектом та позитивним впливом на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів - сечовини та креатиніну. При застосуванні досліджуваних екстрактів відмічається динаміка до покращення функції нирок, про що свідчить нормалізація рівнів іонізованого натрію як в плазмі крові, так і сечі дослідних тварин.

6.4. Дослідження протизапальної активності

Для скринінгової оцінки антиексудативної активності екстрактів рослинної сировини і калюсної біомаси *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. використана «карагенінова модель» запального процесу. У механізмі розвитку карагенінового набряку беруть участь різні медіатори запалення: у перші 30–90 хв – переважно серотонін і гістамін, у інтервалі 1,5–2,5 год – кініни, а 2,5–5,5 год – простагландини. Експеримент проведений на білих щурах обох статей вагою 180-220 гр. Запальний набряк у тварин відтворювали субплантарним введенням 0,1 мл 2,0 % розчину карагеніну. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин. Тваринам внутрішньошлунково вводили тестовані екстракти, в дозі 2 мл/кг. Тваринам груп позитивного контролю вводили внутрішньошлунково класичні протизапальні референс-препарати «Диклофенак натрію» та «Кетанов». Методика проведення експерименту наведена у п. 2.3.11.

Узагальнені результати дослідження протизапальної активності наведено в табл. 6.5 та на рис. 6.3 - 6.5.

Результати визначення протизапальної активності отриманих екстрактів та референс-препаратів

Групи/ Показники	Дози	Приріст об'єму задньої кінцівки щура на 4 годину дослід, %	Показник пригнічення запальної реакції, %
Контроль "Модельна патологія"	-	125,5	-
Диклофенак натрію	8,0 мг/кг	70,1	44,1
Кетанов	10,0 мг/кг	79,2	36,9
P-2	2 мл/кг	123,2	1,83
P-21	2 мл/кг	119,8	1,78
P-3	2 мл/кг	91,6	27,0
P-31	2 мл/кг	88,9	26,2
D-2	2 мл/кг	118,6	5,49
D-21	2 мл/кг	116,3	5,38
D-3	2 мл/кг	103,6	17,4
D-31	2 мл/кг	101,4	17,03
A-2	2 мл/кг	134,6	-7,2
A-21	2 мл/кг	130,7	-6,99
A-3	2 мл/кг	121,8	2,9
A-31	2 мл/кг	117,7	2,8

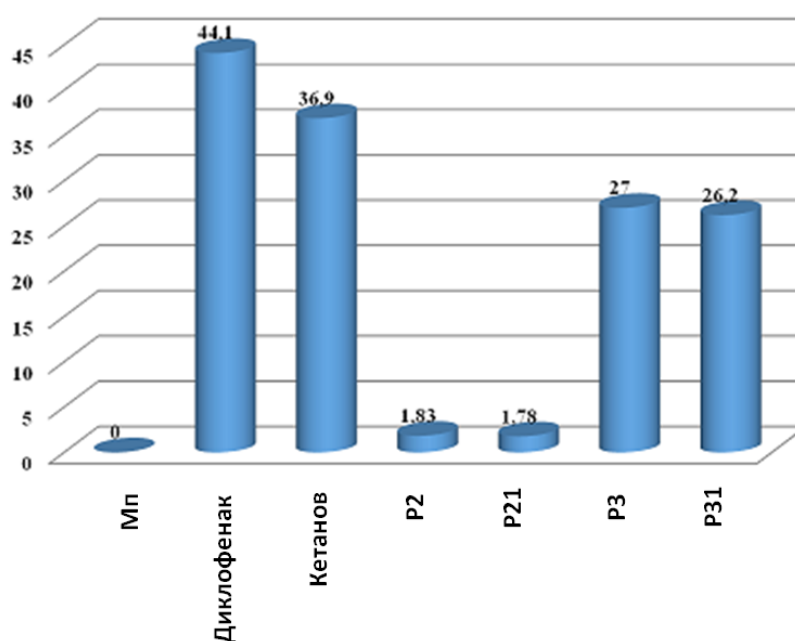


Рис. 6.3. Показник пригнічення Протизапальна активність *Pulsatilla alba*

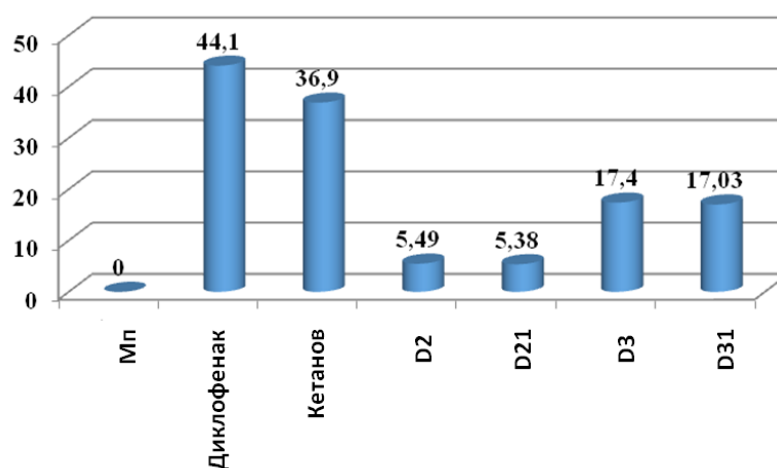


Рис. 6.4. Протизапальна активність *Delphinium elatum* L.

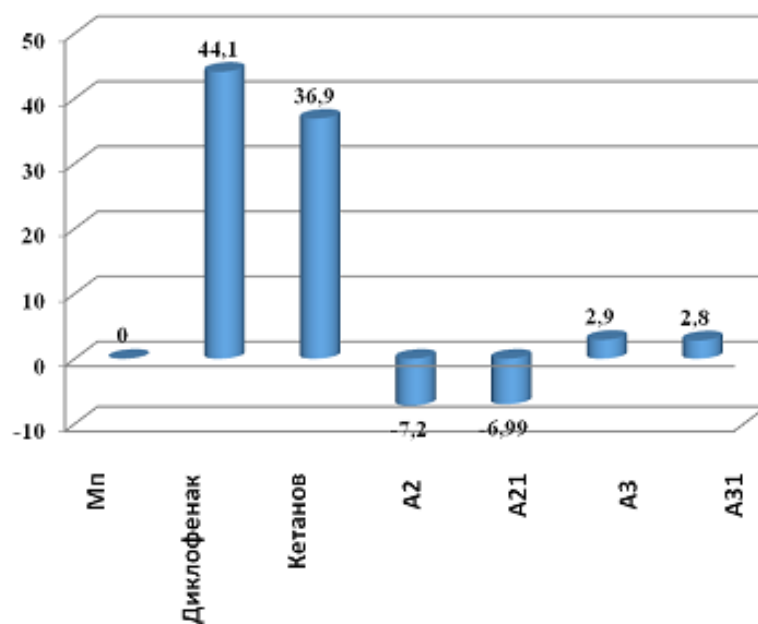


Рис. 6.5. Протизапальна активність *Anemone nemorosa* L.

При аналізі отриманих результатів слід відмітити, що всі тестовані екстракти характеризуються різним впливом на перебіг запального процесу кінцівки лапи білих щурів.

Серед тестованих екстрактів рослинної сировини і калусної біомаси *Pulsatilla alba* найкращий рівень протизапальної активності продемонстрував 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Pulsatilla alba* P-3 та 70 % спиртовий

екстракт (1:20) КБ *Pulsatilla alba* P-31, показник пригнічення запальної реакції якого становив 27 % та 26,2% відповідно, що дещо поступається референс-препаратам (на 10 та 17 % «Кетанов» та «Диклофенак натрію», відповідно), проте є доволі хорошим показником для рослинних протизапальних засобів. Тоді як 40 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Pulsatilla alba* P-2 і 40 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *Pulsatilla alba* P-21 практично не виявили значимого антиексудативного ефекту (показник пригнічення запальної реакції становить 1,83 % і 1,78% відповідно).

Задовільний рівень антиексудативного ефекту також проявили 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Delphinium elatum* L. D-3 та 70 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *Delphinium elatum* L. D-31, які демонструють показник пригнічення запального процесу 17,4 та 17,03 % відповідно, в порівнянні до групи «модельна патологія» та є цікавими і перспективними об'єктами для поглибленого вивчення. Екстракти 40 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Delphinium elatum* L. D-2, 40 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *Delphinium elatum* L. D-21 і 70 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Anemone nemorosa* L. A-3, 70 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *Anemone nemorosa* L. A-31 практично не проявили протизапального ефекту, а 40 % спиртовий екстракт (1:20) ЛРС *Anemone nemorosa* L. A-2 та 40 % спиртовий екстракт (1:20) КБ *Anemone nemorosa* L. A-21 виявили помірний протизапальний ефект на карагеніновій моделі запального набряку кінцівки білих щурів.

6.5. Антиоксидантна активність екстрактів

Дослідження антиоксидантної дії екстрактів з ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. проводили через визначення їх радикал-поглинальної активності. В основі методу – дві відомі реакції: з достатньо стабільним радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилом (DPPH) та катіон-радикалом 2,2'-азино-біс(3-етиленбензтіазолін-6-сульфокислоти) (ABTS). Методику проведення експерименту наведено у п. 2.3.7.

Результати дослідження антиоксидантної дії узагальнені в табл. 6.6.

**Показники антиоксидантної активності екстрактів
з ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba*
Reichenb. за двома маркерами окислювального стресу**

№ з/п	Досліджуваний екстракт	Антиоксидантна активність, % (DPPH) $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n = 5$	Антиоксидантна активність, % (ABTS) $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}, n = 5$
1.	A-2	23,6118 ± 0,3	82,1507 ± 0,3
2.	A-21	28,1465 ± 0,3	83,9196 ± 0,3
3.	A-3	27,7366 ± 0,3	83,1401 ± 0,3
4.	A-31	24,6298 ± 0,3	79,1325 ± 0,3
5.	P-2	23,6118 ± 0,3	82,1507 ± 0,3
6.	P-21	24,6298 ± 0,3	79,1325 ± 0,3
7.	P-3	28,1465 ± 0,3	83,9196 ± 0,3
8.	P-31	27,7366 ± 0,3	83,1401 ± 0,3
9.	D-2	65,8105 ± 0,3	86,5204 ± 0,3
10.	D-21	44,5733 ± 0,3	88,9583 ± 0,3
11.	D-3	77,1637 ± 0,3	87,2406 ± 0,3
12.	D-31	74,3454 ± 0,3	89,4168 ± 0,3

Всі досліджувані екстракти мають антиоксидантні властивості, оскільки їх дія проявлялась у зниженні маркерів радикал поглинальної активності.

6.6. Вивчення протимікробної та протигрибкової активності

Протимікробну та протигрибкову дію екстрактів ЛРС надземних, підземних органів та екстрактів КБ анемони дібрової (*A. nemorosa* L.), сну білого (*P. alba* Reichenb.), дельфінію високого (*D. elatum* L.) визначали методами дифузії в агар та серійних розведень, використовуючи 10 референс-культур та 4 клінічні ізоляти мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з

інфекціями, пов'язаними з наданням медичної допомоги. Як референс-культури були вибрані: *Staphylococcus aureus* ATCC 26923 (F-49), *Staphylococcus epidermidis* 191, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus licheniformis* ВКПМ-7038, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Candida albicans* ATCC 885/653, *Candida albicans* ATCC 668-853; клінічні ізоляти: *Staphylococcus aureus* № 142, *Escherichia coli* №5, *Proteus vulgaris* 165, *Candida albicans* №60, *Candida membranifaciens* 117.

Всі клінічні ізоляти були полірезистентними до антибіотиків (multiple drug resistance (MDR)), відповідно до Європейських рекомендації критеріїв оцінки ступеню антибіотикорезистентності, з музею культур збудників інфекційних хвороб кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. *Candida albicans*, резистентних до ністатину (*nis*) та *Candida non-albicans*, резистентних до азолів (кетоконазол - *ket*).

Результати досліджень протимікробної та протигрибкової дії наведено в табл. 3.1-3.9, дод. 3.

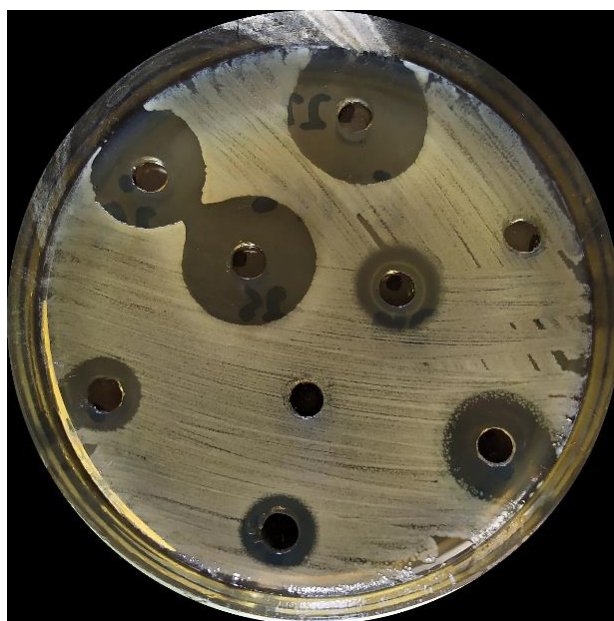


Рис. 6.6. Протимікробна дія екстрактів ЛРС та КБ *D.elatum* щодо музейної культури *E.coli*, метод дифузії в агар.



Рис. 6.7. Протигрибкова дія екстрактів ЛРС та КБ *P.alba* щодо клінічної культури *C.albicans*, метод дифузії в агар.



Рис. 6.8. Протигрибкова дія екстрактів ЛРС та КБ *D.elatum* щодо клінічної культури *C.albicans*, метод дифузії в агар.

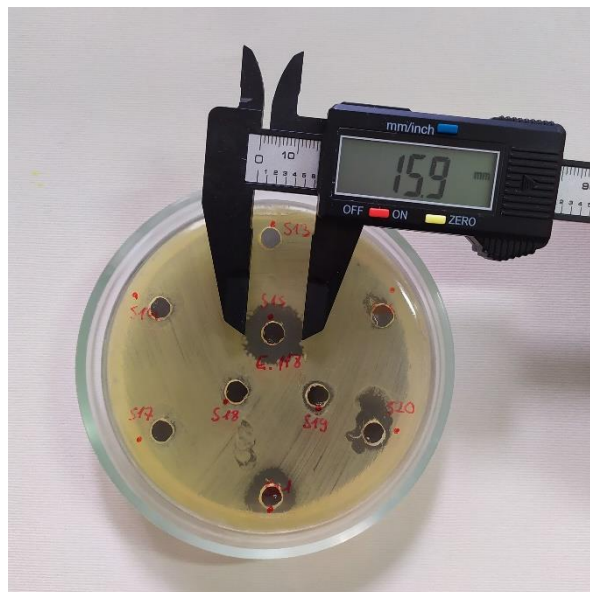


Рис. 6.9. Протигрибкова дія екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L. щодо музейної культури *St. aureus*, метод дифузії в агар.

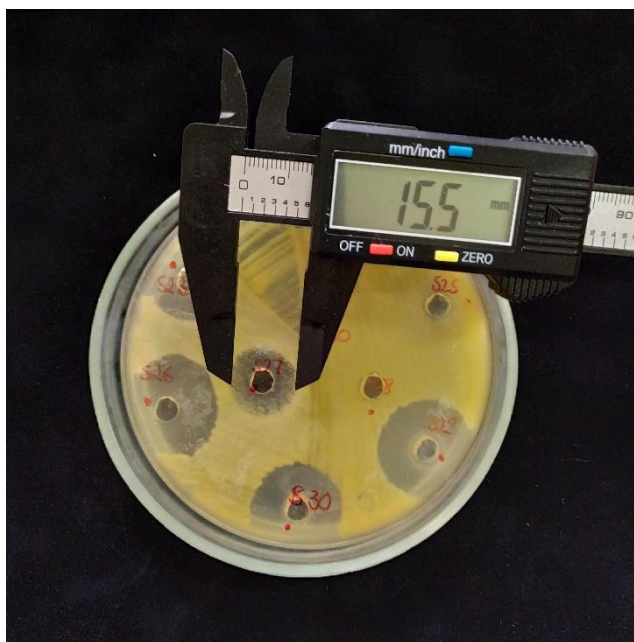


Рис. 6.10. Протигрибкова дія екстрактів ЛРС та КБ *D. elatum* щодо музейної культури *St. aureus*, метод дифузії в агар.

Екстракти ЛРС та КБ *D. elatum* L. проявили активність щодо мікроорганізмів. Найбільшу активність щодо Грам позитивних мікроорганізмів (музейні та клінічний штам стафілококів), в концентрації 90 % та 70 %, більш активними були 90 % екстракти (табл. 3.1, дод.3, табл. 3.3, дод. 3). Також 90 %, 70 % та 40 % екстракти ЛРС та КБ *D. elatum* L. проявили протигрибкову дію щодо музейних та клінічних штамів грибків роду *Candida* (табл. 3.2, дод. 3). Найкращу протигрибкову дію по відношенню до контролю проявили 40 % та 70 % екстракти. При застосуванні методу серійних розведень встановлено, що більшість досліджуваних 90 % та 70 % екстрактів ЛРС і КБ у розведенні 1:1 володіють бактерицидною дією. Екстракти КБ 90 %, на відміну від екстрактів ЛРС, проявили бактерицидну дію в розведенні 1:2 щодо музейних штамів стафілококів (табл. 3.3, дод. 3).

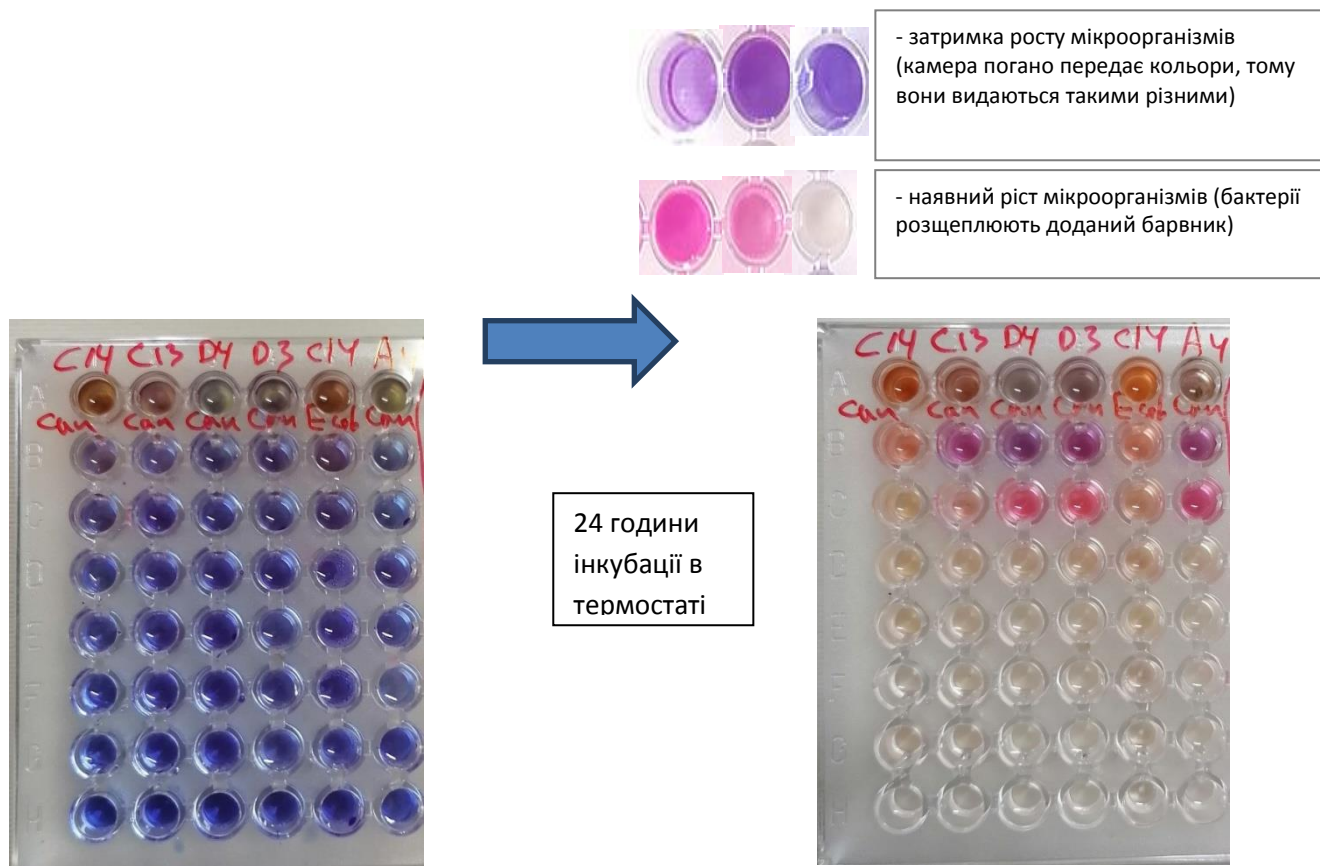


Рис. 6.11. Протигрибкова дія екстрактів ЛРС та КБ *D. elatum* та *P. alba* щодо музейної культури *C. albicans* та *E. coli*, метод серійних розведень в планшетах.

Екстракти ЛРС та КБ *P. alba* проявили активність щодо Грам негативних мікроорганізмів, зокрема щодо музейних та клінічних штамів *Escherichia coli*, музейного штаму *Bacillus licheniformis* та клінічного штаму *Proteus vulgaris* (табл. 3.4, дод. 3, табл. 3.6, дод. 3) в концентрації 90 % та 70 %. Більшою мірою були активні 90 % екстракти. Також 40 % екстракт проявив дію щодо музейного штаму *Bacillus licheniformis*. Також 90 %, 70 % та 40 % екстракти ЛРС та КБ *P. alba* проявили протигрибкову дію щодо музейних та клінічних штамів грибків роду *Candida* (табл. 3.5, дод. 3). Найкращу протигрибкову дію по відношенню до контролю проявили 70 % екстракти. При застосуванні методу серійних розведень встановлено, що найкращу бактеріостатичну дію щодо *Bacillus*

licheniformis проявили 90 % екстракти ЛРС і КБ у розведенні 1:4 (табл. 3.6, дод. 3).

Екстракти ЛРС та КБ *A. nemorosa* L. не проявили вираженої протимікробної дії (табл. 3.7, дод. 3, табл. 3.9, дод. 3). Натомість 40 % та 90 % екстракти проявили протигрибкову дію в порівнянні з контролем (табл. 3.8, дод. 3). При застосуванні методу серійних розведень встановлено, що найкращу бактеріостатичну дію проявили 90 % та 40 % екстракти ЛРС і КБ у розведенні 1:2 щодо музейних штамів грибків роду *Candida* (табл. 3.9, дод. 3).

