

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____ М.М. Барановський
« ___ » _____ 2021 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Тема: «Верба біла (*Salix alba*): біологічно активні речовини та особливості їх екстрагування»

Виконавець: студент 402 гр. ФЕБІТ

Редванський Є.Р.

Керівник: д.б.н., професор

Гаркава К.Г.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ОПП: «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ М.М. Барановський

«___» _____ 2021р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Редванського Євгенія Романовича

1. Тема дипломної роботи: «Верба біла (*Salix alba*): біологічно активні речовини та особливості їх екстрагування» затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р. № 715/ст

2. Термін виконання роботи: з 10 травня по 20 червня 2021 р.

3. Вихідні дані роботи: біологічно активні речовини кори та листя *Salix alba*.

4. Зміст пояснювальної записки: Вступ. Літературний огляд. Методи виділення біологічно активних речовин. Перспектива розробки лікарських препаратів на основі кори та листя *Salix alba*. Висновки. Список бібліографічних посилань використаних джерел

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: таблиць 2, рисунків 11.

6. Календарний план–графік

№	Завдання	Термін виконання
1	Отримання теми завдання, формулювання актуальності, мети та завдання роботи	10.05.2021
2	Пошук літературних джерел та розгляд наукових матеріалів	11.05-14.05.2021
3	Підготовка основної частини (Розділ 1)	15.05-18.05.2021
4	Підготовка основної частини (Розділ 2)	19.05-23.05.2021
5	Підготовка основної частини (Розділ 3)	24.05-27.05.2021
6	Формулювання висновків	28.05.2021
7	Оформлення пояснювальної записки до попереднього представлення на кафедрі, консультація з нормоконтролером	29.05-30.05.2021
8	Перевірка дипломної роботи керівником	31.05.2021
9	Попередній захист дипломної роботи	01.06.2021
10	Урахування зауважень, рекомендацій та підготовка до захисту	02.06-15.06.2021
11	Захист дипломної роботи	16.06.2021

7. Дата видачі завдання «10» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи _____ /Гаркава К.Г./

Завдання прийняв до виконання _____ /Редванський Є.Р./

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Верба біла (*Salix alba*): біологічно активні речовини та особливості їх екстрагування»: 48 с., 11 рис., 2 табл., 54 літературних джерел.

Об'єкт дослідження – вивчення кори та листя *Salix alba*.

Предмет дослідження – кора та листя *Salix alba*, як рослинна сировина для фармацевтичної промисловості.

Мета дипломної роботи – вивчити вміст біологічно активних речовин верби білої, їх властивості та методи екстрагування.

Методи дослідження – аналіз і синтез, порівняння, моніторинг.

Практичне значення отриманих результатів - полягає у наданні рекомендацій, щодо застосування біологічно активних речовин, зокрема саліцилатів і кверцетину з кори та листя *Salix alba*.

Salix alba (верба біла) – дерево з родини *Salix*, сімейства Вербові (*Salicaceae*). *Salix alba* – поширена на більшій частині України. Біологічно активні речовини кори та листя *Salix alba* мають широкий спектр різних властивостей, такі як, антиоксидантні, протизапальні, протипухлинні та противірусні. Припускається, що флаваноїд кверцетин та флаванон нарингенін можуть чинити терапевтичний ефект проти COVID–19.

В Україні *Salix alba* не є фармакопейною рослинною, однак в останні роки широко вивчається хімічний склад кори та листя, методи виділення біологічно активних речовин, є дані про розробку параметрів стандартизації кори верби білої, а це все створює умови для застосування сировини *Salix alba* на фармацевтичному ринку України та створювати нові лікарські препарати.