Таким чином, досліджувані екстракти ЛРС і КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. мають протимікробні та протигрибкові активності. Екстракти КБ 90 % *D. elatum* L. проявили кращу бактерицидну дію, ніж екстракти ЛРС.

Проведені мікробіологічні дослідження екстрактів ЛРС та КБ *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. та *A. nemorosa* L. за допомогою методу дифузії в агар та методом серійних розведень щодо ряду стандартних та клінічних штамів мікроорганізмів. Найбільш виражену за кількісними показниками протимікробну дію проявили екстракти КБ та ЛРС *D. elatum*. Встановлено, що кращу протигрибкову дію щодо дріжджових грибків *Candida albicans* мають 70 % екстракти *D. elatum*. Як для референтних, так і для клінічних штамів зафіксовано рівнозначну ефективність екстрактів КБ вищевказаних рослин та екстрактів ЛРС.

6.7. Вивчення антитромботичної активності

Дослідження впливу синтезованих сполук на агрегацію тромбоцитів проводили у ННЦ Інституту біології Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Активація та агрегація тромбоцитів напряму пов'язана із ініціюванням та розвитком ішемічної хвороби. Досліджували інгібувальну дію екстрактів ЛРС і КБ *A. nemorosa* L. (A2,

A21 і A3, A31), *D. elatum* L. (D2, D21 і D3, D31), *P. alba* (P2, P21 і P3, P31), на агрегацію тромбоцитів. Кров для досліджень отримували з вушної артерії кроля та інкубували плазму із тестованими екстрактами за методикою наведеною у п. 2.3.10.

Результати наведені у табл. 6.7.

Таблиця 6.7

Ступінь агрегації тромбоцитів при інгібуванні АДФ-залежної агрегації екстрактами ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba*

Досліджуваний екстракт	Конц. р-н (100 мг/мл)	Розв. в 2 рази (50 мг/мл)	Розв. в 5 разів (20 мг/мл)
Контроль	100 %	100 %	100%
A-2	27%	19 %	11 %
A-21	18 %	5 %	3 %
A-3	33 %	25 %	14 %
A-31	31 %	24 %	4 %
P-2	24 %	19 %	10 %
P-21	20 %	18 %	2 %
P-3	37 %	25 %	14 %
P-31	35 %	22 %	5 %
D-2	16 %	не активний	не активний
D-21	14 %	не активний	не активний
D-3	38 %	28 %	9 %
D-31	26 %	15 %	12 %

У табл. 6.7 кольором виділені найбільш активні зразки (які при розведенні у 2 рази інгібували АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів не менше ніж на половину). Таким чином за результатами досліджу кращу

антитромботичну активність мали екстракти А-3, А-31, Р-2, Р-21, Р-3, Р-31, екстракти з ЛРС та КБ *D. elatum* L. такої активності не проявили.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 6

1. Результати дослідження гострої токсичності екстрактів рослинної сировини і калюсної біомаси *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. свідчать про відсутність будь-яких токсичних проявів при внутрішньошлунковому введенні в дозах 5000, 10000 та 15000 мг/кг на білих щурах, що дозволяє віднести їх до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини).

2. Усі тестовані екстракти чинять діуретичний ефект та мають позитивний вплив на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів сечовини та креатиніну. При застосуванні тестованих екстрактів відмічається динаміка до покращення функції нирок, про що свідчить нормалізація рівнів іонізованого натрію як в плазмі крові так і сечі дослідних тварин.

3. Серед тестованих екстрактів ЛРС і КБ *P. alba* найкращий рівень протизапальної активності мали зразки С-3 та С-31, показники пригнічення запальної реакції яких становили 27 % та 26,2 % відповідно, що дещо поступається референс-препаратам (на 10 % та 17 % активності кетанову та диклофенаку натрію відповідно), проте є доволі хорошим показником для рослинних протизапальних засобів. Задовільний рівень антиексудативного ефекту також проявили екстракти *D. elatum* L. D-3 та D-31, які мають показники пригнічення запального процесу 17,4 та 17,03 % відповідно.

4. Найкращий результат антитромботичної активності показали екстракти А-3, А-31, С-2, С-21, С-3, С-31, які при розведенні у 2 рази інгібували АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів не менше ніж на половину.

5. На підставі вивчення гепатопротекторної дії екстрактів ЛРС і КБ *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* в експериментах *in vivo* на моделі тетрахлорметанового гострого токсичного гепатозу встановлено що екстракти А-2, А-21, D-2, D-21, D-3, D-31 не проявили гепатопротекторного ефекту, тоді як, екстракти А-3, А-31, С-2, С-21, С-3, С-31 виявляли помірні гепатопротекторні властивості та частково сприяли нормалізації функції печінки і могли б бути ефективним в якості профілактичного лікарського засобу для тривалого застосування при токсичних ураженнях.

6. Досліджено гіпоазотемічну активність екстрактів КБ і ЛРС *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. Встановлено, що тестовані екстракти володіють виразним діуретичним ефектом та позитивним впливом на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів сечовини та креатиніну. При застосуванні тестованих екстрактів відмічено динаміку до покращення функції нирок, про що свідчить нормалізація рівнів іонізованого натрію як в плазмі крові, так і в сечі дослідних тварин.

7. При проведенні дослідження радикал-поглинальної активності екстрактів ЛРС і КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. встановлено, що найбільшу ступінь інактивації ДФПГ проявляють 40 % спиртові екстракти екстракти *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* та екстракти *Anemone nemosa* виготовлені з використанням 70 % етанолу. Встановлено також їх антиоксидантна активність.

8. Вивчено протимікробну та протигрибкову активність екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. на 10 референс-культурах та 4 клінічних ізолятах мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з інфекціями пов'язаними з наданням медичної допомоги. Відповідно до кількісних показників результатів дослідження найбільш виражену протимікробну дію проявили екстракти КБ та ЛРС *D. elatum* L.

Встановлено, що кращу протигрибкову дію проявили 70 % екстракти ЛРС та КБ *D. elatum* L. та *P. alba*.

9. Вивчили інгібуючу дію досліджуваних екстрактів на агрегацію тромбоцитів. Найкращий результат антитромботичної активності показали екстракти *A. nemorosa* L. та *P. alba*, які при розведенні у 2 рази інгібували АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів не менше ніж на половину.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено дані з узагальнення експериментальних досліджень по вирішенню наукової задачі, що полягала в одержанні біологічно активних речовин з введених в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., комплексному фітохімічному дослідженні ЛРС та КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., якісному та кількісному порівняльному аналізу вмісту основних БАР та визначенні їх фармакологічної дії та біологічної активності.

1. Встановлено, що оптимальним середовищем для культивування калюсної біомаси *A. nemorosa* є ЖС МС, доповнене регуляторами росту: 1,0 мг/л ІОК, 0,2 мг/л НОК, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кінетину; для культивування калюсної біомаси *D. elatum* є ЖС МС, доповнене регуляторами росту: 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК, 0,5 мг/л кінетину; для культивування калюсної біомаси *P. alba* є ЖС МС, доповнене регуляторами росту: 4,0 мг/л НОК і 1,0 мг/л кінетину. Встановлено, що приріст калюсної біомаси залежав від співвідношення і концентрації регуляторів росту і типу експланту та становив для *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. 35 г, 94 г та 68 г сухої речовини на 1 л живильного середовища відповідно.

2. Встановлено, що оптимальними умовами для виділення комплексу БАР з ЛРС та КБ *Anemone nemorosa* L. є екстракція подрібненої сировини (ЛРС, КБ) 40% етиловим спиртом протягом 90 хв, оптимальне співвідношення між сировиною та екстрагентом є 1:20; з ЛРС та КБ *Delphinium elatum* - екстракція 40% етиловим спиртом протягом 90 хв, оптимальне співвідношення між сировиною та екстрагентом є 1:20; з ЛРС та КБ *Pulsatilla alba* - екстракція 70 % етиловим спиртом протягом 120 хв, співвідношення сировина:екстрагент - 1:10.

3. Здійснено дослідження з виявлення та визначення кількісного вмісту основних груп БАР у ЛРС і КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. Встановлено наявність у ЛРС і КБ фенольних сполук, флавоноїдів, дубильних речовин, гідроксикоричних кислот, гідрохінонпохідних, алкалоїдів, антоціанів. Хромонів, кумаринів, сапонінів у досліджуваних об'єктах не виявлено.

4. Проведено порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у екстрактах КБ та ЛРС методами ГРХ, ВЕРХ та ТШХ. За результатами ТШХ в екстрактах ЛРС і КБ *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* ідентифіковані в екстрактах КБ сполуки є такими ж, як сполуки в екстрактах ЛРС. Методом ВЕРХ у екстрактах КБ та ЛРС *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. визначено практично рівноцінний якісний і кількісний вміст сполук фенольного характеру, що потенційно дозволяє вважати КБ альтернативною сировиною для одержання БАР.

5. Досліджено компонентний склад легкої фракції екстрактів ЛРС та КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. та проведено їх порівняльний аналіз. Вміст виявлених речовин в екстрактах КБ *Anemone nemorosa* L. (ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени) є достатнім та практично рівноцінним з вмістом виявлених БАР в екстрактах ЛРС, що дозволяє використання КБ як сировини для одержання БАР. Визначені речовини в екстрактах КБ та ЛРС *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* є в достатній кількості, проте відрізняються за компонентним складом.

6. Вивчено гостру токсичність екстрактів рослинної сировини і калусної біомаси *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. Встановлено відсутність будь яких токсичних проявів, що дозволяє їх віднести до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини).

7. На підставі вивчення гепатопротекторної дії екстрактів ЛРС і КБ *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* в експериментах *in vivo* на моделі тетрахлорметанового гострого токсичного гепатозу встановлено що 40% екстракти ЛРС і КБ *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum* не проявили гепатопротекторного ефекту, тоді як 70% екстракти ЛРС і КБ *Anemone nemorosa*, *Pulsatilla alba* виявляли помірні гепатопротекторні властивості та частково сприяли нормалізації функції печінки.

8. Досліджено гіпоазотемічну активність екстрактів КБ і ЛРС *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*. Встановлено виразнимий діуретичний ефект та позитивний вплив на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів сечовини та креатиніну. Спостерігалася динаміка до покращення функції нирок, про що свідчить нормалізація рівнів іонізованого натрію як в плазмі крові так і в сечі дослідних тварин.

9. Досліджено антиексудативні активності екстрактів КБ та ЛРС *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* на “карагеніновій моделі” запального процесу у білих щурів. Встановлено, що найкращий рівень протизапальної активності продемонстрували 70 % спиртові екстракти КБ та ЛРС *Pulsatilla alba*, показник пригнічення запальної реакції якого становив 26,2 % та 27 % відповідно, що дещо поступається референс-препаратам (на 17 % та 10 % кетанов та диклофенаку натрію, відповідно). Задовільний рівень антиексудативного ефекту також проявили екстракти КБ та ЛРС *Delphinium elatum*. Екстракти 70% КБ та ЛРС *Anemone nemorosa* практично не проявили протизапального ефекту.

10. Вивчено протимікробну та протигрибкову активність екстрактів лікарської рослинної сировини та калюсної біомаси *Anemone nemosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*. Встановлено, що найбільш виражену протимікробну дію на 10 референс-культурах та 4 клінічних ізолятах

мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з інфекціями пов'язаними з наданням медичної допомоги, проявили екстракти КБ та ЛРС *Delphinium elatum*. Кращу протигрибкову дію проявили 70 % екстракти ЛРС та КБ *Pulsatilla alba* та *Delphinium elatum*. Загалом, як для референтних, так і для клінічних штамів зафіксовано рівнозначну ефективність екстрактів КБ вищевказаних рослин та екстрактів ЛРС. Досліджувані екстракти ЛРС і КБ *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* та *Anemone nemorosa* мають протимікробні та протигрибкові властивості в однаковій мірі.

11. Вивчили інгібуючу дію досліджуваних екстрактів на агрегацію тромбоцитів. Встановлено, що найкращий результат антитромботичної активності показали екстракти *Anemone nemorosa*, *Pulsatilla alba*, які при розведенні у 2 рази інгібували АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів не менше ніж на половину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Агапова Н. Д. Семейство лютиковые (Ranunculaceae) / *Жизнь растений*. М., Т. 5, 1980.
2. Алтея лікарська, анемона дібровна, анемона лісова: опис рослин. Реферат. Видавництво «Плеяди». 2012. – Режим доступу до ресурсу: Osvita.ua.
3. Бабенко Л. М., Смірнов О. Є., Романенко К. О. Фенольні сполуки рослин: біогенез та функції. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019; Том 91, № 3. С. 5-18.
4. Березина Е. В., Брилкина А. А., Щурова А. В., Веселов А. П. Накопление биомассы и фенольных соединений каллусами *Oxycoccus palustris* Pers. и *O. macrocarpus* (Ait.) Pers. в присутствии разных цитокининов. *Физиология растений*. 2019. Т. 66. № 1. С. 35-45.
5. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. Новосибирск: Наука, Сиб. от-ние, 1990. 333 с.
6. Біоактивність неорганічних сполук: навч. посібн. для аудит. та самост. роботи студентів / за ред. Є. Я. Левітіна. Х. : НФаУ, 2017. 83 с.
7. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: методичні рекомендації / О. Г. Резніков, А. І. Соловйов, Н. В. Добреля, О. В. Стефанік. К. : Інститут фармакології і токсикології АМН України, Державний фармакологічний Центр МОЗ України, 2016. 28 с.
8. Бобкова І. А., Варлахова Л. В. Фармакогнозія. К. : Медицина, 2010. С. 58-68.
9. Бутенко Р. Г. Культура ізольованих тканин та фізіологія морфогенезу рослин. М. : Наука, 1964. 272 с.

10. Введення в культуру *in vitro* *Delphinium elatum* та перспективи використання калусної біомаси в гомеопатії / С. В. Гриців, Ю. І. Колб, О. С. Хропот, Р. Т. Конечна. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*. 2017. Том 2. С. 58–61.
11. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) / О. С. Хропот, Ю. Т. Конечний, Ю. І. Колб, Р. Т. Конечна. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 2 (50). С. 60–66.
12. Визначник рослин України / за ред. Д. Жертва. К. : Урожай, 1965. 878 с.
13. Визначник рослин Українських Карпат / за ред. В. І. Сорока. К. : Наукова думка, 1977. 434 с.
14. Воллосович А. Г. Культура ізольованих тканин і клітин рослин. М. : Наука, 1970. С. 234–235.
15. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / под ред. Е. А. Краснова. Томск: Изд-во Томского университета, 1987. 434 с.
16. Гарбарець Н. М., Гарбарець М. О. Словник наукових і народних назв лікарських рослин України: довідник. Тернопіль : Навчальна книга - Богдан, 2012. 80 с.
17. Гоженко А. І., Федорук О. С., Погоріла І.В. Вплив аргініну на функціональний стан нирок щурів при сулемовій нефропатії. *Фізіологічний журнал*. 2002. Т. 48 (6). С. 26-30.
18. Гризодуб А. И., Евтиева О. А., Проскурина К. И. Особенности фармакопейных подходов к количественному определению лекарственного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов. *Фармаком*. 2012. №3. С. 7-31.

19. Грицик А. Р., Водославський В. М., Мельник М. В. Фармакогнозія і ресурствознавство лікарських рослин: навчальний посібник. Івано-Франківськ: ПП Голіней, 2017. 228 с.

20. Гродзінський А.М. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. К. : Видавництво «Українська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, 1992. 544 с.

21. Денисенко Т. А., Вишнікин А. Б., Цыганок Л. П. Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями. *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19, № 3. С. 242-251.

22. Державна Фармакопея України. 2-е вид. в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х., 2015. Т. 1. 1128 с.

23. Державна Фармакопея України. 2-е вид. в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х., 2014. Т. 2. 690 с.

24. Державна Фармакопея України. 2-е вид. в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х., 2014. Т. 3. 732 с.

25. Державна Фармакопея України. Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид., допов. 2. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х., 2018. 336с.

26. Державна Фармакопея України. ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 1-е вид., 4 допов. Х. : Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. 540 с.

27. Дідух Ю. О., Маховська Л. Й. Біоекологічні особливості представників родини Ranunculaceae Juss. у флорі Надвірнянського району

Івано-Франківської області. Збірник наукових праць з актуальних проблем економічних наук м. Запоріжжя, 29-30 листопада 2019 р. С. 136-139.

28. Дідух Я. П., Бурда Р. І., Зиман С. М. Екофлора України. Том 2 / за заг. ред. Я.П. Дідуха. К. : Фітосоціоцентр, 2004. 480 с.

29. Дідух Я. П., Шеляг-Сосонко Ю. Р. Геоботанічне районування України та суміжних територій. *Український ботанічний журнал*. 2003. Т. 60, №1. С. 6-11.

30. Доброчаєва Д. Н., Котов М. И., Прокудин Ю. Н. Определитель высших растений Украины. К. : Наукова думка, 1987. 548 с.

31. Довідник назв рослин України. URL: <http://econtsh.astra.in.ua/system.php?lang=ua>

32. Доклінічні дослідження безпеки як підґрунтя клінічних випробовувань за участю людини та реєстрації лікарських засобів: настанова СТ-Н МОЗУ 42 – 6.0. *Офіційний вісник України*. 2014. № 4. 47 с.

33. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. К. : Авіцена, 2002. 528 с.

34. Доровський О.В., Олійник А.Д. Фармацевтична промисловість України: сучасний стан та напрями стратегічного розвитку. *Науковий вісник Херсонського державного університету. Сер.: Економічні науки*. 2014. № 7 (4). С. 75-78.

35. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту з листя брусниці звичайної / М. А. Комісаренко, А. С. Гейдерих, А. М. Ковальова, О. М. Кошовий. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2012. Т. 7, №2. С. 24-26.

36. Дячок В. В., Запорожець Ю. В. Про механізм масообміну з тілами клітинної будови. *Харчова промисловість*. 2017. № 22. С. 85-92.

37. Дячок В. В., Запорожець Ю. В., Гуглич С. І. Розроблення екологічно безпечної технології одержання фізіологічно-активних сполук

методом екстрагування рослинної сировини. *Наукові праці ОНАХТ*. Одеса, 2016. Вип. 47., Т. 1. С. 98-103.

38. Евдокимов И. Ю. Молекулярная филогения семейства Ranunculaceae на основе *rbcl* и *trnl-f* последовательностей хлоропластной ДНК. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*: сб. науч. статей по материалам XVI междун. науч.-практ. конф. Барнаул, 2017. С. 240–245.

39. Евдокимов И. Ю. Обзор систем семейства Ranunculaceae Juss. в хронологической последовательности. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*: сб. науч. статей по материалам XIV междун. науч.-практ. конф. Барнаул, 2015. С. 140–144.

40. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В. М. Коваленко, О. В. Стефанов, Ю. М. Максимов, І. М. Трахтенберг. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. К. : Авіцена, 2001. С. 74-97.

41. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2003. № 2 (22). С. 108—109.

42. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Офіційний переклад. Страсбург, 1986. URL: http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/994_137

43. Землинский С. Е. Лекарственные растения СССР. Москва: изд. Московского общества испытателей природы, 1952. 507 с.

44. Зиман С. М., Мосякін С. Л., Булах О. В., Царенко О. М. Ілюстрований довідник з морфології квіткових рослин: Навчально-методичний посібник. Ужгород: Медіум, 2004. 156 с.

45. Зиман С. Н. Морфология и филогения семейства лютиковых. К. : Наукова думка, 1985. 248 с.

46. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. К. : Наукова думка. 1992, 43 с.
47. Каталог декоративних трав'янистих рослин отанічних садів і дендропарків України: довідниковий посібник / за ред. С. П. Машковської. К., 2015. 282 с.
48. Кількісне визначення органічних кислот у траві *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / Н. Є. Бурда, О. І. Журавель, В. С. Кисличенко, В. Б. Демьохін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2010. №1(6). С. 59-61.
49. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т. І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: підручник для студентів вищих фармацевтичних навчальних закладів та фармацевтичних факультетів вищих медичних навчальних закладів III—IV рівнів акредитації. 2-ге вид. Х. : НФаУ, МТК-книга. 2004 704 с.
50. Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайретдінова Г.А. Науково - практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. К. : Видавн. дім «Авіцена». 2002. 155 с.
51. Комендар В. І. Лікарські рослини Карпат. Дикорослі та культурні / за ред. Козоріз О. Ужгород: Мистецька Лінія, 2007. 499 с.
52. Крвавич А. С., Петріна Р. О., Новіков В. П. Розробка технологічного процесу одержання біологічно активних сполук з калусної культури лікарських рослин. *Наукові вісті Національного технічного університету України "КПІ"*. 2015. № 12. С. 1976–1978.
53. Круглова Н. Н., Титова Г. Е., Сельдимирова О. А. Каллусогенез как путь морфогенеза in vitro у злаков. *Онтогенез*. 2018. Т. 49. № 5. С. 273–288.
54. Кунах В. А.. Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини. *Біотехнологія*. Т. 1, №1. 2008. С.24-39.

55. Курта С. А. Природні вуглеводи та полісахариди: навчальний посібник. Івано-Франківськ: Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, 2012. 100 с.

56. Куцик Р. В. Скринінгове дослідження протимікробної активності лікарських рослин Прикарпаття відносно поліантибіотикорезистентних клінічних штамів стафілококів. Повідомлення 1. *Галицький лікарський вісник*. 2004. Т.11. №4. С. 44-48.

57. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. К. : Вища школа. Головне видавництво, 1983. 383 с.

58. Литвинова Н. В. Экологический потенциал инновационного производства фитопрепаратов. *Ліки України*. 2009. №7. С. 28-30.

59. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: навч. посіб. з фармакогнозії з основами біохімії лікарських рослин / Н. М. Солодовниченко, М. С. Журавльов, В. М. Ковальов, В. С. Кисличенко. Х. : Вид-во НФаУ, Золотые страницы, 2010. 418 с.

60. Лікарські рослини Карпат. Дикорослі та культурні. Третє видання, доповнене і перероблене / за ред. О.Козоріз. Ужгород: Мистецька Лінія, 2007. 504с.

61. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Ред. А. М. Гродзінський. К. : «Українська Енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. 544 с.

62. Лужников Е.А. Клиническая токсикология: учебник. М. : Медицина, 1994. 256 с.

63. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечний Ю. Т. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд. *Наукове сходження: Фармацевтичні науки*. 2017. Том 3 (7). С. 38–42.

64. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemona nemorosa*. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. 2017. Том 3. С. 171–173.
65. Матеріали XIV з'їзду Українського ботанічного товариства, м. Київ, 25–26 квітня 2017 р. К., 2017. 225 с.
66. Меженський В.М., Меженська Л.О. Сучасна систематика квіткових рослин. К. : Вид-во Ліра-К, 2020. 558 с.
67. Митрофанова И. В., Митрофанова О. В., Корзина Н. В., Лесникова-Седошенко Н. П. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза in vitro представителей семейств *Ranunculaceae*, *Cannaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Actinidiaceae*. Сб. научн. трудов ГНБС. 2014. Том 138. С.102-136.
68. Мінарченко В. М. Державний кадастр рослинного світу. Збереження і стале використання біорізноманіття України: стан, перспективи та заходи вдосконалення. К.: Фітосоціоцентр, 2003. С. 147-152.
69. Мінарченко В. М., Бутко А. Ю. Дослідження вітчизняного ринку лікарських засобів рослинного походження. *Фармацевтичний журнал*. 2017. № 1. С. 30-36.
70. Накопление биомассы и фенольных соединений каллусами *Oxycoccus palustris* Pers. и *O. macrocarpus* (Ait.) Pers. в присутствии разных цитокининов / Е. В. Березина, А. А. Брилкина, А. В. Щурова, А. П. Веселов. *Физиология растений*. 2019. Т. 66. № 1. С. 35-45.
71. Настанова: Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012.
72. Новіков А.В. *Ranunculaceae* Західної України. II. Ключ і характеристика родів *Modern Phytomorphology* 8. 2015. С.169–182.
73. Носаль І. Від рослини – до людини. К. : Веселка, 1993. 606 с

74. Одержання та дослідження калюсної маси *Delphinium elatum* / О. Хропот, Є. Базавлук, Р. Конечна, І. Губицька. *Фармацевтичний часопис*. 2020. №2. С. 5–15.

75. Олейнікова О. М. Садові декоративні рослини. Х. : Веста, 2010. 144 с.

76. Ольхович С. Я., Паляничко Н.І., Крохтяк О.В. Аналіз ринку лікарських препаратів на основі сировини рослинного походження в Україні. *Економіка природокористування та охорони навколишнього середовища*. 2019. № 4 (72). С. 136-141.

77. Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України (довідкове видання) / укладачі: Т.Л. Андрієнко, М.М. Перегрим. К. : Альтерпрес, 2012. 148 с.

78. Паращук Е. А., Марчишин С. М., Кирилів М. В., Бекус І. Р. Вміст кислот гідроксикоричних у траві та кореневищах і коренях бедринцю ломикаменевого (*Pimpinella saxifraga* L.). *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, №3. С.90-95.

79. Положення про Комітет з питань етики (біоетики): наказ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України від 19.11.2012 № 1287. URL: <http://www.mon.gov.ua/ua/activity/63/64/normativno-pravova-baza>

80. Порядок проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ Міністерства охорони здоров'я України від 14.12.2009 № 944. *Офіційний вісник України*. 2010 . № 4. С. 61.

81. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. *Офіційний вісник України*. Офіц. вид., 2012 р. №24. С. 82. (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 01.03.2012 №249).

82. Про ветеринарну медицину: Закон України від 25.06.1992 р. №2498-ХІІ. *Відомості Верховної Ради України*. 1992. №36. Ст. 531.

Поточна редакція від 16.10.2020. URL:
<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2498-12#Text>

83. Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах: наказ Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 р. №249. *Офіційний вісник України*. №24. С. 82.

84. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 21.02.2006 р. № 3447-IV. *Відомості Верховної Ради України*. 2006. № 27. Ст. 230. Поточна редакція від 13.02.2020 р. URL:
<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>

85. Проєкт Переліку видів рослин та грибів, що заносяться до Червоної книги України (рослинний світ). Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України. <https://mepr.gov.ua/news/32529.html>

86. Решетников В. Н. Научные и практические аспекты развития биотехнологии растений в республике Беларусь. Научно-аналитический доклад. *Вестник фармации*. 2012. №3 (57). С. 71-77.

87. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Биотехнология растений и перспективы ее развития. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46. № 1. С. 3-18.

88. Рослинний світ. Ресурси дикорослих лікарських рослин України. <http://nature.org.ua/nr98/ukrvers/pressure/flora/flora3.htm>

89. Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганапольский В. П. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017. Т. 15. № 2. С. 56–63.

90. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин : навч. посібн. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.

91. Сербін А. Г., Сіра Л. М., Слободянюк Т. О. Фармацевтична ботаніка : підруч. для вузів / за ред. Л. М. Сірої. Вінниця : Нова Книга, 2015. 488 с.

92. Сидякин А. И., Бугара А. М. Особенности ростовых характеристик каллусных культур ломоноса виноградолистного при культивировании на питательных средах различающихся по составу. *Биология: от молекулы до биосферы* : материалы III международной конференции молодых ученых (Харьков, 18-21 ноября 2008 г.). Х., 2008. С. 254-255.

93. Степанов Н. В. Новый вид *Trollius* L. (Ranunculaceae) из Кузнецкого Алатау. *Систематические заметки*. 2018. № 117. С. 40–45.

94. СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) / М. Ляпунов, О. Безугла, Ю. Підпружников та ін. К. : МОЗ України, 2011. 42 с.

95. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016. Лікарські засоби. Належна виробнича практика / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов. К. : МОЗ України, 2016. 30 с.

96. СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична система якості (ICH Q10) / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов. К. : МОЗ України, 2011. 30 с.

97. Суина И. О., Тернинко И. И. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья *Aristolochia Clematitis* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 1 Аналитические методики и методы контроля. 2017. № 4. С.202-205.

98. Фіторізноманіття заповідників і національних природних парків України. Ч. 1. Біосферні заповідники. Природні заповідники / за ред. В. А. Онищенко, Т. Л. Андрієнко. К. : Фітосоціоцентр, 2012. 406 с .

99. Фітотерапія Карпатського краю / О. І. Алексєєв, П. І. Гвоздецький, Л. П. Сушко, В. М. Філь. Дрогобич : Редакційно-видавничий

відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені І. Франка, 2010. 143 с.

100. Фруентов Н. К., Кадаев Г. Н. Ядовитые растения: Медицинская токсикология растений Дальнего востока. Хабаровск. Хабаровское книжное издательство, 1971. 256 с.

101. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие. Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. 112с

102. Чекман І. С. Клінічна фітотерапія. К. : А.С.К., 2003. 552 с.

103. Червона книга України 2010-2017. URL: <http://redbook-ua.org/>.

104. Червона книга України. 2010-2020. URL: <http://redbook-ua.org/>

105. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я.П. Дідуха. Київ: Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.

106. Шавель І. Цілющі рослини України. Львів: БаК, 2012. 432 с.

107. Шалата В. Я., Сур С. В. Вивчення технологічних властивостей багатокomпонентної лікарської рослинної сировини. *Запорозький медичинський журнал*. №2 (71). 2012. С. 111-115.

108. Шевцов І. М., Журавель І. О., Кисличенко В. С. Ідентифікація та кількісне визначення вмісту гідроксикоричних кислот в лусках *Allium сера* L. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2009. Т. 4, №4. С. 33-35.

109. Юрин В. М., Шапчиц М. П., Булатова А. А. Оптимизация условий выращивания для повышения содержания биологически активных веществ в культуре клеток сирени обыкновенной. *Вестник БГУ*. Сер. 2. 2008. № 1 С. 51-55.

110. Alfermann A. W. Production of Natural Products by Plant Cell and Organ Cultures. *Annual Plant Reviews book series*. Vol. 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. 19 April 2018.

111. Ali M., Abbasi B. H., Ali G. S. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium L.* *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2015. № 120. P. 1099–1106.

112. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. [The Angiosperm Phylogeny Group](#) / M. W. Chase, M. J. M. Christenhusz, M. F. Fay, J. W. Byng. *Botanical Journal of the Linnean Society.* Volume 181, Issue 1. May 2016. P. 1–20.

113. Anemone (Wood). 1995-2017. URL: <http://Botanical.com/>.

114. Anemonin Alleviates Nerve Injury After Cerebral Ischemia and Reperfusion (I/R) in Rats by Improving Antioxidant Activities and Inhibiting Apoptosis Pathway / D. Jia, B. Han, S. Yang, J. Zhao. *Journal of Molecular Neuroscience.* 2014. Vol. 53. Issue 2. P. 271–279.

115. Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes / Y.-H. Huang, T.-H. Lee, K.-J. Chan, F.-L. Hsu. *Journal of Dermatological Science.* 2008. Vol. 49. Issue 2. P. 115–123.

116. Anemonin, from *Clematis crassifolia*, potent and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor / T. H. Lee, N. K. Huang, T. C. Lai, A. T. Y. Yang. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008. Vol. 116. Issue 3. P. 518–527.

117. Anticancer chemodiversity of Ranunculaceae medicinal plants: molecular mechanisms and functions / D. C. Hao, C. N. He, J. Shen, P. G. Xiao. *Current genomics,* 2017. № 18 (1). P. 39-59.

118. Boiko T., Boiko P., Dementieva O. An analysis of the current state of dendrological objects protected by the city of Kherson. 19-th International multidisciplinary scientific geoconference SGEM 2019 ISSUE: 6.2. 2019, P. 343–348. DOI:10.5593/sgem2019/6.2/S27.044.

119. Boussin A. Mise à jour d'un site de toxicologie végétale à destination des vétérinaires : Végétox 2 : Doctoral dissertation., 2019.

120. Cao H., Li X., Wang F. Phytochemical-mediated glioma targeted treatment: drug resistance and novel delivery systems. *Current Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 27, No. 4. P. 599-629.

121. Chemical composition and pharmacological activity of the leaves of *Pueraria hirsuta* l. grown in Georgia / É. P. Kemertelidze, V. N. Syrov, M. D. Alaniya, N. Sh. Kavtaradze. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. -2008. Vol. 42 (6). -P. 340-343.

122. Clarke G.C.S., Punt W., Hoen P.P. RANUNCULACEAE. The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, Great Britain, Laboratory of Palaeobotany and Palynology, State University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 1991. Vol. 69. P. 117 – 271.

123. Dabski M., Parzymies M. Wplyw cytokinin na namnazanie powojnika calolistnego (*Clematis integrifolia* L.) in vitro. *Zeszyty Problemowe Posepow Nauk Rolniczych*. 2006. Vol. 510. P. 119–125.

124. Da-Cheng Haoa, Xiaojie Gua, Peigen Xiaob. Anemone medicinal plants: ethnopharmacology, phytochemistry and biology. *Chinese Pharmaceutical Association Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science*. 2016.

125. Del Prete A., Scalera A., Iadevaia M. D. Herbal products: benefits, limits, and applications in chronic liver disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012. Vol. 12. P. 1-19.

126. *Delphinium elatum* L. URL: plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:710585-1.

127. Do Q. D, Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and

antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014. № 22. P. 296-302.

128. Drug metabolism and pharmacokinetic diversity of Ranunculaceae medicinal compounds / Da-Cheng Hao 1, Guang-Bo Ge, Pei-Gen Xiao, Ping Wang. *Curr Drug Metab*. 2015. Vol. 16(4). P. 294-321.

129. Duan H., Zhang Y., Xu J., Qiao J. Effect of anemonin on NO, ET-1 and ICAM-1 production in rat intestinal microvascular endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. Vol. 104. Issue 3. P. 362–366.

130. Efstathia Skotti, Eirini Anastasaki, Georgia Kanellou, Moschos Polissiou. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 2014. № 53. P. 46 –54.

131. Elliott A. Systematics of Clematis in Nepal, the evolution of tribe Anemoneae DC (Ranunculaceae) and Phylogeography and the dynamics of speciation in the Himalaya. *Biology*. 2016.

132. EMA/HMPC/162241/2011 Rev. 2 Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products.

133. Encyclopedia of Cultivated Plants: From Acacia to Zinnia/ C. Christopher: Santa Barbara, 2013. Vol. 3. 1236 p.

134. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose. – Strasburg, Council of Europe, Publication and Documents Division. – Printed in France. – Edition November, 1987.

135. Frohne D., Pfander H. J. Poisonous Plants: a handbook for doctors, pharmacists toxicologists, biologists and veterinarians, 2nd ed. Manson Publishing Inc., London, 2005. 480 p.

136. Goodson J. A. The alkaloids of the seeds of *Delphinium elatum* L. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1943.

137. Green B.T., Gardner D.R., Pfister J.A. The effect of alkaloid composition of larkspur (*Delphinium*) species on the intoxication of Angus heifers. *Journal of Animal Science*. 2019. Vol. 97. P. 1415-1423.
138. Hao D.-C. Anticancer chemodiversity of *Ranunculaceae* medicinal plants. *Biodiversity, Chemodiversity and Pharmacotherapy*. 2019. P. 223- 259.
139. Hao D.-C., Gu X., Xiao P. Anemone medicinal plants: ethnopharmacology, phytochemistry and biology. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 2017. Vol. 7. Issue 2. P. 156–168.
140. Hao D.-C., Xiao P.-G., Ma H.-Y. Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of *Ranunculaceae*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2015. Vol. 13(7). P. 507-520.
- 141.** Hardy K. Plant use in the Lower and Middle Palaeolithic: Food, medicine and raw materials. *Quaternary Science Reviews*. 2018. Vol/191/ P. 393-405.
142. Homeopathic formulation consisting of *Bronla Alba* and *Pulsatilla* spp.: Appl. No.: 13/530.407 (22) Filed: Jun. 22, 2012 (65) Prior Publication Data US 2013/OOO4591 A1 Jan. 3, 2013.
143. <http://ru.osvita.ua/vnz/reports/biolog/27498/>
144. Jensen U., Kadereit J. W. Springer Science & Business Media. 2012. 367 p.
145. Kokoska L., Urbanova K., Kloucek P. Essential oils in the *Ranunculaceae* family: chemical composition of hydrodistilled oils from *Consolida regalis*, *Delphinium elatum*, *Nigella hispanica*, and *N. nigellastrum* seeds. *Chemistry & Biodiversity*. 2012. Vol. 9. P. 151-161.
146. Kokoska L., Urbanova K., Klousek P. Essential Oils in the *Ranunculaceae* Family: Chemical Composition of Hydrodistilled Oils from *Consolida regalis*, *Delphinium elat um*, *Nigella hispanica*, and *N. nigellastrum* Seeds. *Chemistry and Biodiversity*. 2012. Vol. 9, Issue 1. P. 151-161.

147. Kolbek J. Několik starších floristických dat ze Slovenska. *Bull. Slov. Bot. Spoločn.* Roč. 36. č. 2. 2014. P.159–166.

148. Kozai T. Biotechnology in Agriculture and Forestry. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17, Chapter: Acclimatization of micropropagated planrs. Publisher: Springer-Verlag. P. 257-271.

149. Krvavych A. S., Konechna R. T., Mylianych A. O. Kinetics and mechanism of the extraction of biologically active substances from wild species *G.imbricatus*. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologi*. 2018. № 5. P. 111-115.

150. Krvavych A.S., Konechna R.T., Petrina R.O., Phytochemical research of plant extracts and use in vitro culture in order to preserve rare wild species *Gladiolus imbricatus*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2014. V.5 (1). P. 240-246.

151. Leleka M., Zalis'ka O., Kozyr G. Screening Research of Pharmaceutical Compositions Based on Succinic Acid, Ascorbic Acid and Rutin. *Pharmacy and Pharmacology*. 2016. Vol. 4. P. 486-491.

152. Ligor M., Ratiu I., Kielbasa A. Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis*. 2018.

153. Lin C.-Z., Zhao Z.-X., Xie S.-M. Diterpenoid alkaloids and flavonoids from *Delphinium trichophorum*. *Phytochemistry*. 2014. Vol. 97. P. 88-95.

154. Maior M., Dobrota C. Natural compounds with important medical potential found in *Helleborus* sp. *Central European Journal of Biology*. 2013. Vol. 8. Issue 3. P. 272–285.

155. Marion L., Edwards O. E. The alkaloids of *Delphinium Consolida* L. *Journal of the American Chemical Society*. 1947. Vol. 69 (8). P. 2010-2014.

156. Martin M. L., Roman L., Dominguez A. In vitro activity of protoanemonin, an antifungal agent. *Planta Medica*. 1990. Vol. 56. Issue 1. P. 66–69.

157. Martins dos Santos, Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response / Roberto A. Bobadilla Fazzini, Mette E. Skindersoe, Piotr Bielecki, Jacek Puchałka. *Environmental Microbiology*. 2012.

158. McCoy E., O'Connor S. E. Natural products from plant cell cultures *Progress in Drug Research*. 2008. Vol. 65. P. 330—370.

159. Meda A., Lamien C. E., Romito M. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 2005. Vol. 91. P. 571- 577.

160. Medicinal value of Ranunculaceae of Dir valley / Ali Hazrat, Jehandar Shah, Muhammad Ali, Ilyas Iqbal. *Pakistan Journal of Botany*. 2007. No 39(4). P. 1037-1044.

161. Minakata H., Komura H., Nakanishi K. Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1983. Vol. 116. Issue 3-4. P. 317—322.

162. Misra S., Dixit S. Antifungal principle of *Ranunculus sceleratus*. *Economic Botany*. 1980. Vol. 34. Issue 4. P. 362—367.

163. Molecular phylogeny of Ranunculaceae based on internal transcribed spacer sequences / C. Ying-fan, L. Sheng-wei, L. Yi, Q. Sun. *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8, № 20. P. 5215—5224.

164. Mondoni A., Probert R., Rossi G. Habitat-correlated seed germination behaviour in populations of wood anemone (*Anemone nemorosa* L.) from northern Italy. *Seed Science Research*. 2008. Volume 18. Issue 4. P. 213 - 222. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258508084997>

165. Muiño W., Prina A., Ernst R. *Ranunculus platensis* (Ranunculaceae). New record for the flora of La Pampa province, Argentina. *6300 Santa Rosa Argentina*. 2017. Vol. 27 (1). P. 41-44.

166. Murthy H. N., Lee E. J., Paek K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass

improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2014. Vol. 118. P. 1–16.

167. Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. URL: <https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Ranunculaceae.htm>

168. Octacosanol attenuates disrupted hepatic reactive oxygen species metabolism associated with acute liver injury progression in rats intoxicated with carbon tetrachloride / K. Ohashi, T. Matsura, K. Tokunaga, A. Kitagawa. *Clinical Biochemistry and Nutrition.* 2008. № 42 (2). P. 118-125.

169. Pavliuk I., Dyachok V., Novikov V. Kinetics of biologically active compound extraction from hops strobiles extraction cake. *Chemistry & chemical technology.* 2017. Vol. 11, №4. P. 487–491.

170. Povetiyeva T.N., Nesterova Y.V., Krapivin A.V. Antiinflammatory and antibacteriological properties of extracts from aboveground part of *Delphinium elatum* L. (Ranunculaceae). *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016. V. 11, № 3. P. 58-61.

171. Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response / R. A. Bobadilla Fazzini, M. E. Skindersoe, P. Bielecki, J. Puchalka. *Environmental Microbiology.* 2012. Vol. 15. Issue 1. P. 111–120.

172. Pulsatilla decoction and its active ingredients inhibit secretion of NO, ET-1, TNF-alpha, and IL-1 alpha in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells / Y. Hu, X. Chen, H. Duan, Y. L. Hu. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* No3 (7) 2017. 2009 Vol. 27. Issue 5. P. 284–288.

173. Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41986>.

174. Ramachandra R. S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotech. Adv.* 2002. Vol. 20. P. 101–153.

175. Ranunculaceae in Flora of China. URL: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10757

176. Rare phytofund of Verkhovynsky national nature park and its analysis / Matsapiak L. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv - Biology*. 2021. Vol. 84 (1). P. 27-34.

177. Rayes I. K., Abrika O. S. S. Community pharmacists' knowledge and perspectives regarding the medicinal use of *Nigella Sativa* Seeds (Ranunculaceae). A qualitative insight from Dubai, United Arab Emirates. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2019. Vol. 13(19). P. 518-522.

178. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effect by oral administration of betaine in male wistar rats: a morphometric histologic study / M. Junnila, T. Rahko, A. Sukura, L. Lindberg. *Veterinary Pathology*. 2000. №37(3). P. 231-238.

179. Ross S. A., Joshi B. S., Desai H. K. Delatisine, a novel diterpenoid alkaloid from *Delphinium elatum* L. *Tetrahedron*. 1991. Vol. 47, No. 46. P. 9585-9598.

180. Roth Von L., Dauderer M., Kormann K. Giftpflanzen-Pflanzengifte [Poisonous plants-phytotoxins] Nikol Verlag, Hamburg, 2006.

181. Sakuragui C.M. Neotropical Ranunculaceae. In: Milliken W., Klitgård B., Baracat A. Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. URL: <https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Ranunculaceae.htm>

182. Schmitz C., Fritsch L., Fischer R. Statistical experimental designs for the production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures. *Biotechnol Lett* . 2016. Vol. 38.

183. Sheikh T. J., Patel B. J., Joshi D.V. Electrolytes alterations in plasma and urine after 28 days repeated oral dose toxicity of mercuric chloride in wistar rat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011. Vol 01 (10). P. 150-153.
184. Skotti E., Anastasaki E., Kanellou G. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 2014. № 53. P. 46-54.
185. Smetanska I. Production of secondary metabolites using plant tissue cultures. *Food Biotechnol.* 2008. Vol. 11. P. 187–228.
186. Sun Y.X., Liu J.C., Liu D.Y. Phytochemicals and bioactivities of *Anemone raddeana* Regel: a review. *Die Pharmazie. An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011. Vol. 66, No 11. P. 813-821.
187. Tamura M. The Families and Genera of Vascular Plants. *Berlin. Springer – Verlag*, 1993. Vol. 2. P. 563–583.
188. The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine / Ji Yubin, Yu Miao, Wang Bing, Zhang Yao. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014. № 6(1). P. 338-345.
189. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. / O. Khropot, Y. Konechnyi, N. Polish, R. Konechna. *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. 2020. Vol. 7, Iss. 2. P. 153–159.
190. Thévenin T. Quelle éthique, quelles pratiques pour des plantes médicinales de qualité ? *Phytothérapie*. 2017. Vol. 15, № 3. P. 123-130.
191. Tomlinson, K.L.; Sanchez, J.A.; Spasser, M.A.; Schnase, J.L. (1998), Managing cognitive overload in the Flora of North America project, 2, p. 296, doi:10.1109/HICSS.1998.651712
192. Tsevegsuren N., Aitzetmuller K. γ -Linolenic Acid in *Anemone* spp. Seed Lipids. *Institute for Chemistry and Physics of Lipids, Federal Center*

for Cereals, Potato and Lipid Research (BAGKF). 1993. Vol. 28. Issue 9. P. 841–846.

193. Turner N. J. Counter-irritant and other medicinal uses of plants in Ranunculaceae by native peoples in British Columbia and neighbouring areas. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984 № 11 (2): P. 181–201.