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, SALIX ALBA, ФЕНОЛГЛІКОЗИДИ, САЛІЦИН, КВЕРЦЕТИН, ЕКСТРАКЦІЯ, РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
1.1.Опис та характеристика <i>Salix alba</i>	9
1.2. Біологічно активні речовини <i>Salix alba</i>	12
1.2.1. Фенологлікозиди	15
1.2.2. Флаванони	16
1.2.3. Катехіни кори верби білої.....	17
1.2.4. Проантоціанідини.....	18
1.2.5. Антоціани <i>Salix alba</i>	18
1.2.6. Фенолкарбонові кислоти листя верби білої.....	19
1.2.7. Кумарини	20
1.2.8. Флавоноїди	21
1.3. Висновки до розділу.....	22
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН	24
2.1. Об'єкт дослідження.....	24
2.2. Методи виділення фенолглікозидів	25
2.3. Виділення флаванонів	28
2.4. Методи виділення катехинів та проантоціанідів	30
2.5. Методи виділення флавоноїдів із листя <i>Salix alba</i>	32
2.6. Висновки до розділу.....	34
РОЗДІЛ 3. ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ КОРИ ТА ЛИСТЯ <i>SALIX ALBA</i>	35
3.1. Дослідження ринку лікарських препаратів на основі кори та листя <i>Salix alba</i>	35
3.2. Верба біла для лікування ревматоїдного артрити	37
3.3. Висновки до розділу.....	39
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ВСТУП

Актуальність: Протягом останніх років спостерігається погіршення екологічного стану навколишнього середовища, відбувається забруднення повітря, ґрунту та води, а це все негативно впливає на імунітет людей, і в результаті – населення втрачає здоров'я та працездатність.

Відомо, що у статті третій Конституції України, найвищою соціальною цінністю в Україні є людина, її життя та здоров'я, честь і гідність, цілісність та безпека. Відповідно до Глобальних цілей сталого розвитку (спрямованих на подолання бідності, захист планети та забезпечення миру та процвітання для всіх людей у світі), заявлених Програмою розвитку ООН (ПРООН) в Україні – третьою ціллю є міцне здоров'я. Одним із завдань, серед інших, є забезпечення доступу до безпечних та доступних ліків та вакцин. Невід'ємною частиною цього процесу є підтримка досліджень та розробок вакцин.

Міцний імунітет – це основна складова будь-якої людини. Імунітет, як відомо, захищає організм від агресивного впливу інфекцій та інших генетично чужорідних агентів. Імунна система відповідає за два важливі процеси: заміщення трансформованих або пошкоджених клітин різних органів тіла та захист від проникнення різного роду сторонніх агентів. Це забезпечує протівірусний, протипухлинний захист та генетичну стабільність організму.

Для підвищення імунітету організму необхідні продукти з високим вмістом біологічно активних речовин.

Біологічно активні речовини включають вітаміни, фенольні сполуки, хлорофіл, мікро- та макроелементи, органічні кислоти, глікозиди, ефірні олії, алкалоїди, дубильні речовини, флавонони, катехіни, проантоціанідини, антоціани, фенологлікозиди тощо.

Недостатня кількість цих речовин негативно впливає на захисні сили організму, що спричинено зниженням активності імунної системи та призводить до

зниження працездатності, стійкості до хвороб та підвищеного ризику розвитку, зокрема, онкологічні та серцево-судинні захворювання.

Широкий спектр біологічних властивостей та “м’якість” дії є головними перевагами лікарських препаратів, виготовлених з лікарських рослинних матеріалів. Тому актуальним завданням сучасної фармацевтичної науки сьогодні є пошук такої сировини для створення рослинних ліків на основі біологічно активних сполук.

Однією з цих рослин є дерево з родини *Salix*, з яких відомо близько 400 видів, що ростуть в помірних регіонах Європи, Східної Азії та Північно-Західної Америки та України.

Рослини сімейства Вербові (*Salicaceae*) часто використовуються як у фармацевтичній промисловості, так і в традиційній медицині. У фармацевтичній промисловості, як правило, застосовують кору, що містить фенологікозиди, флаванони, катехіни, проантоціанідини та дубильні речовини. У народній медицині – використовують кору, листя, пагони та суцвіття.