194. Von Cossel M., Lewandowski I. Perennial wild plant mixtures for biomass production: Impact of species composition dynamics on yield performance over a five-year cultivation period in southwest Germany. *European Journal of Agronomy*. 2016. Vol. 79. P. 74- 89.

195. Wada K., Asakava E., Tosho Y., Nakata A. Four new Diterpenoid alkaloids from *Delphinium elatum*. *Phytochemistry Letters*. 2016. Vol. 17. P. 190-193.

196. Wada K., Chiba R., Kanazava R. Six new norditerpenoid alkaloids from *Delphinium elatum*. *Phytochemistry Letters*. 2015. Vol.12. P. 79-83.

197. Xiang K.-L., Erst A. S., Yang J. Biographic diversification of *Eranthis* (Ranunculaceae) reflects the geological history of the three great Asian plateaus. *Proc Biol Sci*. 2021.

198. Xiao K., Cao S. T., Jiao L. F. Anemonin improves intestinal barrier restoration and influences TGF- β 1 and EGFR signaling pathways in LPS-challenged. *Innate Immunity*. 2016. Vol. 22. Issue 5. P. 344–352.

199. Yamashita H., Katoh M., Kokubun A. Four new C19-diterpenoid alkaloids from *Delphinium elatum*. *Phytochemistry letters*. 2018. V. 24. P. 6-9.

200. Zhong J.J. Biochemical Engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2001. Vol. 72. P. 1–26.

201. Ziman Sv. N., Keener C. S. A Geographical Analysis of the Family Ranunculaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1989. Vol. 76, No. 4. P. 1012-1049.

ДОДАТКИ

Список публікацій здобувача

21. Konechna R., Khropot O., Petrina R., Kurka M., Gubriy Z., Novikov V. Research of antioxidant properties of extracts of the plants and the callus biomass // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2017. – Том 10 № 7. – С. 182–185. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, узагальнення та обробка одержаних результатів, підготовка статті).

22. Khropot O., Konechnyi Y., Polish N., Konechna R., Bazavluk Y., Korniychuk O., Novikov V. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. // *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 7, iss. 2. – P. 153–159. (Особистий внесок здобувача: проведення процесу екстракції, аналіз результатів, написання статті).

23. Лук'янчук А., Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд // *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. – 2017. – № 3 (7). – С. 38–42. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел і теоретичні відомості про сировину, оформлення статті).

24. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Голота С. М., Пошивак О. Б., Нектегаєв І. О., Піняжко О. Р., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) // *Фармацевтичний часопис*. – 2019. – № 2 (50). – С. 60–66. (Особистий внесок здобувача: брала участь у пробопідготовці зразків сировини, аналіз літературних джерел та результатів дослідження, оформлення матеріалів статті).

25. О. Хропот, Є. Базавлук, Р. Конечна, І. Губицька, Ю. Конечний, І. Ясіцька-Місяк, П. Вечорек, В. Новіков. Одержання та дослідження калусної маси *Delphinium elatum* // *Фармацевтичний часопис*. – 2020. – №2. – С. 5–15. (Особистий внесок здобувача: брала участь у пробопідготовці зразків сировини, проведенні експериментальних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).

26. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Червцова В. Г., Новіков В. П. Введення в культуру *in vitro* *Delphinium elatum* та перспективи використання калусної біомаси в гомеопатії // *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і*

біотехнології. – 2017. – Том 2. – С. 58–61. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, вирощування калосу, оформлення результатів).

27. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П., Ясічка-Місяк І., Вечорек П. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemone nemorosa* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 3. – С. 171–173. (Особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, оформлення статті).

28. Гриців С. В., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Петріна Р. О., Новіков В. П. Культивування деяких рідкісних та зникаючих видів лікарської флори Українських Карпат в умовах *in vitro* // Хімічна технологія та інженерія : збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції (Україна, Львів, 26–30 червня 2017 р.). – 2017. – С. 406–407. (Особистий внесок здобувача: культивування рослин в умовах *in vitro*).

29. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Альтернативний біотехнологічний метод одержання біомаси *Delphinium elatum* // Біологічні дослідження – 2017 : збірник наукових праць VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (14–16 березня 2017). – 2017. – С. 332–333. (Особистий внесок здобувача: підір умов для одержання біомаси та оформлення тез).

30. Lukianchuk A., Shikula S., Khropot O., Konechnyi Y., Hamada V., Konechna R., Mylianych A., Korniyuchuk O., Novikov V. Antimicrobial activity of extracts of windflower (*Anemone nemorosa* L.) // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції (29–30 вересня 2017 р., Харків). – 2017. – С. 11–12. (Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності анемони та оформлення тез згідно з вимогами).

31. Гриців С., Хропот О., Конечна Р., Петріна Р. Культивування рослин родини *Ranunculaceae* // Біотехнологія XXI століття : матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 24. (Особистий внесок здобувача: підір умов для культивування рослин).

32. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П. Використання *Anemone nemorosa* в фармакотерапії

захворювань людини, проблеми та перспективи // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 202. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та підготовка тез згідно вимог*).

33. Колб Ю. І., Гриців С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Перспективи використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* у фармації // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 165–166. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та отримання калюсів*).

34. Гриців С. В., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Біотехнологічне дослідження *Delphinium elatum* // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 279–280. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та підготовка тез до друку згідно вимог*).

35. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Можливість застосування *Pulsatilla alba* у косметології та фармації // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 284. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел*).

36. Хропот О. С., Конечна Р. Т., Конечний Ю. Т., Шичула С. І., Тимчук І. В. Протимікробна активність *Delphinium elatum* L. // Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Чернівці, 29 січня 2018 року). – 2018. – С. 126–128. (*Особистий внесок здобувача: вивчення протимікробної активності*).

37. Конечний Ю. Т., Хропот О. С., Базавлук Є. В., Гамада В. Р., Корнійчук О. П., Шичула Р. Г., Конечна Р. Т., Журахівська Л. Р., Новіков В. П. Дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII Науково-практичної конференції з

міжнародною участю (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.). – 2018. – С. 25–27. (*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності та дослідження вмісту фенольних сполук*).

38. Гамада В. Р., Хропот О. С., Крвавич А. С., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Аспекти біотехнології у розробці нових функціональних харчових продуктів // Стан і перспективи харчової науки та промисловості: тези доповідей V Міжнародної науково-технічної конференції, 10–11 жовтня 2019 р., Тернопіль. – 2019. – С. 126–127. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел*).

39. Базавлук Є. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Новіков В. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Delphinium elatum* L. // Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження : матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 11 березня 2020 року, м. Харків. – 2020. – С. 21–22. (*Особистий внесок здобувача: дослідження вмісту фенольних сполук*).

40. Базавлук Є.В., Хропот О.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П.,Шикула С.І., Конечний Ю.Т. Оцінка антимікробного потенціалу *Delphinium elatum* L.// Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances: матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, 23-25 квітня 2020, м.Київ, 2020 – С.88-91. (*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності*).

Додаток Б

Апробація результатів дисертації

1. VI Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2016).
2. Міжнародній науково-практичній конференції «Хімічна технологія та інженерія» (м. Львів, 2017).
3. VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Біологічні дослідження – 2017» (Львів, 2017).
4. Міжнародній науково-практичній конференції «Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє» (Харків, 2017).
5. XI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття»; 1-й Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2017).
6. Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018),
7. VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2018).
8. V Міжнародної науково-технічної конференції «Стан і перспективи харчової науки та промисловості» (Тернопіль, 2019).

Додаток В.1



ТзОВ «ТЕХНОЛАБ»
79040 м.Львів, вул. Данила Апостола, 2
тел./факс: (032) 297-16-88,
ІВАН:UA27305299000026006011014446
в АТ КБ «ПРИВАТБАНК»
ЄДРПОУ 33753895

Вих. № 433
Від 11.06.2020 р.

АКТ
використання матеріалів дисертаційної роботи
Хропот Оксани Сергіївни «Використання рослин родини *Ranunculaceae*
для отримання біологічно активних речовин в системі *in vitro*».

Матеріали дисертаційної роботи Хропот О. С. «Використання рослин родини *Ranunculaceae* для отримання біологічно активних речовин в системі *in vitro*» використовуються в роботі контрольної-аналітичної та мікробіологічної лабораторії ТзОВ «Технолаб».

Результати та висновки дисертаційної роботи можуть бути використані у фармацевтичних розробках та удосконаленні методик якісного та кількісного визначення діючих субстанцій, їх мікробіологічної чистоти та побічних біологічних ефектів з метою розширення спектру їх практичного застосування.

Результати наукових досліджень перспективні для використання в умовах фармацевтичного виробництва для розробки методів одержання та контролю біологічно активних речовин з калюсних біомас отриманих при культивуванні рослин родини жовтецевих в умовах *in vitro*.

Генеральний директор ТзОВ «Технолаб»
д.фармац.наук



О.М.Черпак

Додаток В.2



«Затверджую»
Перший проректор
Запорізького державного
медичного університету
Авраменко М.О.

«11» 03 2020 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Одержання в умовах *in vitro* каллоної біомаси *Delphinium elatum* L., її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м.Львів, вул. Степана Бандери, 12
3. **Прізвище, ім'я, по-батькові авторів:** В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
4. **Джерела інформації:**
 1. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Голота С. М., Пошивак О. Б., Нектегаєв І. О., Пінняжко О. Р., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) // Фармацевтичний часопис. – 2019. – № 2 (50). – С. 60–66.
 2. Колб Ю. І., Гриців С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Перспективи використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* у фармації // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали І Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 165–166.
 3. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Можливість застосування *Pulsatilla alba* у косметології та фармації // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 284.
5. **Впроваджено:** в роботу кафедри управління і економіки фармації та фармацевтичної технології Запорізького державного медичного університету
6. Дата початку впровадження «__» _____ 20__ р.
7. **Терміни впровадження:** 2019-2020 р
8. **Результати впровадження** результати досліджень можуть використовуватися у навчальному процесі провізорів-інтернів з питань оптимізації технологічних процесів створення лікарських препаратів

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри управління і економіки
фармації та фармацевтичної технології
Запорізького державного медичного університету
д. фарм. н., проф.

І.В. Бушуєва

Додаток В.3

16.06.2021

Рисунок (2).jpg



«Затверджую»
Перший проректор
Запорізького державного
медичного університету
Авраменко М.О.

«19» 02 2020 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Найменування пропозиції для впровадження:** Одержання в умовах *in vitro* калонної біомаси *Anemone nemorosa* L., її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- Заклад, що розробив, його поштова адреса:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м Львів, вул. Степана Бандери, 12
- Прізвище, ім'я, по-батькові авторів:** В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- Джерела інформації:**
 - Khropot O., Konechnyi Y., Polish N., Konechna R., Bazavluk Y., Korniyuchuk O., Novikov V. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. // French-Ukrainian Journal of Chemistry. – 2020. – Vol. 7, iss. 2. – P. 153–159.
 - Лук'янчук А., Хропот О. С., Конечний Ю.Т, Конечна Р. Т., Новіков В. П. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд // ScienceRise. Pharmaceutical Science. – 2017. – № 3 (7). – С. 38–42.
 - Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П., Ясіцка-місяк І., Вечорек П. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemona nemorosa* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 3. – С. 171–173.
 - Lukianchuk A., Shikula S., Khropot O., Konechnyi Y., Hamada V., Konechna R., Mylianych A., Korniyuchuk O., Novikov V. Antimicrobial activity of extracts of windflower (*Anemone nemorosa* L.) // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції (29–30 вересня 2017 р., Харків). – 2017. – С. 11–12.
 - Конечний Ю. Т., Хропот О. С., Базавлук С. В., Гамада В. Р., Корнійчук О. П., Шикула Р. Г., Конечна Р. Т., Журахівська Л. Р., Новіков В. П. Дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.). – 2018. – С. 25–27.
- Впроваджено:** в роботу кафедри управління і економіки фармації та фармацевтичної технології та кафедри природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету
- Терміни впровадження:** 2019-2020 р.р.
- Результати впровадження:** результати досліджень можуть використовуватися у навчальному процесі студентів фармацевтичного факультету та провізорів-інтернів з питань дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. тощо.

Відповідальні за впровадження:

Завідувач кафедри управління і економіки
фармації та фармацевтичної технології
Запорізького державного медичного університету
д. фарм. н., професор

І.В. Бушуєва

Професор кафедри природничих дисциплін
для іноземних студентів та токсикологічної хімії
Запорізького державного медичного університету
д. фарм. н., професор

В.В. Парченко

Додаток В.4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
член-кор. НАМНУ
професор М.Р.Гжегоцький



Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Результати одержання в умовах *in vitro* калюсної біомаси анемони дібрової (*Anemone nemorosa* L.), її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- 2. Установа, автори:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м. Львів, вул. Степана Бандери, 12. В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- 3. Джерела інформації:**
 1. Khropot O., Konechnyi Y., Polish N., Konechna R., Bazavluk Y., Korniychuk O., Novikov V. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. // French-Ukrainian Journal of Chemistry. – 2020. – Vol. 7, iss. 2. – P. 153–159.
 2. Лук'янчук А.В., Хропот О. С., Конечний Ю.Т., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд // ScienceRise. Pharmaceutical Science. – 2017. – № 3 (7). – С. 38–42.
 3. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П., Ясіцка-місяк І., Вечорек П. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemone nemorosa* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 3. – С. 171–173.
 4. Lukianchuk A., Shikula S., Khropot O., Konechnyi Y., Hamada V., Konechna R., Mylianych A., Korniychuk O., Novikov V. Antimicrobial activity of extracts of windflower (*Anemone nemorosa* L.) // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції (29–30 вересня 2017 р., Харків). – 2017. – С. 11–12.
 5. Конечний Ю. Т., Хропот О. С., Базавлук Є. В., Гамада В. Р., Корнійчук О. П., Шикула Р. Г., Конечна Р. Т., Журахівська Л. Р., Новіков В. П. Дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.). – 2018. – С. 25–27.
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії і ботаніки ЛНМУ імені Данила Галицького
- 5. Форма впровадження:** у навчальний процес (лекційний курс та практичні заняття при вивченні тем «Глікозиди», «Фенольні сполуки») і наукову роботу (планування і виконання магістерських робіт)
- 6. Ефективність впровадження:** поглиблення знань студентів щодо хімічного складу анемони дібрової, а також перспектив її використання як джерела нових видів ЛРС.
- 7. Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік

Завідувач кафедри
фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького
кандидат фармацевтичних наук, доцент

Н.В. Шаповалова

Додаток В.5



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
член-кор. НАМНУ
професор М.Р.Гжегоцький
«08» вересня 2020 р.

Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Результати одержання в умовах *in vitro* калусної біомаси сну білого (*Pulsatilla alba*), її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- 2. Установа, автори:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м. Львів, вул. Степана Бандери, 12. В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- 3. Джерела інформації:**
 1. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Голота С. М., Пошивак О. Б., Нектегаєв І. О., Піняжко О. Р., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) // Фармацевтичний часопис. – 2019. – № 2 (50). – С. 60–66.
 2. Колб Ю. І., Гриців С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Перспективи використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* у фармації // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 165–166.
 3. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Можливість застосування *Pulsatilla alba* у косметології та фармації // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 284.
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії і ботаніки ЛНМУ імені Данила Галицького
- 5. Форма впровадження:** у навчальний процес (лекційний курс та практичні заняття при вивченні тем «Глікозиди», «Фенольні сполуки») і наукову роботу (планування і виконання магістерських робіт)
- 6. Ефективність впровадження:** поглиблення знань студентів щодо хімічного складу сну білого, а також перспектив його використання як джерела нових видів ЛРС.
- 7. Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік

Завідувач кафедри
фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького
кандидат фармацевтичних наук, доцент

Н.В. Шаповалова

Додаток В.6



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
член-кор. НАМНУ
професор М.Р.Гжегоцький

«07» вересня 2020р.

Акт впровадження


- 1. Найменування для впровадження:** Результати одержання в умовах *in vitro* калусної біомаси дельфінію високого (*Delphinium elatum* L.), її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- 2. Установа, автори:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м. Львів, вул. Степана Бандери, 12. В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- 3. Джерела інформації:**
 1. О. Хропот, Є. Базавлук, Р. Конечна, І. Губицька, Ю. Конечний, І. Ясіцька-Місяк, П. Вечорек, В. Новіков, Одержання та дослідження калусної маси *Delphinium elatum* // Фармацевтичний часопис. – 2020. – №2. – С. 5–15.
 2. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Червцова В. Г., Новіков В. П. *Введення в культуру in vitro Delphinium elatum* та перспективи використання калусної біомаси в гомеопатії // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 2. – С. 58–61.
 3. Хропот О. С., Конечна Р. Т., Конечний Ю. Т., Шикуча С. І., Тимчук І. В. Протимікробна активність *Delphinium elatum* L. // Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Чернівці, 29 січня 2018 року). – 2018. – С. 126–128.
 4. Базавлук С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Новіков В. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Delphinium elatum* L. // Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження : матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 11 березня 2020 року, м. Харків. – 2020. – С. 21–22.
 5. Базавлук С.В., Хропот О.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П., Шикуча С.І., Конечний Ю.Т. Оцінка антимікробного потенціалу *Delphinium elatum* L. // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances: матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, 23-25 квітня 2020, м. Київ, 2020 – С.88-91.
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії і ботаніки ЛНМУ імені Данила Галицького
- 5. Форма впровадження:** у навчальний процес (лекційний курс та практичні заняття при вивченні тем «Алкалоїди», «Фенольні сполуки») і наукову роботу (планування і виконання магістерських робіт)
- 6. Ефективність впровадження:** поглиблення знань студентів щодо хімічного складу дельфінію високого, а також перспектив його використання як джерела нових видів ЛРС.
- 7. Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік

Розглянуто на засіданні кафедри фармакогнозії і ботаніки, протокол № 10 від 17.05.2021 року

Завідувач кафедри
фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького
кандидат фармацевтичних наук, доцент

Н.В. Шаповалова

Додаток В.7

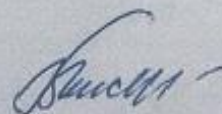


«Затверджую»
Директор із науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного
університету
проф. Владимирова І. М.
" вересня " 2020 р.

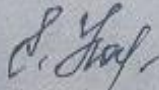
АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Одержання в умовах *in vitro* калюної біомаси *Delphinium elatum* L., її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- 2. Установа, автор:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м. Львів, вул. Степана Бандери, 12; В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- 3. Джерела інформації:**
 1. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Голота С. М., Пошивак О. Б., Некстєгаєв І. О., Піняжко О. Р., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) // Фармацевтичний часопис. – 2019. – № 2 (50). – С. 60–66.
 2. Колб Ю. І., Гриців С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Перспективи використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* у фармації // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали І Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 165–166.
 3. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Можливість застосування *Pulsatilla alba* у косметології та фармації // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 284.
- 4. Де впроваджено:** кафедра хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету.
- 5. Форма впровадження:** навчальний процес і наукова робота кафедри хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині біологічно активних речовин *Delphinium elatum* L.
- 7. Терміни впровадження:** 2019-2020 навчальний рік.
Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри хімії природних сполук і нутриціології (протокол № 10 від 30.08.2019 р.).

Зав. кафедри хімії природних сполук НФаУ,
д. фармацев. н., професор

 В. С. Кисличенко

Відповідальний за впровадження:
к. фармацев. н., доцент кафедри хімії
природних сполук НФаУ,

 О. М. Новосел

Додаток В.8



«Затверджую»

Проректор із науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного
університету

проф. Владимирова І. М.

10 " вересня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Одержання в умовах *in vitro* каллоної біомаси *Anemone nemorosa* L., її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- 2. Установа, автор:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м. Львів, вул. Степана Бандери, 12; В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- 3. Джерела інформації:**
 1. Khropot O., Konechnyi Y., Polish N., Konechna R., Bazavluk Y., Korniyuchuk O., Novikov V. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. // French-Ukrainian Journal of Chemistry. – 2020. – Vol. 7, iss. 2. – P. 153–159.
 2. Лук'янчук А., Хропот О. С., Конечний Ю.Т., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд // ScienceRise. Pharmaceutical Science. – 2017. – № 3 (7). – С. 38–42.
 3. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П., Ясічка-місяк І., Вечорек П. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemone nemorosa* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 3. – С. 171–173.
 4. Lukianchuk A., Shikula S., Khropot O., Konechnyi Y., Hamada V., Konechna R., Mylianych A., Korniyuchuk O., Novikov V. Antimicrobial activity of extracts of windflower (*Anemone nemorosa* L.) // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції (29–30 вересня 2017 р., Харків). – 2017. – С. 11–12.
 5. Конечний Ю. Т., Хропот О. С., Базавлук Є. В., Гамада В. Р., Корнійчук О. П., Шикула Р. Г., Конечна Р. Т., Журахівська Л. Р., Новіков В. П. Дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.). – 2018. – С. 25–27.
- 4. Де впроваджено:** кафедра хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету.
- 5. Форма впровадження:** навчальний процес і наукова робота кафедри хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині біологічно активних речовин *Anemone nemorosa* L.
- 7. Терміни впровадження:** 2019-2020 навчальний рік.
Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри хімії природних сполук і нутриціології (протокол № 10 від 30.08.2019 р.).


Зав. кафедри хімії природних сполук НФаУ,
д. фармацевт. н., професор

В. С. Кисличенко

Відповідальний за впровадження:
к. фармацевт. н., доцент кафедри хімії
природних сполук НФаУ,

О. М. Новосел

Додаток В.9

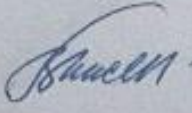


«Затверджую»
Директор із науково-педагогічної роботи
Національного
фармацевтичного
університету
проф. Владимирова І. М.
"10" вересня 2020 р.

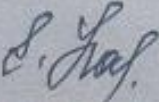
АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Одержання в умовах *in vitro* калусної біомаси *Delphinium elatum* L., її фітохімічне дослідження та встановлення фармакологічної активності
- 2. Установа, автор:** Національний університет «Львівська політехніка»: 79013, м. Львів, вул. Стелана Бандери, 12; В.П. Новіков, Р.Т. Конечна, О.С. Хропот
- 3. Джерела інформації:**
 1. О. Хропот, Є. Базавлук, Р. Конечна, І. Губицька, Ю. Конечний, І. Ясіцька-Місяк, П. Вечорек, В. Новіков, Одержання та дослідження калусної маси *Delphinium elatum* // Фармацевтичний часопис. – 2020. – №2. – С. 5–15.
 2. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Червецова В. Г., Новіков В. П. *Введення в культуру in vitro Delphinium elatum* та перспективи використання калусної біомаси в гомеопатії // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 2. – С. 58–61.
 3. Хропот О. С., Конечна Р. Т., Конечний Ю. Т., Шидула С. І., Тимчук І. В. Протимікробна активність *Delphinium elatum* L. // Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Чернівці, 29 січня 2018 року). – 2018. – С. 126–128.
 4. Базавлук Є. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Новіков В. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Delphinium elatum* L. // Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження : матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 11 березня 2020 року, м. Харків. – 2020. – С. 21–22.
 5. Базавлук Є.В., Хропот О.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П., Шидула С.І., Конечний Ю.Т. Оцінка антимікробного потенціалу *Delphinium elatum* L. // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances: матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, 23-25 квітня 2020, м.Київ, 2020 – С.88-91.
- 4. Де впроваджено:** кафедра хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету.
- 5. Форма впровадження:** навчальний процес і наукова робота кафедри хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині біологічно активних речовин *Delphinium elatum* L.
- 7. Терміни впровадження:** 2019-2020 навчальний рік.
Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри хімії природних сполук і нутриціології (протокол № 10 від 30.08.2019 р.).

Зав. кафедри хімії природних сполук НФаУ,
д. фармац. н., професор

 В. С. Кисличенко

Відповідальний за впровадження:
к. фармац. н., доцент кафедри хімії
природних сполук НФаУ,

 О. М. Новосел

Додаток Г.1

Таблиця Г.1

Результати ідентифікації фенольних сполук у екстрактах з ЛРС та КБ

A. nemorosa L., *D. elatum* L. і *P. alba* Reichenb.

№ з/п	Реактив, що додається	Очікуваний ефект	Наявність результату у досліджуваному екстракті					
			А ЛРС	А КБ	Д ЛРС	Д КБ	Р ЛРС	Р КБ
Загальні реакції на феноли								
1.	1% розчин FeCl ₃	фіолетове (синьо-сіре) забарвлення	+	+	+	+	+	+
2.	суміш 1:1 1% розчину FeCl ₃ та 1% розчину K ₃ [Fe(CN) ₆], і 10 крапель HNO ₃ конц.	коричневе забарвлення	+	+	+	+	+	+
3.	1% розчину ваніліну в HCl конц.	червоне забарвлення	+	+	+	+	+	+
Реакції на дубильні речовини								
4.	1% розчин желатини, 10% розчин хлоридної к-ти	утворення осаду	+	+	+	+	+	+
5.	розчин хініну гідрохлориду	аморфний осад	+	+	+	+	+	+
6.	розчин заліза (III) амонію сульфату	чорно-синє, чорно-зелене забарвлення	+	+	+	+	+	+
7.	бромна вода	утворення осаду	+	+	+	+	+	+

Продовж. дод.Г

Продовження табл. Г.1

Реакції на алкалоїди								
8.	реактив Вагнера та Бушарда (розчин I ₂ в розчині KI) у присутності дельсиміну	цегляно-червоне забарвлення	+	+	+	+	+	+
9.	реактив Драгендорфа (розчин вісмуту нітрату основного, йодиду калію та оцтової кислоти) у присутності елатину	коричневе забарвлення	+	+	+	+	+	+
10.	реактив Майєра (розчин ртуті дихлориду та йодиду калію) у присутності делартину	дрібнодисперсний світло-жовтий осад	+	+	+	+	+	+
11.	реактив Марме (розчин кадмію йодиди) у присутності кондельфіну	білий осад	+	+	+	+	+	+
Реакції на кумарини								
12	діазореактив	потемніння екстракту	-	-	-	-	-	-

Продовж.дод.Г

Продовження табл. Г.1

13	10% спиртовиу розчин КОН, вода очищена, 10% кислота хлоридна	опалесценція	-	-	-	-	-	-
Реакції на хромони								
14	Калію гідроксид	Жовте забарвлення	-	-	-	-	-	-
Реакції на сапоніни								
15	Вода очищена	Стійка піна	-	-	-	-	-	-

*А ЛРС, D ЛРС, P ЛРС – екстракти з ЛРС,

A КБ, D КБ, P КБ – екстракти з КБ

Додаток Д

Таблиця Д.1

Результати аналізу екстрактів

Ідентифікована сполука		Кавова кислота	<i>n</i> -кумарова кислота	ферулова кислота	елагілова кислота	кверцетин	хризин	4-гідрокси-бензойна кислота	розмаринова кислота	(+)-нарінгін	галола кислота
Екстракт	Показник										
А1	% у суміші	11,23	0,28	0,5	1,41	-	2,25	-	-	10,74	
	час утримання	15,783	18,967	19,422	23,848	-	34,302	-	-	29,718	
А2	% у суміші	4,01	-	0,43	-	-	0,48	-	0,59	1,5	
	час утримання	15,795	-	19,395	-	-	34,298	-	22,708	29,768	
А3	% у суміші									0,4	
	час утримання									29,727	
А4	% у суміші	0,81	0,4	0,18	-	2,01 27,025	2,75 34,272		0,67 22,613	0,94 29,682	

	час утримання	15,588	18,757	19,25							
--	------------------	--------	--------	-------	--	--	--	--	--	--	--

Продовж. дод. Д

Продовження табл. Д.1

	час утримання	15,588	18,757	19,25							
D1	% у суміші тутр.	-	0,62	0,74			1,21	1,83		2,84	3,28
		-	18,762	19,242			34,228	14,062		29,675	6,557
				1,17							
				23,69							
				-							
				-							
D2		-	0,6	-	1,22	-	1	1,19	0,66	2,88	3,9
		-	18,74	-	23,687	-	34,2	13,957	22,412	29,678	6,445
D3		-	-	-	1,59	1,21	1,06		1,97	2,55	1,76
		-	-	-	23,715	26,805	34,238		22,423	29,688	6,56
D4		-	-	-	1,98	1,62	0,71		2,05	3,45	1,25
		-	-	-	23,715	26,82	34,25		22,41	29,677	6,575
C1		-	0,92		-	-	1,03	0,62		2,91	
		-	18,812		-	-	34,275	14,073		29,703	
C2		-	1,6	-	-	-	0,7			2,72	
		-	18,768	-	-	-	34,245			29,697	
C3		0,67	0,81	0,35	-	-	0,82		1,81	2,55	
		15,655	18,432	19,283	-	-	34,277		22,648	29,71	
C4		2,34	0,28	0,5	-		0,7		3,32	2,44	
		15,632	18,813	19,295	-		34,295		22,655	29,72	
					-						
					-						
					-						

**Результати дослідження гострої токсичності досліджуваних екстрактів
при внутрішньошлунковому шляху введення (M±m, n=6)**

№ з/п	Присвоєний код зразка	Групи/Показники	Доза мг/кг	К-сть загиблих тварин/ к-сть тварини, які вижили
1.	-	Інтактні тварини	-	0/6
2.			-	0/6
3.			-	0/6
4.	P-2	40 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС <i>P. alba</i> Reichenb.	5000	0/6
5.			10000	0/6
6.			15000	0/6
7.	P-21	40 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ <i>P. alba</i> Reichenb.	5000	0/6
8.			10000	0/6
9.			15000	0/6
10.	P-3	70 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС <i>P. alba</i> Reichenb.	5000	0/6
11.			10000	0/6
12.			15000	0/6
13.	P-31	70 % спиртовий екстракт (1:20) КБ з <i>P. alba</i> Reichenb.	5000	0/6
14.			10000	0/6
15.			15000	0/6
16.	D-2	40 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС <i>D. elatum</i> L.	5000	0/6
17.			10000	0/6
18.			15000	0/6
19.	D-21	40 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ <i>D. elatum</i> L.	5000	0/6
20.			10000	0/6
21.			15000	0/6
35.			15000	0/6

22.	D-3	70 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС <i>D. elatum</i> L.	5000	0/6
23.			10000	0/6
24.			15000	0/6
25.	D-31	70 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ <i>D. elatum</i> L.	5000	0/6
25.			10000	0/6
26.			15000	0/6
27.	A-2	40 % спиртовий екстракт (1:40) з ЛРС <i>A. nemorosa</i> L.	5000	0/6
28.			10000	0/6
29.			15000	0/6
30.	A-21	40 % спиртовий екстракт (1:40) з КБ <i>A. nemorosa</i> L.	5000	0/6
31.			10000	0/6
32.			15000	0/6
33.	A-3	70 % спиртовий екстракт (1:40) з ЛРС <i>A. nemorosa</i> L.	5000	0/6
34.			10000	0/6
35.			15000	0/6
36.	A-31	70 % спиртовий екстракт (1:40) з КБ <i>A. nemorosa</i> L.	5000	0/6
37.			10000	0/6
38.			15000	0/6

Додаток Є

Таблиця Є.1

**Динаміка маси тіла щурів під час вивчення гострої токсичності
екстрактів при внутрішньошлунковому шляху введення (M±m, n=6)**

№ з/п	Код зразка	Групи тварин	Доза, мг/кг	Маса тварин на добу експерименту, г			
				1 доба	3 доба	7 доба	14 доба
1.	-	Інтактні тварини	-	193±4	196±2	200±3	211±3
2.	P-2	40 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС	5000	191±3	194±3	201±4	212±3
3.		<i>P. alba</i> Reichenb.	10000	196±3	198±2	202±4	212±4
4.			15000	194±2	198±2	201±3	210±3
5.	P-21	40 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ	5000	192±3	195±2	203±3	214±3
6.		<i>P. alba</i> Reichenb.	10000	194±3	196±2	200±4	211±4
7.			15000	193±2	197±3	200±2	211±3
8.	P-3	70 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС	5000	192±2	197±3	200±4	211±4
9.		<i>P. alba</i> Reichenb.	10000	193±2	198±3	202±3	213±3
10.			15000	190±3	195±3	199±2	210±3
11.	P-31	70 % спиртовий екстракт (1:20) з КБ	5000	191±4	195±3	201±3	213±2
12.		<i>P. alba</i> Reichenb.	10000	192±2	196±3	201±3	212±3
13.			15000	191±3	196±2	200±2	211±3
14.	P-12	40 % спиртовий екстракт (1:10) з ЛРС	5000	192±2	197±2	201±2	212±3
15.		<i>P. alba</i> Reichenb.	10000	194±4	199±3	203±4	216±3
16.			15000	191±3	197±3	202±3	212±4
17.	D-2	40 % спиртовий екстракт (1:20) з ЛРС	5000	192±3	196±3	202±3	214±3
18.		<i>D. elatum</i> L.	10000	191±4	197±3	203±3	215±3
19.			15000	191±3	197±3	204±2	215±3

Продовження додатку Є

Продовження табл. Є.1

20.	D-21	40 % спиртовий	5000	194±2	198±3	204±2	216±3
21.		екстракт (1:20) з КБ	10000	190±3	196±2	201±4	213±2
22.		<i>D. elatum</i> L.	15000	191±3	197±3	204±2	215±3
23.	D-3	70 % спиртовий	5000	192±3	197±3	202±3	216±3
24.		екстракт (1:20) з ЛРС	10000	192±3	198±2	206±3	217±3
25.		<i>D. elatum</i> L.	15000	190±2	197±3	202±3	216±3
25.	D-31	70 % спиртовий	5000	191±3	195±3	201±4	215±3
26.		екстракт (1:20) з КБ	10000	193±2	199±2	208±2	219±3
27.		<i>D. elatum</i> L.	15000	190±4	196±3	204±2	217±2
28.	A-2	40 % спиртовий	5000	191±3	197±3	204±2	214±4
29.		екстракт (1:20) з ЛРС	10000	192±3	198±3	205±3	216±4
30.		<i>A. nemorosa</i> L.	15000	193±3	197±2	202±3	215±3
31.	A-21	40 % спиртовий	5000	192±4	198±2	205±2	216±3
32.		екстракт (1:20) з КБ	10000	191±2	199±4	206±2	217±4
33.		<i>A. nemorosa</i> L.	15000	194±2	199±2	203±4	218±2
34.	A-3	70 % спиртовий	5000	191±2	196±3	202±3	213±3
35.		екстракт (1:20) з ЛРС	10000	190±3	197±2	203±3	217±3
36.		<i>A. nemorosa</i> L.	15000	191±3	198±3	204±3	218±3
37.	A-31	70 % спиртовий	5000	192±3	195±2	204±2	215±3
38.		екстракт (1:20) з КБ	10000	191±3	199±2	205±3	216±4
39.		<i>A. nemorosa</i> L.	15000	192±2	197±3	206±3	218±2

Додаток Ж

Таблиця Ж.1

Біохімічні показники плазми крові білих щурів при застосуванні екстрактів ЛРС (А-2, А-3) та КБ (А-21, А-31) *Anemone nemorosa* L. на моделі гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту (M±m, n = 8)

Групи/ Показники	Інтактний контроль	Модельна патологія	Карсил, 150 мг/кг	А-2, 2 мл/кг	А-21, 2 мл/кг	А-3, 2 мл/кг	А-31, 2 мл/кг
<i>АЛТ, Од/л</i>	63,2±7,1	780,3±31,5 ^{#a}	448,1±26,3 ^{#a,b}	692,4±31,3 ^{#a}	693,6±35,7 ^{#a}	580,75±41,3 ^{#a,b,c}	581,6±39,7 ^{#a,b,c}
<i>АСТ, Од/л</i>	179,1±21,8	1019,5±48,4 ^{#a}	712,4±36,2 ^{#a,b}	990,7±65,4 ^{#a}	991,3±43,7 ^{#a}	852,4±62,1 ^{#a,b}	854,3±47,0 ^{#a,b}
<i>ЛФ, Од/л</i>	347,5±15,9	711,6±54,6 ^{#a}	598,2±40,1 ^{#a}	701,2±50,3 ^{#a}	702,4±43,9 ^{#a}	613,6±33,7 ^{#a}	614,3±45,2 ^{#a}
<i>гама-ГТП, МО/л</i>	3,4±0,9	11,3±3,9	8,6±2,7	10,3±2,9	10,5±3,2	9,6±2,9	9,7±3,4
<i>Білірубін загальний, мг/дл</i>	5,1±1,8	12,4±3,0	9,41±2,5	11,9±3,1	12,1±1,8	10,2±3,4	10,6±1,8
<i>Загальний білок, г/л</i>	63,4±5,3	62,5±4,9	68,6±7,1	67,2±6,4	68,3±7,1	70,1±4,9	70,4±7,1
<i>ЛДГ, Од/л</i>	683,2±32,9	1110,71±61,9 ^{#a}	906,3±57,1 ^{*a}	1010,9±64,8 ^{#a}	1011,6±57,9 ^{#a}	978,2±47,6 ^{#a}	980,6±62,2 ^{#a}
<i>Холестерин загальний, ммоль/л</i>	1,45±0,19	3,93±1,0 ^{*a}	2,94±1,1	3,85±1,2	3,91±0,9	3,01±0,7	3,09±0,1
<i>Глюкоза, ммоль/л</i>	5,6±1,0	3,4±0,9	3,7±0,8	3,1±0,7	3,2±0,4	4,0±1,0	4,1±0,3

Примітки: * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,001$; ^a- по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b- по відношенню до групи “модельна патологія”; ^c- по відношенню до групи “Карсил”.

Продовж. дод. Ж

Таблиця Ж.2

**Біохімічні показники плазми крові білих щурів при застосуванні екстрактів ЛРС (D2 і D3) та КБ (D21 і D31)
Delphinium elatum L. на моделі гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту (M±m, n = 8)**

Групи/ Показники	Інтактний контроль	Модельна патологія	Карсил, 150 мг/кг	D-2, 2 мл/кг	D-21, 2 мл/кг	D-3, 2 мл /кг	D-31, 2 мл/кг
<i>АЛТ, Од/л</i>	63,2±7,1	780,3±31,5 ^{#a}	448,1±26,3 ^{#a,b}	701,6±32,5 ^{#a}	701,8±17,4 ^{#a}	702,2±46,3 ^{#a,b,c}	702,5±30,7 ^{#a,b,c}
<i>АСТ, Од/л</i>	179,1±21,8	1019,5±48,4 ^{#a}	712,4±36,2 ^{#a,b}	999,4±45,3 ^{#a}	1000,2±15,9 ^{#a}	996,3±66,1 ^{#a*b}	997,1±41,2 ^{#a*b}
<i>ЛФ, Од/л</i>	347,5±15,9	711,6±54,6 ^{#a}	598,2±40,1 ^{#a}	706,8±46,1 ^{#a}	706,9±37,2 ^a	695,3±24,1 ^{#a}	696,7±15,4 ^{#a}
<i>гама-ГТП, МО/л</i>	3,4±0,9	11,3±3,9	8,6±2,7	11,0±1,2	11,1±0,2	10,8±3,1	10,9±2,9
<i>Білірубін загальний, мг/дл</i>	5,1±1,8	12,4±3,0	9,41±2,5	12,1±1,9	12,1±2,7	11,2±1,8	11,4±2,3
<i>Загальний білок, г/л</i>	63,4±5,3	62,5±4,9	68,6±7,1	68,1±6,2	68,4±7,3	69,8±4,3	69,5±9,1
<i>ЛДГ, Од/л</i>	683,2±32,9	1110,71±61,9 ^{#a}	906,3±57,1 ^{*a}	1018,3±42,7 ^{#a}	1019,6±72,5 ^{#a}	1020,1±37,4 ^{#a}	1020,7±48,2 ^{#a}
<i>Холестерин загальний, ммоль/л</i>	1,45±0,19	3,93±1,0 ^{*a}	2,94±1,1	3,89±0,9	3,90±1,1	3,91±0,1	3,91±0,2
<i>Глюкоза, ммоль/л</i>	5,6±1,0	3,4±0,9	3,7±0,8	3,2±0,4	3,2±0,6	3,1±0,9	3,2±0,5

Примітки: * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,001$; ^a- по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b- по відношенню до групи “модельна патологія”; ^c- по відношенню до групи “Карсил”.

Продовження додатка Ж

Таблиця Ж.3

Біохімічні показники плазми крові білих щурів при застосуванні екстрактів ЛРС (P2 і P3) та КБ (P21 і P31) *Pulsatilla alba* Reichenb. на моделі гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту (M±m, n = 8)

Групи/ Показники	Інтактний контроль	Модельна патологія	Карсил, 150 мг/кг	P-2, 2 мл/кг	P-21, 2 мл/кг	P-3, 2 мл/кг	P-31, 2 мл/кг
<i>АЛТ, Од/л</i>	63,2±7,1	780,3±31,5 ^{#a}	448,1±26,3 ^{#a,b}	508,3±34,6 ^{#a}	509,8±27,3 ^{#a}	501,2±39,4 ^{#a,b,c}	501,2±41,3 ^{#a,b,c}
<i>АСТ, Од/л</i>	179,1±21,8	1019,5±48,4 ^{#a}	712,4±36,2 ^{#a,b}	834,3±25,9 ^{#a}	846,1±33,7 ^{#a}	826,2±57,0 ^{#a*b}	816,3±53,0 ^{#a*b}
<i>ЛФ, Од/л</i>	347,5±15,9	711,6±54,6 ^{#a}	598,2±40,1 ^{#a}	582,7±26,1 ^{#a}	583,3±31,2 ^{#a}	603,7±31,1 ^{#a}	602,8±30,1 ^{#a}
<i>гама-ГТП, МО/л</i>	3,4±0,9	11,3±3,9	8,6±2,7	8,6±4,2	8,4±1,6	7,8±2,7	7,5±1,7
<i>Білірубін загальний, мг/дл</i>	5,1±1,8	12,4±3,0	9,41±2,5	9,8±1,8	9,2±1,3	8,9±1,7	8,6±2,2
<i>Загальний білок, г/л</i>	63,4±5,3	62,5±4,9	68,6±7,1	59,3±4,1	59,7±9,1	56,1±3,3	55,8±1,4
<i>ЛДГ, Од/л</i>	683,2±32,9	1110,71±61,9 ^{#a}	906,3±57,1 ^{*a}	964,9±52,3 ^{#a}	955,8±47,6 ^{#a}	947,8±36,2 ^{#a}	945,1±44,3 ^{#a}
<i>Холестерин загальний, ммоль/л</i>	1,45±0,19	3,93±1,0 ^{*a}	2,94±1,1	3,16±1,0	3,06±1,1	3,01±0,2	3,00±0,7
<i>Глюкоза, ммоль/л</i>	5,6±1,0	3,4±0,9	3,7±0,8	4,1±0,3	4,0±0,2	3,9±0,6	3,8±0,1

Примітки: * - $p \leq 0,05$; # - $p \leq 0,001$; ^a - по відношенню до групи “інтактний контроль”; ^b - по відношенню до групи “модельна патологія”; ^c - по відношенню до групи “Карсил”.