Актуальність даної теми зумовлена пошуком малодосліджених властивостей кори та листя *Salix alba* на тлі сьогоднішніх пандемій.

Мета дипломної роботи – вивчити вміст біологічно активних речовин верби білої, їх властивості та методи екстрагування.

Для досягнення мети дипломної роботи були поставлені такі **завдання**:

1. Проаналізувати наукові дані стосовно біологічно активних речовин верби білої.
2. Дати характеристику кори і листя *Salix alba* та методам виділення біологічно активних речовин.
3. Охарактеризувати властивості біологічно активних речовин кори та листя верби білої.
4. Дослідити сучасний стан застосування препаратів на основі кори та листя верби білої.

Об’єкт дослідження – вивчення кори та листя *Salix alba*.

Предмет дослідження – кора та листя *Salix alba*, як рослинна сировина для фармацевтичної промисловості.

Методи дослідження – аналіз і синтез, порівняння, моніторинг.

Практичне значення отриманих результатів - полягає у наданні рекомендацій, щодо застосування біологічно активних речовин, зокрема саліцилатів і кверцетину з кори та листя *Salix alba*.

Особистий внесок випускника - аналіз біологічно активних речовин верби білої та їх використання у виробництві лікарських препаратів.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Опис та характеристика *Salix alba*

Salix alba (верба біла) – дерево з родини *Salix*, сімейства Вербові (*Salicaceae*). В таблиці 1.1 наведена офіційна наукова класифікація.

Верба біла – дводомне дерево, висотою до 30 метрів та діаметром до 1.5 м. Крона *Salix alba* – пірамідальної форми з повислими гілками. Кора у молодих дерев – світло-сіра, у старіших – товста, темно-сіра, потріскана. Старі гілки – голі, прямі; молоді – повислі оливково-зеленого кольору (рис. 1.1.).

Верба біла має добре розвинену пластичну кореневу систему. Глибина залягання коренів залежить від товщини родючого шару ґрунту, вологості, сольового режиму, аерації. Слід зазначити, що чим вище зволоження ґрунту, тим менш розвинена коренева система [1–4].

Таблиця 1.1

Наукова класифікація

Домен	Еукаріота (Eukaryota)
Царство	Рослини (Viridiplantae)
Розділ	Вищі рослини (Streptophyta)
Клас	Еудікоти (Eudicots)
Підклас	Розиди (Rosidae)
Порядок	Мальпігієвоцвіті (Malpighiales)
Родина	Вербові (<i>Salicaceae</i>)
Рід	Верба (<i>Salix</i>)
Вид	Верба біла (<i>Salix alba</i>)

Пагони – гнучкі, зеленувато-сірого кольору. Листки чергові, короткочерешкові, ланцетні, загострені на кінці, по краю зубчасті, зверху сіро-зелене, слабо-блискуче, знизу блакитне, ланцетне, сріблясто-опушене з обох сторін.

Чоловічі квітки яскраво-жовті з двома вільними тичинками, жіночі квітки – зелені. Квітки дрібні, суцвіття – сережки жовтого кольору. Період цвітіння – квітень–травень. Плід – коробочка. Насіння дрібне, летюче. Дозрівають в травні–червні [1-4].



Рис.1.1. Будова *Salix alba*

Верба біла верба широко поширена у західній частині Європи, Північній Америці, за винятком Мексики та інших країн на південь від Мексики [5]. На даний момент також зустрічається в Північній Африці та і Азії [6]. *Salix alba* – поширена на більшій частині України, а саме на поліссі, лісостеп, степ, Карпати та Крим. Основними лімітуючими факторами, що впливають на ріст та розвиток верби, є кількість опадів, температура і відносна вологість повітря. В цілому клімат України сприятливий для росту і розвитку більшості видів роду *Salix*, поширених на рівнинній частині України [7].