Додаток 3

Таблиця 3.1

Протимікробна активність екстрактів *D. elatum* L. (метод дифузії в агар), $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90% екстракт		Контроль	70% екстракт		Контроль	40% екстракт		Контроль	20% екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (F-49)	18,0 ± 0,2	18,0 ± 0,3	9,0 ± 0,2	14,5 ± 0,4	14,0 ± 0,3	8,0 ± 0,3	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	16,0 ± 0,3	17,0 ± 0,4	9,0 ± 0,2	15,0 ± 0,2	14,0 ± 0,2	8,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11,0 ± 0,2	11,0 ± ,25	10,2 ± 0,4	12,0 ± 0,3	13,0 ± ,25	10,0 ± 0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i> BKIM-7038	14,0 ± ,35	14,0 ± 0,4	11,0 ± 0,5	14,0 ± 0,4	14,5 ± 0,2	10,0 ± 0,5	0	0	0	0	0	0

Продовж. дод. 3

Продовж. табл. 3.1

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	15,0 ± 0,3	15,0 ± 0,3	9,0 ± 0,6	12,7 ± 0,3	13,0 ± 0,3	8,0 ± 0,3	0	0	0	0	0	0
Клінічні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> №142	16,0 ± ,25	16,0 ± 0,3	9,0 ± 0,5	13,0 ± ,25	13,0 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> №5	12,0 ± ,25	13,0 ± ,35	10,0 ± 0,3	11,0 ± 0,3	13,0 ± 0,4	9,0 ± 0,25	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> 165	13,0 ± 0,2	13,5 ± 0,2	11,0 ± 0,2	10,5 ± 0,2	11,0 ± ,25	10,0 ± 0,4	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Продовження додатку 3

Таблиця 3.2

Протигрибкова активність екстрактів *D. elatum* (метод дифузії в агар), $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90% екстракт		Контроль	70% екстракт		Контроль	40% екстракт		Контроль	20% екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
<i>Candida albicans</i> ATCC 668-853	13,0 ± 0,4	14,0 ± 0,3	11,0 ± 0,6	11,0 ± 0,3	11,0 ± 0,2	0	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,4	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	13,0 ± 0,3	14,0 ± 0,2	11,0 ± 0,4	11,0 ± 0,2	11,0 ± 0,2	0	7,0 ± 0,2	7,5 ± 0,4	0	0	0	0
Клінічні штами												
<i>Candida membranifaciens</i> 117 (ket)	12,0 ± 0,3	12,0 ± 0,4	10,0 ± 0,7	9,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> 60 (nis)	11,5 ± 0,3	12,0 ± 0,4	10,0 ± 0,4	9,0 ± 0,2	10,0 ± 0,3	0	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Продовження додатку 3

Таблиця 3.3

Показники протимікробної та протигрибкової дії екстрактів *D. elatum* L. (метод серійних розведень), $p < 0,05$

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	90% екстракт						70% екстракт					
	1:1		1:2		1:4		1:1		1:2		1:4	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
<i>Candida albicans</i> ATCC 668653	++	++	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49)	+	++	+	++	-	-	+	++	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	++	++	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	++	++	+	++	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ВКІІМ-7038	++	++	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту												
	40% екстракт						20% екстракт						
	1:1		1:2		1:4		1:1		1:2		1:4		
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	
<i>Candida albicans</i> ATCC 668653	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ВКІІМ-7038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: наявність бактерицидних властивостей – «++», наявність бактериостатичних властивостей – «+», відсутність бактерицидних і бактериостатичних властивостей – «-»; КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Протимікробна активність екстрактів *P. alba* (метод дифузії в агар), $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90 % екстракт		Контроль	70 % екстракт		Контроль	40 % екстракт		Контроль	20% екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (F-49)	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,3	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,4	8,0 ± 0,3	7,8 ± 0,3	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	9,0 ± 0,3	8,0 ± 0,4	8,8 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,6	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,5 ± 0,2	14,3 ± 0,25	10,0 ± 0,4	13,0 ± 0,5	12,5 ± 0,7	10,2 ± 0,2	0	0	0	0	0	0

Продовж. дод. 3

Продовж. табл.3.4

<i>Bacillus licheniformis</i> ВКПМ-7038	18,0 ± 0,25	17,0 ± 0,4	11,5 ± 0,5	17,0 ± 0,4	17,5 ± 0,2	10,5 ± 0,5	11,0 ± 0,2	11,0 ± 0,3	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	12,0 ± 0,3	12,0 ± 0,3	9,3 ± 0,6	10,7 ± 0,3	11,0 ± 0,3	8,2 ± 0,3	0	0	0	0	0	0
Клінічні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> №142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> №5	12,5 ± 0,3	13,5 ± 0,5	10,5 ± 0,3	11,0 ± 0,3	11,5 ± 0,4	9,6 ± 0,25	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> 165	14,5 ± 0,5	15,0 ± 0,2	11,3 ± 0,2	10,5 ± 0,3	11,0 ± 0,5	10,2 ± 0,4	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Протигрибкова активність екстрактів *P. alba* (метод дифузії в агар), $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90% екстракт		Контроль	70% екстракт		Контроль	40% екстракт		Контроль	20% екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
<i>Candida albicans</i> ATCC 668-853	12,0 ± 0,4	12,0 ± 0,3	10,0 ± 0,6	14,0 ± 0,3	14,2 ± 0,2	8,0 ± 0,2	7,2 ± 0,2	7,2 ± 0,4	6,0 ± 0,2	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	12,0 ± 0,3	12,0 ± 0,2	10,0 ± 0,4	14,0 ± 0,2	13,5 ± 0,2	8,0 ± 0,2	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,4	6,0 ± 0,2	0	0	0
Клінічні штами												
<i>Candida membranifaciens</i> 117 (ket)	11,2 ± 0,3	11,0 ± 0,2	9,0 ± 0,5	9,0 ± 0,2	10,0 ± 0,4	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> 60 (nis)	11,0 ± 0,3	11,0 ± 0,3	9,5 ± 0,5	9,0 ± 0,2	10,5 ± 0,4	0	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Показники протимікробної та протигрибкової дії екстрактів *P. alba* (метод серійних розведень), $p < 0,05$

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	90% екстракт						70% екстракт					
	1:1		1:2		1:4		1:1		1:2		1:4	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
<i>Candida albicans</i> ATCC 668653	++	++	+	+	-	-	++	++	++	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	++	++	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> BKІІМ-7038	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	++	++	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	40% екстракт						20% екстракт					
	1:1		1:2		1:4		1:1		1:2		1:4	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
<i>Candida albicans</i> ATCC 668653	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ВКІІМ-7038	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітки: наявність бактерицидних властивостей – «++», наявність бактеріостатичних властивостей – «+», відсутність бактерицидних і бактеріостатичних властивостей – «-»; КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Протимікробна активність екстрактів *A. nemorosa* L. (метод дифузії в агар), $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90% екстракт		Контроль	70% екстракт		Контроль	40% екстракт		Контроль	20% екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (F-49)	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,2 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,5	7,5 ± 0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,3 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,2 ± 0,5	7,0 ± 0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,2 ± 0,2	9,2 ± 0,2	9,5 ± 0,4	8,5 ± 0,5	8,2 ± 0,2	9,0 ± 0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i> VKIM-7038	10,0 ± 0,5	10,0 ± 0,2	10,5 ± 0,2	8,5 ± 0,5	8,5 ± 0,5	9,0 ± 0,5	0	0	0	0	0	0

Продовж. дод. 3

Продовження табл. 3.7

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	9,5 ± 0,2	7,0 ± 0,5	7,2 ± 0,2	7,5 ± 0,5	0	0	0	0	0	0
Клінічні штами												
<i>Staphylococcus aureus</i> №142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> №5	8,5 ± 0,5	8,5 ± 0,2	9,0 ± 0,2	8,5 ± 0,5	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,5	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> 165	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,5	10,0 ± 0,2	9,5 ± 0,5	10,0 ± 0,5	10,0 ± 0,5	0	0	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировин

Протигрибкова активність екстрактів *A. nemorosa* L. (метод дифузії в агар), $p < 0,05$

Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм											
	90% екстракт		Контроль	70% екстракт		Контроль	40% екстракт		Контроль	20% екстракт		Контроль
	ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ		ЛРС	КБ	
Стандартні штами												
<i>Candida albicans</i> ATCC 668-853	11,0 ± 0,4	11,0 ± 0,4	9,0 ± 0,6	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,4	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	11,0 ± 0,3	11,0 ± 0,2	9,0 ± 0,4	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	9,5 ± 0,4	0	0	0	0
Клінічні штами												
<i>Candida membranifaciens</i> 117 (ket)	10,2 ± 0,3	10,0 ± 0,2	8,0 ± 0,5	0	0	0	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,4	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> 60 (nis)	10,0 ± 0,3	10,0 ± 0,3	8,5 ± 0,5	0	0	0	7,0 ± 0,2	7,5 ± 0,4	0	0	0	0

Примітки: КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Показники фунгібактерицидної активності екстрактів *A. nemorosa* L. (метод серійних розведень), $p < 0,05$

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	90% екстракт						70% екстракт					
	1:1		1:2		1:4		1:1		1:2		1:4	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
<i>Candida albicans</i> ATCC 668653	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> BKІІМ-7038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Стандартні штами мікроорганізмів	Розведення екстракту											
	40% екстракт						20% екстракт					
	1:1		1:2		1:4		1:1		1:2		1:4	
	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ	ЛРС	КБ
<i>Candida albicans</i> ATCC 668653	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ВКІІМ-7038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: наявність бактерицидних властивостей – «++», наявність бактериостатичних властивостей – «+», відсутність бактерицидних і бактериостатичних властивостей – «-»; КБ – калюсна біомаса, ЛРС – лікарська рослинна сировина

Додаток И

Library Search Report

Data Path : D:\DATA\EM\
 Data File : RT11955.D
 Acq On : 12 Jun 2017 11:35
 Operator :
 Sample : AX (1:1)
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST11.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	3.144	0.04	C:\Database\NIST11.L n-Heptadecanol-1	107663	001454-85-9	35
			3-Methylpenta-1,4-diene-3-ol	3258	000918-86-5	30
			Undecane, 2,4-dimethyl-	48863	017312-80-0	30
2	3.258	0.02	C:\Database\NIST11.L Trichloromethane	8988	000067-66-3	53
			Ethane, 1,1,2,2-tetrachloro-	35232	000079-34-5	50
			Trichloromethane	8989	000067-66-3	49
3	3.573	0.03	C:\Database\NIST11.L Methane, tribromo-	102723	000075-25-2	91
			Methane, tribromo-	102722	000075-25-2	50
			Methane, tribromo-	102721	000075-25-2	42
4	3.730	0.09	C:\Database\NIST11.L 2-Heptanone	7429	000110-43-0	49
			2-Hexanone, 5-methyl-	7508	000110-12-3	46
			2-Heptanone	7426	000110-43-0	46
5	3.873	0.02	C:\Database\NIST11.L 4-Penten-1-ol, 2,2,4-trimethyl-	12627	053907-70-3	35
			4-Octene, (Z)-	6635	007642-15-1	35
			Cyclopropanecarboxylic acid, 1-ami no-	4043	022059-21-8	35
6	3.973	0.06	C:\Database\NIST11.L Heptanal	7424	000111-71-7	72
			Heptanal	7425	000111-71-7	72
			Heptanal	7422	000111-71-7	72
7	5.559	0.02	C:\Database\NIST11.L Octadecane, 1-chloro-	134595	003386-33-2	50
			Decane, 3,8-dimethyl-	38349	017312-55-9	50
			Octane, 2,5,6-trimethyl-	28443	062016-14-2	46
8	5.816	0.03	C:\Database\NIST11.L 5,15-Dimethylnonadecane	141438	1000131-09-1	25
			Oxalic acid, dodecyl hexyl ester	178372	1000309-24-6	22
			Trichloroacetic acid, 4-tetradecyl ester	189054	1000282-06-8	22
9	5.902	0.07	C:\Database\NIST11.L Decane	19157	000124-18-5	81
			Pentadecane, 2-methyl-	83043	001560-93-6	72
			Nonane	12662	000111-84-2	68
10	6.331	0.05	C:\Database\NIST11.L 1-Propene, 3-propoxy-	3849	001471-03-0	38
			Cyclohexanecarboxylic acid, 2-meth oxyethyl ester	49900	1000330-87-5	30
			Ethylamine, 2-[1-(p-chlorophenyl)- 1-phenylethoxy]-N,N-dimethyl-	147160	000077-38-3	27

11 6.659 0.27 C:\Database\NIST11.L
 Octanal 12425 000124-13-0 50
 Butane, 1-(ethenyloxy)- 3872 000111-34-2 43
 2,4,6,8-Tetramethyl-1-undecene 69591 059920-26-2 43

12 6.817 0.07 C:\Database\NIST11.L
 Undecane, 4,8-dimethyl- 48862 017301-33-6 62
 Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129511 000638-36-8 58
 Tetradecane, 4,11-dimethyl- 83048 055045-12-0 58

13 6.960 0.12 C:\Database\NIST11.L
 Heptane, 2,3-dimethyl- 12693 003074-71-3 58
 Nonane, 2,5-dimethyl- 28440 017302-27-1 49
 Hexane, 1-(hexyloxy)-2-methyl- 61361 074421-17-3 47

14 7.117 0.04 C:\Database\NIST11.L
 Tricosane, 2-methyl- 175564 001928-30-9 58
 Undecane, 2-methyl- 38330 007045-71-8 52
 Nonane, 2,5-dimethyl- 28440 017302-27-1 52

15 7.202 0.14 C:\Database\NIST11.L
 Decane, 4-methyl- 28426 002847-72-5 81
 Decane, 4-methyl- 28434 002847-72-5 74
 Nonane, 2,6-dimethyl- 28437 017302-28-2 59

16 7.317 1.41 C:\Database\NIST11.L
 D-Limonene 15682 005989-27-5 97
 D-Limonene 15678 005989-27-5 94
 Limonene 15668 000138-86-3 94

17 7.417 0.07 C:\Database\NIST11.L
 Formic acid, heptyl ester 20883 000112-23-2 72
 1-Heptanol 8324 000111-70-6 72
 Cyclobutanone, 2,3,3-trimethyl- 6594 028290-01-9 58

18 7.988 0.06 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129509 000638-36-8 62
 Tridecanol, 2-ethyl-2-methyl- 96002 1000115-66-1 59
 2-Bromononane 66516 002216-35-5 52

19 8.103 0.05 C:\Database\NIST11.L
 Pentadecane, 4-methyl- 83044 002801-87-8 70
 Tridecane, 1-iodo- 152416 035599-77-0 70
 Decane, 3-methyl- 28429 013151-34-3 58

20 8.231 0.56 C:\Database\NIST11.L
 1-Iodo-2-methylnonane 116708 1000101-47-9 91
 Undecane, 4,7-dimethyl- 48860 017301-32-5 78
 Decane, 4-ethyl- 38320 001636-44-8 74

21 8.389 0.21 C:\Database\NIST11.L
 Dodecane 38315 000112-40-3 83
 Octane, 2,4,6-trimethyl- 28445 062016-37-9 80
 2,6-Dimethyldecane 38322 013150-81-7 68

22 8.860 0.09 C:\Database\NIST11.L
 Cyclooctane, 1,4-dimethyl-, cis- 18039 013151-99-0 58
 2-Undecene, 4-methyl- 36789 091695-32-8 43
 Trifluoroacetoxy hexadecane 175128 006222-03-3 38

23 8.975 0.07 C:\Database\NIST11.L
 3-Tridecene, (E)- 47272 041446-57-5 62
 5-Undecene, (E)- 27037 000764-97-6 49
 2-Nonenal, (Z)- 18663 060784-31-8 46

24 9.289 0.08 C:\Database\NIST11.L
 Nonane, 5-butyl- 48837 017312-63-9 58
 Pentane, 3-ethyl-2-methyl- 7668 000609-26-7 53
 Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 50

25 9.546 0.20 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 4-methyl- 105896 026429-11-8 74
 Dodecane, 4,6-dimethyl- 59899 061141-72-8 64

1-Iodo-2-methylnonane 116708 1000101-47-9 64

26 9.603 0.25 C:\Database\NIST11.L
 Nonanal 19922 000124-19-6 72
 Nonanal 19920 000124-19-6 64
 Nonanal 19919 000124-19-6 59

27 9.703 0.08 C:\Database\NIST11.L
 Undecane, 2-methyl- 38330 007045-71-8 70
 Decane, 2-methyl- 28427 006975-98-0 68
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 58

28 9.903 0.12 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl 141442 054833-48-6 60
 Heptadecane, 8-methyl- 105898 013287-23-5 49
 Undecane, 2-methyl- 38324 007045-71-8 46

29 10.361 0.10 C:\Database\NIST11.L
 Cyclooctane 6631 000292-64-8 76
 1-Octanol 13638 000111-87-5 52
 1-Octanol 13630 000111-87-5 52

30 11.204 0.39 C:\Database\NIST11.L
 Silane, cyclohexyldimethoxymethyl- 52150 017865-32-6 91
 Silane, dimethoxydimethyl- 9179 001112-39-6 53
 Silane, dimethoxydimethyl- 9180 001112-39-6 47

31 11.332 0.06 C:\Database\NIST11.L
 Undecane, 2-methyl- 38329 007045-71-8 76
 Pentadecane, 3-methyl- 83037 002882-96-4 64
 Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 64

32 11.675 0.09 C:\Database\NIST11.L
 Undecane, 2,6-dimethyl- 48875 017301-23-4 76
 Oxalic acid, isobutyl nonyl ester 120800 1000309-37-4 74
 Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129511 000638-36-8 72

33 12.176 0.08 C:\Database\NIST11.L
 Silane, ethoxytrimethyl- 8776 001825-62-3 58
 2-Dimethylsilyloxy-pentane 22042 053691-19-3 38
 2-Dimethylsilyloxytridecane 109160 1000278-83-1 38

34 12.361 0.08 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecane 83024 000544-76-3 74
 Undecane, 2,10-dimethyl- 48884 017301-27-8 72
 Tridecane 48833 000629-50-5 72

35 12.504 0.20 C:\Database\NIST11.L
 2H-Pyran, tetrahydro-2-(12-pentadecyl-
 cyonyloxy)- 151476 056666-38-7 78
 Heptane, 2,4-dimethyl- 12695 002213-23-2 64
 Octan-2-yl 2-methylbutanoate 72676 1000372-74-3 50

36 12.661 0.11 C:\Database\NIST11.L
 2H-Tetrahydropyran, 2-[(1-ethenyl-
 1,5-dimethylhex-4-enyl)oxy]- 92389 1000130-68-3 64
 1-Bromo-7-(tetrahydro-2-pyranyloxy-
 heptane 125417 010160-25-5 59
 1,2,6-Hexanetriol 15087 000106-69-4 53

37 12.761 0.25 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 2-methyl- 105894 001560-89-0 72
 Undecane, 2,6-dimethyl- 48875 017301-23-4 60
 Octadecane, 5-methyl- 117643 025117-35-5 59

38 12.862 0.07 C:\Database\NIST11.L
 1,2,6-Hexanetriol 15087 000106-69-4 64
 1,2,6-Hexanetriol 15086 000106-69-4 64
 2,7-Dimethyl-2,6-octadien-4-ol 26755 037665-99-9 59

39 12.976 0.25 C:\Database\NIST11.L
 Decane, 3-ethyl-3-methyl- 48910 017312-66-2 53
 Sulfurous acid, hexyl pentadecyl e 200446 1000309-13-7 50

	ster		
	Heptadecane, 4-methyl-	105896	026429-11-8 49
40	13.362 0.12 C:\Database\NIST11.L		
	.gamma.-Dodecalactone	59519	002305-05-7 43
	Pentane, 3-(bromomethyl)-	33934	003814-34-4 38
	Hexane, 2,3,5-trimethyl-	12717	001069-53-0 38
41	13.576 0.22 C:\Database\NIST11.L		
	Sulfurous acid, hexyl pentadecyl e	200446	1000309-13-7 80
	ster		
	Hexane, 2,3,5-trimethyl-	12708	001069-53-0 59
	Heptane, 2,3-dimethyl-	12694	003074-71-3 58
42	13.748 0.13 C:\Database\NIST11.L		
	Sulfurous acid, hexyl pentadecyl e	200446	1000309-13-7 86
	ster		
	Decane, 3,8-dimethyl-	38349	017312-55-9 64
	Oxirane, 2-methyl-2-pentyl-	12608	053907-75-8 58
43	13.819 0.06 C:\Database\NIST11.L		
	3-Heptanone, 2-methyl-	12543	013019-20-0 53
	3-Hexanone, 2,5-dimethyl-	12597	001888-57-9 53
	Decane, 1-iodo-	116706	002050-77-3 50
44	13.890 0.18 C:\Database\NIST11.L		
	Dodecane, 4,6-dimethyl-	59900	061141-72-8 70
	Tridecane, 6-propyl-	83030	055045-10-8 68
	Pentadecane	71395	000629-62-9 64
45	14.133 0.39 C:\Database\NIST11.L		
	2,4-Dimethyldodecane	59886	006117-99-3 87
	Undecane, 2,4-dimethyl-	48880	017312-80-0 64
	Octadecane, 1-iodo-	202264	000629-93-6 58
46	14.376 0.16 C:\Database\NIST11.L		
	Hexane, 2,3,5-trimethyl-	12718	001069-53-0 53
	Oxalic acid, butyl isohexyl ester	85744	1000309-32-7 50
	Hexane, 2,4-dimethyl-	7642	000589-43-5 50
47	14.562 0.67 C:\Database\NIST11.L		
	Nonadecane	117637	000629-92-5 90
	Heneicosane	141426	000629-94-7 86
	Eicosane, 10-methyl-	141431	054833-23-7 83
48	14.791 0.24 C:\Database\NIST11.L		
	Tridecane, 7-propyl-	83029	055045-09-5 90
	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	129513	000638-36-8 76
	Eicosane	129491	000112-95-8 74
49	14.948 0.15 C:\Database\NIST11.L		
	Hexadecane, 7,9-dimethyl-	105903	021164-95-4 86
	Dodecane, 4,6-dimethyl-	59900	061141-72-8 64
	Tridecane, 4-methyl-	59884	026730-12-1 64
50	15.134 0.21 C:\Database\NIST11.L		
	Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl	161094	1000309-12-5 86
	l ester		
	Tridecane, 5-methyl-	59885	025117-31-1 60
	Oxalic acid, isohexyl neopentyl es	97086	1000309-73-0 59
	ter		
51	15.248 0.15 C:\Database\NIST11.L		
	Octane, 4-methyl-	12674	002216-34-4 49
	Hexane, 3-ethyl-	7623	000619-99-8 47
	2-Undecanethiol, 2-methyl-	62654	010059-13-9 46
52	15.334 0.09 C:\Database\NIST11.L		
	Undecane, 2,4-dimethyl-	48863	017312-80-0 90
	Heptane, 2,4-dimethyl-	12697	002213-23-2 68
	Heptane, 2,4-dimethyl-	12695	002213-23-2 68
53	15.477 0.14 C:\Database\NIST11.L		

	5-Iodo-nonane	106030 059456-19-8 46
	2-Undecanethiol, 2-methyl-	62654 010059-13-9 46
	9-Eicosene, (E)-	127770 074685-29-3 43
54	15.591 0.30 C:\Database\NIST11.L	
	Methacrylic anhydride	27401 000760-93-0 59
	2-Butenoic acid, 2-methylpropyl ester	19795 000589-66-2 59
	2-Butenoic acid, 4-nitrophenyl ester, (E)-	66650 014617-88-0 59
55	15.691 0.16 C:\Database\NIST11.L	
	Citronellal	26634 000106-23-0 46
	2-Pentene, 4-methyl-, (Z)-	1507 000691-38-3 38
	5-Hexen-2-one, 5-methyl-	6517 003240-09-3 38
56	15.805 0.30 C:\Database\NIST11.L	
	Decane, 2,4,6-trimethyl-	48885 062108-27-4 80
	Octane, 5-ethyl-2-methyl-	28449 062016-18-6 70
	Nonane, 5-butyl-	48836 017312-63-9 68
57	16.048 0.16 C:\Database\NIST11.L	
	Octane, 2,4,6-trimethyl-	28445 062016-37-9 72
	4-Methyldocosane	164581 025117-30-0 72
	Pentadecane	71396 000629-62-9 72
58	16.234 0.06 C:\Database\NIST11.L	
	Decane, 2-methyl-	28431 006975-98-0 58
	Decane, 2-methyl-	28427 006975-98-0 58
	Dodecane, 2-methyl-	48854 001560-97-0 52
59	16.291 0.08 C:\Database\NIST11.L	
	Dodecane	38315 000112-40-3 87
	Nonadecane	117637 000629-92-5 83
	Eicosane	129491 000112-95-8 83
60	16.777 0.08 C:\Database\NIST11.L	
	Tricosane, 2-methyl-	175565 001928-30-9 83
	Eicosane, 10-methyl-	141431 054833-23-7 80
	Tridecane, 3-methyl-	59894 006418-41-3 74
61	17.020 0.10 C:\Database\NIST11.L	
	Tricosane, 2-methyl-	175566 001928-30-9 93
	Undecane, 2-methyl-	38330 007045-71-8 90
	Tricosane, 2-methyl-	175564 001928-30-9 89
62	17.706 0.09 C:\Database\NIST11.L	
	Tetradecane	59880 000629-59-4 94
	Tetradecane	59881 000629-59-4 93
	Decane, 3,6-dimethyl-	38343 017312-53-7 91
63	17.935 0.10 C:\Database\NIST11.L	
	Tricosane, 2-methyl-	175564 001928-30-9 94
	Octadecane	105883 000593-45-3 94
	Tetradecane	59881 000629-59-4 80
64	18.049 0.17 C:\Database\NIST11.L	
	1-Iodoundecane	128607 004282-44-4 89
	Undecane, 3-methyl-	38327 001002-43-3 74
	Decane, 1-iodo-	116706 002050-77-3 64
65	18.249 0.19 C:\Database\NIST11.L	
	Heptadecane	94346 000629-78-7 93
	Heptadecane	94345 000629-78-7 91
	Tridecane, 6-propyl-	83030 055045-10-8 87
66	18.663 0.10 C:\Database\NIST11.L	
	Tridecane, 2-methyl-	59889 001560-96-9 87
	Heptacosane	202661 000593-49-7 87
	Pentadecane, 2-methyl-	83043 001560-93-6 87
67	18.821 0.04 C:\Database\NIST11.L	
	2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol	39810 091337-07-4 83

Tritetracontane 241174 007098-21-7 64
 Sulfurous acid, 2-propyl tridecyl ester 149373 1000309-12-4 62

68 19.006 0.21 C:\Database\NIST11.L
 Pentadecane, 2,6,10-trimethyl- 105904 003892-00-0 93
 Heptadecane 94344 000629-78-7 91
 Octadecane, 2-methyl- 117648 001560-88-9 90

69 19.249 0.45 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 9-hexyl- 164584 055124-79-3 93
 Pentadecane 71395 000629-62-9 91
 Hexacosane 194493 000630-01-3 90

70 19.392 0.09 C:\Database\NIST11.L
 Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 91
 Hexacosane 194493 000630-01-3 91
 Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl)- 194508 055282-11-6 90

71 19.535 0.06 C:\Database\NIST11.L
 Tridecane, 4-methyl- 59884 026730-12-1 90
 Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl 141442 054833-48-6 87
 Octadecane, 1-iodo- 202264 000629-93-6 87

72 19.721 0.03 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 86
 Undecane, 2,10-dimethyl- 48884 017301-27-8 83
 Octane, 2,4,6-trimethyl- 28445 062016-37-9 80

73 19.921 0.43 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecane 83028 000544-76-3 94
 Octadecane, 1-iodo- 202264 000629-93-6 91
 Heneicosane 141426 000629-94-7 91

74 20.050 0.64 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 4-methyl- 105896 026429-11-8 72
 Octadecane, 1-iodo- 202264 000629-93-6 72
 Decane, 2,3,6-trimethyl- 48886 062238-12-4 64

75 20.150 0.19 C:\Database\NIST11.L
 2-Bromotetradecane 124147 074036-95-6 91
 Eicosane 129491 000112-95-8 90
 Octadecane, 5-methyl- 117643 025117-35-5 90

76 20.278 0.14 C:\Database\NIST11.L
 Octadecane, 2-methyl- 117648 001560-88-9 91
 Eicosane 129490 000112-95-8 91
 Tetracosane 175559 000646-31-1 91

77 20.407 0.05 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129490 000112-95-8 93
 Octadecane 105885 000593-45-3 93
 Heptadecane 94345 000629-78-7 93

78 20.478 0.08 C:\Database\NIST11.L
 Dodecane, 2,6,11-trimethyl- 71406 031295-56-4 81
 Nonadecane, 9-methyl- 129499 013287-24-6 70
 Octadecane, 2,6-dimethyl- 129505 075163-97-2 64

79 20.593 1.04 C:\Database\NIST11.L
 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) 66104 000096-76-4 96
 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) 66115 000096-76-4 94
 Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl) 66107 005875-45-6 91

80 20.707 0.20 C:\Database\NIST11.L
 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) 66104 000096-76-4 56
 1-Decanol, 2-octyl- 119525 045235-48-1 46
 1-Dodecanol, 2-hexyl- 119526 110225-00-8 46

81 20.936 0.20 C:\Database\NIST11.L
 Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester 161094 1000309-12-5 86
 Sulfurous acid, 2-propyl tridecyl ester 149373 1000309-12-4 72

	ester		
	1-Chloroeicosane	158254	042217-02-7 64
82	20.993	0.08	C:\Database\NIST11.L
	Heptadecane	94345	000629-78-7 93
	Pentadecane, 4-methyl-	83044	002801-87-8 90
	Heptacosane	202661	000593-49-7 87
83	21.121	0.41	C:\Database\NIST11.L
	Eicosane	129490	000112-95-8 90
	Heptadecane	94344	000629-78-7 86
	Heneicosane	141424	000629-94-7 86
84	21.350	0.14	C:\Database\NIST11.L
	Octadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	153233	054964-82-8 68
	Decane, 2,3,7-trimethyl-	48887	062238-13-5 64
	Undecane, 2-methyl-	38330	007045-71-8 62
85	21.579	0.07	C:\Database\NIST11.L
	Sulfurous acid, butyl tetradecyl ester	172308	1000309-18-1 80
	2-methyloctacosane	215181	1000376-72-8 64
	Nonadecane, 2-methyl-	129501	001560-86-7 62
86	21.636	0.07	C:\Database\NIST11.L
	Pentadecane, 2-methyl-	83043	001560-93-6 94
	Pentadecane, 2-methyl-	83035	001560-93-6 93
	Hentriacontane	223852	000630-04-6 87
87	21.822	0.06	C:\Database\NIST11.L
	Nonadecane	117637	000629-92-5 94
	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl-	94356	014905-56-7 91
	Heptadecane, 2-methyl-	105893	001560-89-0 90
88	22.093	0.02	C:\Database\NIST11.L
	Heptadecane, 8-methyl-	105898	013287-23-5 87
	Dodecane, 2-methyl-	48854	001560-97-0 83
	Hexadecane, 7,9-dimethyl-	105903	021164-95-4 78
89	22.393	0.10	C:\Database\NIST11.L
	9-Decenoic acid, 2,4-dimethyl-, methyl ester, (R,R)-(-)-	71143	031183-23-0 55
	Nonanoic acid, ethyl ester	50083	000123-29-5 55
	Dodecanoic acid, ethyl ester	84474	000106-33-2 55
90	22.493	0.06	C:\Database\NIST11.L
	Hexadecane	83023	000544-76-3 96
	Hexadecane	83027	000544-76-3 93
	Dodecane, 2-methyl-	48851	001560-97-0 90
91	22.665	0.10	C:\Database\NIST11.L
	Docosane	153223	000629-97-0 95
	Tridecane, 1-iodo-	152416	035599-77-0 93
	Heneicosane, 11-pentyl-	194505	014739-72-1 91
92	22.736	0.13	C:\Database\NIST11.L
	Dodecane, 2,5-dimethyl-	59898	056292-65-0 90
	Undecane	28423	001120-21-4 87
	Tetradecane, 3-methyl-	71402	018435-22-8 83
93	22.965	0.05	C:\Database\NIST11.L
	Hexadecane	83024	000544-76-3 70
	Decane, 3,7-dimethyl-	38338	017312-54-8 62
	Undecane, 4,8-dimethyl-	48862	017301-33-6 62
94	23.265	0.24	C:\Database\NIST11.L
	Octadecane	105885	000593-45-3 91
	Heneicosane	141425	000629-94-7 91
	Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl)-	194508	055282-11-6 90
95	23.594	0.31	C:\Database\NIST11.L
	Docosane, 2,21-dimethyl-	175569	077536-31-3 96
	Octadecane	105883	000593-45-3 95

	Tricosane, 2-methyl-	175565 001928-30-9 94
96	23.808 0.12 C:\Database\NIST11.L	
	Nonadecane, 9-methyl-	129502 013287-24-6 94
	Tetracosane	175558 000646-31-1 93
	Tricosane, 2-methyl-	175566 001928-30-9 87
97	23.894 0.14 C:\Database\NIST11.L	
	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl-	94356 014905-56-7 81
	5,5,7,7-Tetraethylundecane	117656 1000360-42-0 80
	Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	71410 003891-98-3 72
98	24.122 0.21 C:\Database\NIST11.L	
	Tetracosane	175559 000646-31-1 90
	Hexacosane	194493 000630-01-3 90
	Eicosane	129491 000112-95-8 90
99	24.251 0.18 C:\Database\NIST11.L	
	Tetradecane, 4-ethyl-	83033 055045-14-2 91
	Octadecane	105886 000593-45-3 91
	Heptadecane	94344 000629-78-7 91
100	24.408 0.26 C:\Database\NIST11.L	
	Heneicosane	141424 000629-94-7 91
	Eicosane	129490 000112-95-8 91
	Heptadecane, 9-hexyl-	164584 055124-79-3 91
101	24.523 0.11 C:\Database\NIST11.L	
	Eicosane	129490 000112-95-8 92
	Tetracosane	175556 000646-31-1 91
	Docosane, 11-butyl-	194500 013475-76-8 90
102	24.651 0.24 C:\Database\NIST11.L	
	Octadecane, 2-methyl-	117648 001560-88-9 93
	Eicosane	129490 000112-95-8 83
	Heneicosane	141426 000629-94-7 83
103	24.723 0.22 C:\Database\NIST11.L	
	Hexadecane	83028 000544-76-3 94
	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	129513 000638-36-8 89
	Eicosane	129493 000112-95-8 78
104	24.894 0.78 C:\Database\NIST11.L	
	Heneicosane	141426 000629-94-7 91
	Hexadecane	83026 000544-76-3 87
	Heptadecane	94346 000629-78-7 87
105	25.080 0.27 C:\Database\NIST11.L	
	Octadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	153233 054964-82-8 94
	Tetracosane	175559 000646-31-1 94
	Tetracosane	175556 000646-31-1 93
106	25.209 0.20 C:\Database\NIST11.L	
	Octacosane	209565 000630-02-4 91
	Hexacosane	194494 000630-01-3 87
	Pentadecane, 7-methyl-	83040 006165-40-8 86
107	25.480 0.29 C:\Database\NIST11.L	
	Tridecane, 1-iodo-	152416 035599-77-0 70
	Nonadecane	117637 000629-92-5 68
	Tetracosane	175559 000646-31-1 62
108	25.680 0.24 C:\Database\NIST11.L	
	Nonadecane	117638 000629-92-5 91
	Heptadecane	94345 000629-78-7 91
	Dodecane, 2-methyl-	48854 001560-97-0 90
109	25.809 0.40 C:\Database\NIST11.L	
	Hexadecane	83028 000544-76-3 91
	2-Bromotetradecane	124147 074036-95-6 87
	Tetratetracontane	241528 007098-22-8 86
110	26.095 0.31 C:\Database\NIST11.L	

	Docosane, 2,21-dimethyl-	175569 077536-31-3 80
	Octadecane, 1-bromo-	170752 000112-89-0 68
	Hexacosane	194493 000630-01-3 62
111	26.309 0.16 C:\Database\NIST11.L	
	Heptadecane	94344 000629-78-7 93
	Heptacosane	202661 000593-49-7 83
	Hexacosane	194493 000630-01-3 80
112	26.523 0.07 C:\Database\NIST11.L	
	Nonadecane, 2-methyl-	129501 001560-86-7 62
	Octadecane, 1-bromo-	170753 000112-89-0 58
	Hexadecane, 7,9-dimethyl-	105903 021164-95-4 55
113	26.795 0.08 C:\Database\NIST11.L	
	Octadecane	105884 000593-45-3 96
	Heneicosane	141425 000629-94-7 96
	Octadecane	105885 000593-45-3 92
114	26.909 0.13 C:\Database\NIST11.L	
	Eicosane	129493 000112-95-8 96
	Tricosane, 2-methyl-	175564 001928-30-9 96
	Decane, 3,8-dimethyl-	38349 017312-55-9 94
115	27.109 0.03 C:\Database\NIST11.L	
	Pentanenitrile, 2-(4-fluorophenylh	88157 1000269-22-3 17
	ydrazono)-4-methyl-3-oxo-	
	1-[4-(Dodecane-1-sulfonyl)phenyl]-	214373 129476-48-8 12
	2,2,2-trifluoroethanone	
	Boric acid, ethyl-, didecyl ester	186892 1000152-34-4 12
116	27.223 0.08 C:\Database\NIST11.L	
	Hexadecane	83023 000544-76-3 90
	Hexadecane, 2-methyl-	94352 001560-92-5 74
	Docosane	153223 000629-97-0 70
117	27.595 0.19 C:\Database\NIST11.L	
	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trime	17016 004795-86-2 55
	thyl-, [1R-(1.alpha.,2.beta.,5.alp	
	ha.)]-	
	3-Nonen-1-ol, (Z)-	19958 010340-23-5 55
	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trime	16968 000473-55-2 49
	thyl-	
118	27.738 0.37 C:\Database\NIST11.L	
	Docosane	153222 000629-97-0 94
	Heneicosane	141424 000629-94-7 94
	Heneicosane	141425 000629-94-7 91
119	27.995 0.15 C:\Database\NIST11.L	
	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl	141442 054833-48-6 96
	Heneicosane	141426 000629-94-7 96
	Heneicosane	141424 000629-94-7 92
120	28.095 0.12 C:\Database\NIST11.L	
	Docosane	153223 000629-97-0 92
	Nonadecane, 2-methyl-	129501 001560-86-7 90
	Nonadecane, 2-methyl-	129498 001560-86-7 87
121	28.438 0.17 C:\Database\NIST11.L	
	Tricosane, 2-methyl-	175566 001928-30-9 93
	Octadecane, 2-methyl-	117648 001560-88-9 86
	Hexadecane, 2-methyl-	94354 001560-92-5 83
122	28.681 0.73 C:\Database\NIST11.L	
	Heptadecane, 2-methyl-	105894 001560-89-0 60
	Heptacosane	202661 000593-49-7 45
	Docosane, 2,21-dimethyl-	175569 077536-31-3 43
123	28.810 0.55 C:\Database\NIST11.L	
	2,5-Heptanedione, 3,3,6-trimethyl-	38019 051513-40-7 47
	N-Acetylpyrrolidone	11761 000932-17-2 38
	N-Acetylpyrrolidone	11762 000932-17-2 32

124 29.010 0.24 C:\Database\NIST11.L
 Docosane 153223 000629-97-0 97
 Tetracosane 175559 000646-31-1 91
 Eicosane 129490 000112-95-8 90

125 29.124 0.49 C:\Database\NIST11.L
 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)d 124430 082304-66-3 98
 eca-6,9-diene-2,8-dione
 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)d 124431 082304-66-3 91
 eca-6,9-diene-2,8-dione
 Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 68

126 29.224 0.72 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129490 000112-95-8 90
 Octacosane 209565 000630-02-4 90
 Pentacosane 185533 000629-99-2 87

127 29.367 0.52 C:\Database\NIST11.L
 Heneicosane 141424 000629-94-7 95
 2-Bromo dodecane 100330 013187-99-0 78
 Tridecane, 7-propyl- 83029 055045-09-5 78

128 29.581 0.25 C:\Database\NIST11.L
 Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1 137987 006386-38-5 89
 -dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl
 ester
 Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1 137988 006386-38-5 59
 -dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl
 ester
 Hentriacontane 223852 000630-04-6 25

129 29.681 0.08 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane 94345 000629-78-7 95
 Heptadecane, 3-methyl- 105897 006418-44-6 91
 Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 91

130 29.767 0.17 C:\Database\NIST11.L
 Nonane, 5-butyl- 48837 017312-63-9 95
 Heptadecane, 8-methyl- 105898 013287-23-5 90
 Octadecane 105886 000593-45-3 87

131 29.967 0.63 C:\Database\NIST11.L
 Tetracosane 175560 000646-31-1 91
 Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129513 000638-36-8 91
 Heneicosane 141424 000629-94-7 91

132 30.053 0.71 C:\Database\NIST11.L
 Docosane 153223 000629-97-0 76
 Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 52
 Tritetracontane 241174 007098-21-7 38

133 30.210 0.53 C:\Database\NIST11.L
 Acetic acid, 2-acetoxymethyl-1,2,3 85814 1000187-50-7 38
 -trimethylbutyl ester
 1,2,4-Triazine-6-carboxylic acid, 62030 051101-09-8 18
 2,3,4,5-tetrahydro-5-oxo-3-thioxo-
 , ethyl ester
 Decane, 5,6-dimethyl- 38347 001636-43-7 14

134 30.453 0.17 C:\Database\NIST11.L
 Nonadecane, 2-methyl- 129501 001560-86-7 66
 Ethyl 14-methyl-hexadecanoate 143149 1000336-64-7 55
 Hexadecanoic acid, ethyl ester 131291 000628-97-7 55

135 30.567 0.19 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129513 000638-36-8 96
 Eicosane 129490 000112-95-8 91
 10-Methylnonadecane 129494 056862-62-5 91

136 30.667 0.09 C:\Database\NIST11.L
 Z-5-Methyl-6-heneicosen-11-one 163008 1000131-16-2 90
 Tridecane, 4,8-dimethyl- 71403 055030-62-1 87

Docosane, 2,21-dimethyl- 175569 077536-31-3 78

137 30.739 0.07 C:\Database\NIST11.L
Tetracosane 175558 000646-31-1 90
Heneicosane 141424 000629-94-7 87
Octadecane, 3-methyl- 117645 006561-44-0 87

138 30.896 0.03 C:\Database\NIST11.L
Docosane, 2,21-dimethyl- 175569 077536-31-3 70
Tricosane 164578 000638-67-5 70
Tricosane 164577 000638-67-5 70

139 31.068 0.12 C:\Database\NIST11.L
Tricosane 164578 000638-67-5 94
Nonadecane, 9-methyl- 129502 013287-24-6 93
Hentriacontane 223852 000630-04-6 91

140 31.153 0.07 C:\Database\NIST11.L
Docosane 153221 000629-97-0 96
Octacosane 209565 000630-02-4 91
Heptadecane, 3-methyl- 105891 006418-44-6 91

141 31.339 0.38 C:\Database\NIST11.L
Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93
Eicosane 129490 000112-95-8 91
Heneicosane 141424 000629-94-7 91

142 31.596 0.28 C:\Database\NIST11.L
Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 83
Oleanitrile 113266 1000308-88-1 64
Heptadecane, 3-methyl- 105897 006418-44-6 64

143 31.711 0.31 C:\Database\NIST11.L
Undecane 28424 001120-21-4 55
Tetradecane, 4-ethyl- 83033 055045-14-2 50
Hexacosane 194493 000630-01-3 46

144 31.782 0.67 C:\Database\NIST11.L
Eicosanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy 231045 055429-67-9 38
)propyl ester
Octadecane, 4-methyl- 117642 010544-95-3 15
Undecane, 2,7-dimethyl- 48861 017301-24-5 14

145 31.854 0.41 C:\Database\NIST11.L
Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 94
Pentacosane 185533 000629-99-2 91
Docosane, 11-decyl- 227195 055401-55-3 91

146 31.954 0.18 C:\Database\NIST11.L
Docosane 153223 000629-97-0 97
Heptadecane, 3-methyl- 105891 006418-44-6 91
Triacontane 219831 000638-68-6 91

147 32.054 0.16 C:\Database\NIST11.L
Tetracosane 175560 000646-31-1 97
Heptadecane, 3-methyl- 105891 006418-44-6 94
Triacontane 219831 000638-68-6 91

148 32.139 0.92 C:\Database\NIST11.L
Pentadecane, 7-methyl- 83040 006165-40-8 81
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129513 000638-36-8 78
Hexadecane 83025 000544-76-3 76

149 32.268 3.24 C:\Database\NIST11.L
5-[Cyano-(4,5-dihydro-3H-pyrrol-2- 88183 1000188-19-7 47
yl)-methylene]pyrrolidine-2-carbox
ylic acid, methyl ester
l-Norvaline, N-(2-methoxyethoxycar 206125 1000328-64-4 47
bonyl)-, dodecyl ester
2-(Phenyl-piperidin-1-yl-methyl)-c 122034 101887-99-4 47
yclohexanol

150 32.482 0.21 C:\Database\NIST11.L

	Octadecane	105886 000593-45-3 96
	Heneicosane	141424 000629-94-7 95
	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	129509 000638-36-8 87
151	32.597 0.81 C:\Database\NIST11.L	
	Heneicosane	141424 000629-94-7 95
	Octacosane	209565 000630-02-4 90
	Docosane, 2,21-dimethyl-	175569 077536-31-3 89
152	32.754 0.46 C:\Database\NIST11.L	
	Nonane, 5-butyl-	48837 017312-63-9 96
	Heneicosane	141424 000629-94-7 94
	Heptadecane, 3-methyl-	105891 006418-44-6 91
153	32.825 0.26 C:\Database\NIST11.L	
	Pentadecane	71396 000629-62-9 74
	Hexadecanamide	106564 000629-54-9 55
	Pentadecane	71394 000629-62-9 52
154	32.954 0.19 C:\Database\NIST11.L	
	Heneicosane	141424 000629-94-7 90
	Hexadecane, 2-methyl-	94354 001560-92-5 78
	Eicosane	129490 000112-95-8 64
155	33.011 0.21 C:\Database\NIST11.L	
	Octadecane	105886 000593-45-3 94
	Tetracosane	175559 000646-31-1 93
	Tetratetracontane	241528 007098-22-8 90
156	33.111 0.26 C:\Database\NIST11.L	
	1-Octadecene	104184 000112-88-9 95
	Cyclohexadecane	81246 000295-65-8 95
	E-15-Heptadecenal	104157 1000130-97-9 91
157	33.183 0.54 C:\Database\NIST11.L	
	1,2-Propanediol, 3-(hexadecyloxy)-	212189 021994-82-1 38
	, diacetate	
	Heptadecane, 9-hexyl-	164584 055124-79-3 25
	Pentadecane, 2-methyl-	83042 001560-93-6 25
158	33.340 0.25 C:\Database\NIST11.L	
	Octadecane, 1-chloro-	134595 003386-33-2 81
	Eicosane	129490 000112-95-8 74
	Octadecane, 1-chloro-	134594 003386-33-2 42
159	33.426 0.31 C:\Database\NIST11.L	
	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	129509 000638-36-8 95
	Octacosane	209565 000630-02-4 87
	Tetracosane	175558 000646-31-1 81
160	33.540 0.20 C:\Database\NIST11.L	
	Octacosane	209565 000630-02-4 91
	Tetracosane	175559 000646-31-1 91
	Nonadecane	117636 000629-92-5 89
161	33.726 0.48 C:\Database\NIST11.L	
	Hexadecane, 2-methyl-	94355 001560-92-5 89
	Tricosane	164578 000638-67-5 89
	Hexadecane, 2-methyl-	94354 001560-92-5 86
162	33.840 1.93 C:\Database\NIST11.L	
	Lauric anhydride	203643 000645-66-9 38
	Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydr	122640 001678-45-1 37
	oxymethyl)ethyl ester	
	Lauric anhydride	203642 000645-66-9 35
163	33.911 3.79 C:\Database\NIST11.L	
	1,2-Dicarbododecaborane(12), 1-hex	86383 020740-05-0 14
	yl-	
	Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydr	122640 001678-45-1 10
	oxymethyl)ethyl ester	
	Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxyprop	122635 000142-18-7 10
	yl ester	