Верба біла потребує значної кількості води, сонячного світла, менш вибаглива до ґрунтів, проте добре росте на родючих, дренажних ґрунтах. Береги водних об'єктів забезпечують ідеальне поєднання цих факторів для верби. Саме тому, *Salix alba* часто зустрічається уздовж річок, озер або інших природних джерел води. У

них також є сильна здатність адаптуватися до різних ґрунті в залежності від рН. Це дає їм можливість вижити на багатьох різних типах ґрунтів.

Однак одним з наслідків життя поруч з водою для верби є те, що вона схильна до багатьох захворювань, таким як хвороба водяних знаків, яка викликається бактеріями *Brenneria salicis* [5].

У народній медицині застосовують настій, відвар та порошок з кори верби білої. Найчастіше, *Salix alba* використовують як протизапальний і кровоспинний засіб при шлункових, кишкових, легеневих і маткових кровотечах, при підвищеній нервової збудливості, невралгії, мігрені і безсонні, а також як в'яжучий засіб при ревматизмі і пролежнях [8].

Ванни з відвару кори рекомендуються при варикозному розширенні вен. Відваром рівних частин кори верби і кореня лопуха миють голову при наявності лупи, свербінні шкіри і випаданні волосся, а також використовують для обмивання ран і виразок, при підвищеній пітливості ніг.

Широко використовують відвар кори для полоскання при стоматиті, гінгівіті, пародонтозі, ангіні, запальних процесах в порожнині рота і горла.

Порошком кори присипають рани для зупинки кровотеч. При запальних процесах шкіри, виразках, нарівах застосовують мазь, приготовану з порошку кори верби і вершкового масла [8].

Препарати верби найбільш ефективні при знятті больових і запальних явищ в суглобах, які супроводжують подагру, поліартрит, ревматизм. Відвари кори мають заспокійливу дію і успішно застосовуються для зняття головного болю, викликаного нервовим напруженням [9].

У побуті деревину верби білої використовують для кошиків та тину. У промисловості з *Salix alba* отримують фарбу, яка забарвлює шкіру, вовняні і шовкові тканини в червоно-коричневий і жовтий кольори. Молоді пагони служать кормом для вівць, кіз та оленів. Рослина є хорошим медоносом [2].

Відповідно, до фармакопей Європи та Сполучених Штатів Америки – офіційно визнаною сировиною є кора верби білої. Однак, у Державній Фармакопеї

України не наведенні методи стандартизації кори та відсутні підходи до вивчення листя *Salix alba*, хоча сировинні запаси достатні [10].

В якості медичної сировини використовують кору верби білої (*Salicis cortex*), листя верби білої містять значну кількість біологічно активних речовин, але в медичній практиці листя не застосовують.

1.2. Біологічно активні речовини *Salix alba*

Фітохімічні і фармакологічні дослідження показують, що кора *Salicis cortex* у своєму складі містить фенологікозиди (саліцин, тріандрін, салікортин, флагінін); флаванони (еріодиціол, 5,7-дигідроксихромен-4-он та нарингенін); катехіни (епікатехін, галокатехін, галлат, епікатехін галлат); проантоціанідини (проціаніди В₁, В₂, В₃, В₄); антоціани (пурпуринідин, 3-глюкозид ціанідину, 3-глюкозид дельфінідину); лейкоантоціани; вищі жирні кислоти (лінолева, ліноленова); полісахариди (арабіногалактан, галактоглюкоманан, глюкоманан, пентозан, пектинові речовини (11,2%)). Кора проявляє в'язучу, бактерицидну, діуретичну, гомеостатичну, протидіарейні і седативні властивості, є ефективною при кровохарканні і ревматичних захворюваннях.