164 34.011 0.34 C:\Database\NIST11.L
Tricosane 164578 000638-67-5 97
1-Iodo-2-methylundecane 140553 073105-67-6 94
Eicosane 129490 000112-95-8 91

165 34.083 0.27 C:\Database\NIST11.L
Eicosane, 2-methyl- 141430 001560-84-5 95
Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 94
Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93

166 34.126 0.32 C:\Database\NIST11.L
Octadecane, 2-methyl- 117649 001560-88-9 94
Heneicosane 141424 000629-94-7 91
Docosane 153223 000629-97-0 91

167 34.197 0.36 C:\Database\NIST11.L
Tricosane 164578 000638-67-5 95
Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93
Octadecane, 3-methyl- 117650 006561-44-0 89

168 34.269 0.27 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129493 000112-95-8 94
Heptadecane, 3-methyl- 105891 006418-44-6 93
Tetracosane 175559 000646-31-1 91

169 34.412 1.18 C:\Database\NIST11.L
Docosane 153223 000629-97-0 94
Decane, 1-iodo- 116706 002050-77-3 87
Octadecane, 2-methyl- 117648 001560-88-9 81

170 34.483 0.31 C:\Database\NIST11.L
Pentacosane 185533 000629-99-2 91
Nonane, 5-butyl- 48837 017312-63-9 91
Hexacosane 194494 000630-01-3 91

171 34.554 0.98 C:\Database\NIST11.L
[1,2,4]Oxadiazole, 5-(furan-2-yl)- 75283 1000304-40-7 53
3-(thiophen-2-yl)-
Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N,N-bi 161718 020836-41-3 49
s[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-
Benzo[b]naphtho[2,3-d]furan 75958 000243-42-5 47

172 34.612 1.79 C:\Database\NIST11.L
9-Octadecenamide, (Z)- 128447 000301-02-0 99
9-Octadecenamide, (Z)- 128446 000301-02-0 99
9-Octadecenamide, (Z)- 128443 000301-02-0 86

173 34.840 0.61 C:\Database\NIST11.L
Nonadecane 117636 000629-92-5 93
Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 90
Hentriacontane 223851 000630-04-6 87

174 35.155 0.64 C:\Database\NIST11.L
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 64
Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 50
1-Iodo-2-methylundecane 140553 073105-67-6 50

175 35.226 0.18 C:\Database\NIST11.L
Tricosane 164578 000638-67-5 97
Tetracosane 175555 000646-31-1 97
Nonadecane 117636 000629-92-5 95

176 35.298 0.42 C:\Database\NIST11.L
Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 91
Decane, 3,6-dimethyl- 38343 017312-53-7 91
Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 129509 000638-36-8 83

177 35.626 1.79 C:\Database\NIST11.L
Myristin, 2,3-diaceto-1- 205566 014473-55-3 87
Myristin, 1,3-diaceto-2- 205565 014290-23-4 87
Eicosanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy 231045 055429-67-9 41
)propyl ester

178 35.669 2.20 C:\Database\NIST11.L
 Myristin, 2,3-diaceto-1- 205566 014473-55-3 81
 Myristin, 1,3-diaceto-2- 205565 014290-23-4 68
 Hexadecanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester 217217 055268-70-7 49

179 35.783 0.89 C:\Database\NIST11.L
 Tetradecane 59882 000629-59-4 92
 Nonadecane 117636 000629-92-5 76
 Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 70

180 35.955 1.01 C:\Database\NIST11.L
 Tricosane 164578 000638-67-5 98
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93
 Octacosane 209565 000630-02-4 90

181 36.012 0.89 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93
 Nonadecane, 9-methyl- 129499 013287-24-6 90
 Octadecane, 3-methyl- 117650 006561-44-0 89

182 36.255 1.56 C:\Database\NIST11.L
 Nonadecane 117636 000629-92-5 93
 Octadecane, 3-methyl- 117650 006561-44-0 93
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93

183 36.312 1.30 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 91
 Pentacosane 185533 000629-99-2 91
 Nonadecane 117636 000629-92-5 91

184 36.612 1.88 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93
 Octacosane 209565 000630-02-4 91
 Nonadecane 117636 000629-92-5 91

185 36.827 0.70 C:\Database\NIST11.L
 Decane, 3,6-dimethyl- 38343 017312-53-7 68
 Nonadecane, 2-methyl- 129501 001560-86-7 52
 4-Methyldocosane 164581 025117-30-0 51

186 36.898 0.38 C:\Database\NIST11.L
 1-Chloroeicosane 158254 042217-02-7 83
 Eicosane 129490 000112-95-8 83
 Pentadecane, 2-methyl- 83042 001560-93-6 70

187 36.970 1.78 C:\Database\NIST11.L
 Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)- 194511 055282-12-7 38
 l)-
 Boric acid, ethyl-, didecyl ester 186892 1000152-34-4 27
 6,6-Diethyloctadecane 153228 1000360-41-8 25

188 37.270 0.39 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129490 000112-95-8 97
 Behenyl chloride 180096 042217-03-8 92
 Octadecane, 2-methyl- 117649 001560-88-9 92

189 37.427 1.04 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecanoic acid, 2-(acetyloxy)-1 217219 055268-69-4 49
 -[(acetyloxy)methyl]ethyl ester
 Glutaric acid, ethyl 4-(trifluoromethyl)benzyl ester 159321 1000377-57-6 42
 Eicosanoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester 231046 055429-68-0 30

190 37.498 1.54 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester 217217 055268-70-7 80
 Eicosanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester 231045 055429-67-9 62
 Hexadecanoic acid, 2-(acetyloxy)-1 217219 055268-69-4 50
 -[(acetyloxy)methyl]ethyl ester

191 37.670 0.90 C:\Database\NIST11.L
Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 95
Tricosane 164577 000638-67-5 94
Eicosane 129493 000112-95-8 93

192 37.784 1.45 C:\Database\NIST11.L
1-Docosene 151537 001599-67-3 96
Octatriacontyl pentafluoropropionate 242842 1000351-89-1 93
Octacosyl trifluoroacetate 235928 1000351-74-9 93

193 37.999 0.96 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129493 000112-95-8 96
Nonadecane 117636 000629-92-5 95
Heptadecane, 3-methyl- 105900 006418-44-6 93

194 38.256 0.76 C:\Database\NIST11.L
Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 90
Tetradecane, 2,6,10-trimethyl- 94356 014905-56-7 90
1,2-Benzisothiazole, 3-(hexahydro- 113661 309735-29-3 90
1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide

195 38.484 1.07 C:\Database\NIST11.L
Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 93
Eicosane 129493 000112-95-8 89
1-Iodo-2-methylundecane 140553 073105-67-6 89

196 38.684 2.28 C:\Database\NIST11.L
13-Docosenamide, (Z)- 174695 000112-84-5 98
9-Octadecenamide, (Z)- 128445 000301-02-0 96
9-Octadecenamide, (Z)- 128444 000301-02-0 95

197 39.113 1.33 C:\Database\NIST11.L
1-[p-Bromophenyl]-4-nitro-1,3-butadiene 104396 004995-05-5 92
Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester 122640 001678-45-1 18
Thiazole, 4-ethyl-2-propyl- 28102 041981-68-4 15

198 39.342 1.68 C:\Database\NIST11.L
trans-Geranylgeraniol 136479 024034-73-9 91
Squalene 215932 000111-02-4 90
Squalene 215927 000111-02-4 90

199 39.485 0.83 C:\Database\NIST11.L
1-Chloroeicosane 158254 042217-02-7 87
Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 84
Docosane, 2,21-dimethyl- 175569 077536-31-3 83

200 40.142 0.85 C:\Database\NIST11.L
Eicosanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester 231045 055429-67-9 62
Nonanoic acid, tridecyl ester 177144 1000340-28-0 51
Eicosanoic acid, 2-(acetyloxy)-1-(acetyloxy)methyl]ethyl ester 231046 055429-68-0 43

201 40.256 1.17 C:\Database\NIST11.L
Eicosanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester 231045 055429-67-9 74
Hexadecanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester 217217 055268-70-7 47
Eicosanoic acid, 2-(acetyloxy)-1-(acetyloxy)methyl]ethyl ester 231046 055429-68-0 43

202 40.528 1.08 C:\Database\NIST11.L
3-Eicosene, (E)- 127771 074685-33-9 92
Heneicosane, 11-decyl- 223853 055320-06-4 91
Docosane 153221 000629-97-0 89

203 40.842 0.71 C:\Database\NIST11.L
1-Nonadecene 115905 018435-45-5 95
Tetrapentacontane, 1,54-dibromo- 243727 1000156-09-4 93

1,1,3-Tricyclohexylpropane 136501 055682-89-8 93

204 41.185 0.52 C:\Database\NIST11.L
 Docosane 153221 000629-97-0 95
 Behenyl chloride 180096 042217-03-8 93
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 90

205 41.385 0.45 C:\Database\NIST11.L
 1,2-Benzisothiazole, 3-(hexahydro- 113661 309735-29-3 91
 1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide
 Octadecane, 3-methyl- 117650 006561-44-0 89
 Nonadecane, 2-methyl- 129501 001560-86-7 70

206 41.843 0.31 C:\Database\NIST11.L
 Behenyl chloride 180096 042217-03-8 92
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 90
 Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 90

207 41.943 0.16 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane, 2-methyl- 105889 001560-89-0 91
 Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 91
 Octadecane, 2,6,10,14-tetramethyl- 153233 054964-82-8 91

208 42.014 0.11 C:\Database\NIST11.L
 Heptadecane 94346 000629-78-7 95
 Docosane 153221 000629-97-0 93
 Heptadecane, 3-methyl- 105900 006418-44-6 93

209 42.557 0.14 C:\Database\NIST11.L
 Behenyl chloride 180096 042217-03-8 89
 Eicosane 129490 000112-95-8 86
 Eicosane 129493 000112-95-8 86

210 42.614 0.16 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129490 000112-95-8 90
 Decane, 3,6-dimethyl- 38343 017312-53-7 83
 Behenyl chloride 180096 042217-03-8 78

211 42.757 0.15 C:\Database\NIST11.L
 Hexadecane, 1-chloro- 110906 004860-03-1 70
 Pentatriacontane 234393 000630-07-9 64
 Hexadecane, 2-methyl- 94355 001560-92-5 60

212 43.486 0.10 C:\Database\NIST11.L
 Z-11-Tetradecen-1-ol trifluoroacetate 151053 1000131-33-7 91
 Z,Z-3,11-Octadecadien-1-ol acetate 151469 1000131-01-5 81
 11-Tetradecyn-1-ol acetate 104058 033925-72-3 80

213 45.144 0.56 C:\Database\NIST11.L
 Docosane 153221 000629-97-0 95
 Tricosane 164579 000638-67-5 94
 Octadecane 105883 000593-45-3 94

214 46.073 0.01 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129490 000112-95-8 86
 Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 66
 Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 66

215 46.187 0.01 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129493 000112-95-8 84
 Tetracosane 175555 000646-31-1 81
 Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 60

216 46.401 0.10 C:\Database\NIST11.L
 1,1,1-Trifluoroheptadecen-2-one 151185 141022-99-3 90
 Eicosane 129490 000112-95-8 89
 Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 50

217 46.516 0.03 C:\Database\NIST11.L
 Eicosane 129493 000112-95-8 89
 Nonadecane 117636 000629-92-5 70
 Hexadecane, 1-chloro- 110906 004860-03-1 70

218 46.644 0.03 C:\Database\NIST11.L
10-Heneicosene (c,t) 139793 095008-11-0 90
Docosane 153221 000629-97-0 66
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 64

219 46.730 0.01 C:\Database\NIST11.L
Nonadecane, 1-chloro- 146523 062016-76-6 90
Heptadecane 94346 000629-78-7 90
Eicosane 129490 000112-95-8 90

220 46.859 0.07 C:\Database\NIST11.L
E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate 117492 1000130-81-4 90
Decane, 3,6-dimethyl- 38343 017312-53-7 89
Behenyl chloride 180096 042217-03-8 83

221 47.002 0.09 C:\Database\NIST11.L
Decane, 3,6-dimethyl- 38343 017312-53-7 83
Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 66
Decane, 3,8-dimethyl- 38349 017312-55-9 64

222 47.116 0.09 C:\Database\NIST11.L
Nonadecane, 1-chloro- 146523 062016-76-6 96
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 89
Hexadecane, 1-chloro- 110906 004860-03-1 83

223 47.273 0.25 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 95
Behenyl chloride 180096 042217-03-8 91
Heptadecane, 3-methyl- 105900 006418-44-6 90

224 47.473 0.36 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 91
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 56
Pentadecane, 2-methyl- 83042 001560-93-6 55

225 47.673 0.35 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 95
2-Piperidinone, N-[4-bromo-n-butyl]- 88460 195194-80-0 64
1-Octadecene 104182 000112-88-9 53

226 47.788 0.35 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 95
Hexadecane, 2-methyl- 94355 001560-92-5 66
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 58

227 47.873 0.36 C:\Database\NIST11.L
Tetracosane 175555 000646-31-1 92
Eicosane 129490 000112-95-8 91
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 90

228 48.116 0.99 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 64
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 62
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 50

229 48.259 0.20 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 78
Octadecane 105886 000593-45-3 74
Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 55

230 48.388 0.31 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 64
Eicosane 129490 000112-95-8 64
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 48

231 48.459 0.21 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 53
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 53
Octyltrichlorosilane 99367 005283-66-9 52

232 48.531 0.33 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 59
Eicosane 129493 000112-95-8 53
Hexadecane, 2-methyl- 94355 001560-92-5 53

233 48.731 0.40 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 60
Octyltrichlorosilane 99367 005283-66-9 55
Nonadecane, 2-methyl- 129501 001560-86-7 53

234 48.802 0.17 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 56
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 46
Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 46

235 48.916 0.53 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129493 000112-95-8 80
Hexadecane, 1-chloro- 110906 004860-03-1 70
Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 66

236 49.031 0.29 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 90
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 53
Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 43

237 49.231 0.59 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 53
Eicosane, 2-methyl- 141430 001560-84-5 45
Oxalic acid, pentadecyl propyl est 178430 1000309-26-8 38

238 49.302 0.34 C:\Database\NIST11.L
Estra-1,3,5(10)-trien-17.beta.-ol 107688 002529-64-8 52
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 46
1-Hexadecanethiol 109270 002917-26-2 43

239 49.445 0.15 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 64
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 60
Eicosane, 2-methyl- 141430 001560-84-5 52

240 49.531 0.42 C:\Database\NIST11.L
Eicosane 129490 000112-95-8 68
Nonadecane 117636 000629-92-5 59
Eicosane, 2-methyl- 141430 001560-84-5 55

241 49.745 0.37 C:\Database\NIST11.L
Heneicosane 141424 000629-94-7 91
1-Nonadecene 115905 018435-45-5 80
1-Chloroeicosane 158254 042217-02-7 78

242 49.903 0.49 C:\Database\NIST11.L
Octyltrichlorosilane 99367 005283-66-9 53
Heneicosane, 3-methyl- 153226 006418-47-9 53
1-Decanol, 2-octyl- 119525 045235-48-1 50

243 49.974 0.16 C:\Database\NIST11.L
Heptane, 2,6-dimethyl- 12692 001072-05-5 70
Batilol 180014 000544-62-7 64
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 60

244 50.117 0.43 C:\Database\NIST11.L
Octyltrichlorosilane 99367 005283-66-9 60
Hexadecane, 2-methyl- 94352 001560-92-5 59
Hexadecane, 2-methyl- 94354 001560-92-5 59

245 50.245 0.22 C:\Database\NIST11.L
Octadecane 105886 000593-45-3 83
Eicosane 129490 000112-95-8 83
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 83

246 50.346 0.54 C:\Database\NIST11.L
Pentadecane, 2-methyl- 83043 001560-93-6 66
Sulfurous acid, octadecyl 2-propyl 200449 1000309-12-7 50

	ester		
	Octyltrichlorosilane	99367	005283-66-9 48
247	50.560 0.48 C:\Database\NIST11.L		
	Heneicosane	141424	000629-94-7 53
	Octyltrichlorosilane	99367	005283-66-9 45
	Heneicosane, 3-methyl-	153226	006418-47-9 43
248	50.717 0.53 C:\Database\NIST11.L		
	Hexadecane, 2-methyl-	94352	001560-92-5 70
	Eicosane, 2-methyl-	141430	001560-84-5 56
	Ditetradecyl ether	215905	005412-98-6 46
249	50.974 0.62 C:\Database\NIST11.L		
	Stearic acid hydrazide	143051	004130-54-5 60
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430	1000309-26-8 53
	Estra-1,3,5(10)-trien-17.beta.-ol	107688	002529-64-8 49
250	51.146 0.09 C:\Database\NIST11.L		
	i-Propyl 11-octadecenoate	164504	1000336-79-5 59
	Hexadecane, 2-methyl-	94354	001560-92-5 59
	Hexadecane, 2-methyl-	94352	001560-92-5 56
251	51.246 0.27 C:\Database\NIST11.L		
	Heneicosane	141424	000629-94-7 68
	Pentadecane, 2-methyl-	83043	001560-93-6 60
	Ethanol, 2-(octadecyloxy)-	156673	002136-72-3 60
252	51.346 0.09 C:\Database\NIST11.L		
	2-Methyldocosane	164580	001560-81-2 70
	Nonadecane	117636	000629-92-5 66
	Eicosane, 2-methyl-	141430	001560-84-5 55
253	51.446 0.17 C:\Database\NIST11.L		
	2-Methyldocosane	164580	001560-81-2 60
	Hexadecane, 2-methyl-	94354	001560-92-5 55
	Hexadecane, 2-methyl-	94352	001560-92-5 53
254	51.532 0.06 C:\Database\NIST11.L		
	Octadecane, 1-(ethenyloxy)-	141403	000930-02-9 70
	Heneicosane	141424	000629-94-7 64
	Octatriacontyl pentafluoropropionate	242842	1000351-89-1 64
255	51.574 0.09 C:\Database\NIST11.L		
	1-Hexadecanethiol	109270	002917-26-2 60
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430	1000309-26-8 53
	Ethanol, 2-(hexadecyloxy)-	133067	002136-71-2 53
256	51.689 0.08 C:\Database\NIST11.L		
	Heneicosane	141424	000629-94-7 59
	Ethanol, 2-(hexadecyloxy)-	133067	002136-71-2 49
	Ethanol, 2-(octadecyloxy)-	156673	002136-72-3 45
257	51.732 0.04 C:\Database\NIST11.L		
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430	1000309-26-8 50
	Hexadecane, 2-methyl-	94352	001560-92-5 46
	Pentadecane, 2-methyl-	83043	001560-93-6 45
258	51.803 0.05 C:\Database\NIST11.L		
	Heneicosane	141424	000629-94-7 59
	Ethanol, 2-(hexadecyloxy)-	133067	002136-71-2 49
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430	1000309-26-8 45
259	51.846 0.05 C:\Database\NIST11.L		
	Heneicosane	141424	000629-94-7 59
	1-Hexadecanethiol	109270	002917-26-2 49
	Hexadecanoic acid, 2-(octadecyloxy)ethyl ester	239251	029899-13-6 49
260	51.960 0.05 C:\Database\NIST11.L		

	Octadecane	105886 000593-45-3 53
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430 1000309-26-8 50
	Ethanol, 2-(hexadecyloxy)-	133067 002136-71-2 49
261	52.017 0.02 C:\Database\NIST11.L	
	Heneicosane	141424 000629-94-7 59
	Octadecane	105886 000593-45-3 53
	Oxalic acid, octadecyl propyl ester	204512 1000309-27-0 45
262	52.146 0.07 C:\Database\NIST11.L	
	i-Propyl 9-octadecenoate	164501 1000336-67-1 94
	2-Methyldocosane	164580 001560-81-2 70
	Tricosane	164579 000638-67-5 64
263	52.260 0.03 C:\Database\NIST11.L	
	Heneicosane	141424 000629-94-7 59
	2-Methyldocosane	164580 001560-81-2 53
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430 1000309-26-8 50
264	52.389 0.05 C:\Database\NIST11.L	
	Octadecane	105886 000593-45-3 64
	Heneicosane	141424 000629-94-7 60
	1-Decanol, 2-octyl-	119525 045235-48-1 55
265	52.561 0.07 C:\Database\NIST11.L	
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430 1000309-26-8 38
	Estra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol	107688 002529-64-8 35
	Oxalic acid, hexadecyl propyl ester	187989 1000309-26-9 30
266	52.603 0.08 C:\Database\NIST11.L	
	1-Hexadecanethiol	109270 002917-26-2 60
	Heneicosane	141424 000629-94-7 59
	2-Methyldocosane	164580 001560-81-2 53
267	52.675 0.07 C:\Database\NIST11.L	
	1-Hexadecanethiol	109270 002917-26-2 68
	Z-5-Methyl-6-heneicosen-11-one	163008 1000131-16-2 38
	Decanoic acid, 9-oxo-, methyl ester	60968 002575-07-7 35
268	52.732 0.05 C:\Database\NIST11.L	
	Oxalic acid, pentadecyl propyl ester	178430 1000309-26-8 38
	Oxalic acid, octadecyl propyl ester	204512 1000309-27-0 30
	2-Furanmethanol, tetrahydro-. α	92414 026184-88-3 27
	..., α .,5-trimethyl-5-(4-methyl-3-cyclohexen-1-yl)-, [2S-[2. α .,5. β .(R*)]]-	
269	52.875 0.07 C:\Database\NIST11.L	
	Decane	19159 000124-18-5 64
	Heneicosane	141425 000629-94-7 60
	Heneicosane	141424 000629-94-7 60

MIOD.M Mon Jun 12 12:42:31 2