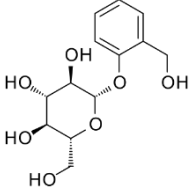
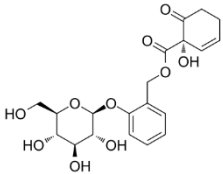
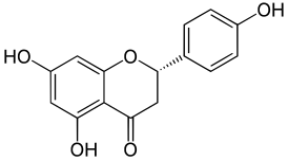
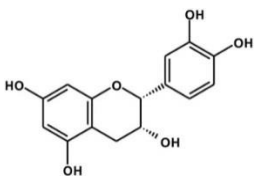
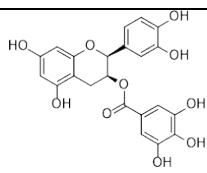
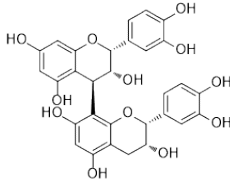
У листках верби білої наявні фенолкарбонові кислоти (хлорогенова, ізохлорогенова, гентизинова, ферулова кислоти, в гідролізаті міститься кумарова та кавова кислоти); кумарини (ескулетин та ескулін); флавоноїди (кверцетин, ізокверцетин, ізорамнетін, 3-О-глюкозид, лютеолін 7-глюкозид, лютеолін, апігенін); азотні сполуки (5-гідроксипіпеколева кислота). Найчастіше листя верби застосовують при простатиті, як жарознижувальний засіб, при безсонні, ревматичних болях, для розм'якшення мозолів.

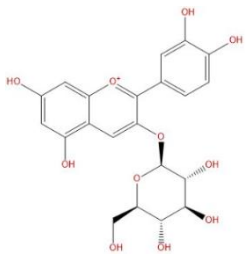
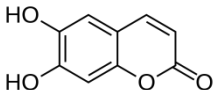
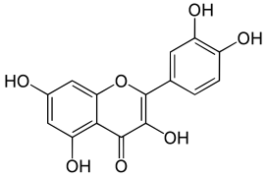
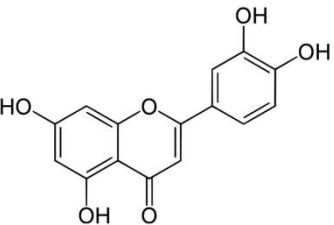
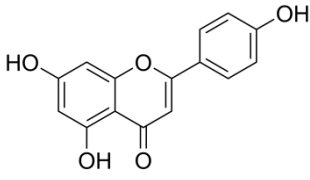
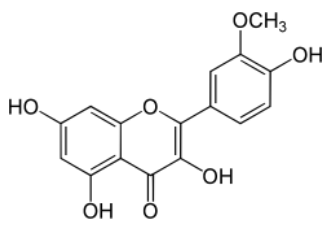
Також, у корі та листях *Salix alba* присутні дубильні речовини від 2 до 8%. Медичного застосування дубильних речовин з верби білої не має, однак їх застосовують у шкіряній промисловості для виробництва шкіри, яка придатна для підшви вищої якості. Хімічна структура біологічно активних речовин представлена у таблиці 1.2.

Пилок верби білої містить флаваноїди, такі як, астрагал, кверцимеритрин, кверцетин 3,7-ді-О-глюкозид [11–12].

Таблиця 1.2

Біологічно активні речовини

№	Речовина	Структурна формула
1	Саліцин	
2	Салікортин	
3	Нарингенін	
4	Епікатехін	
5	Епікатехін галлат	
6	Проціанідин В ₂	

7	3-глюкозид ціанідину	
8	Ескулетин	
9	Кверцетин	
10	Лютеолін	
11	Апігенін	
12	Ізорамнетін	

1.2.1. Фенологлікозиди

Фенологлікозиди або глікозиди фенольні – безбарвні або жовтуваті кристалічні речовини, добре розчинні у воді, етанолі та метанолі. Під дією кислот та ферментів здатні гідролізуватися на аглікон (невуглеводна частина глікозиду, що залишається після заміщення глікозидної групи глікозиду на гідроген) та вуглеводну частину. Проявляють антисептичну та дезінфікуючу дію [13].

Саліцин, глікозид саліцилового спирту, був вперше виділений в кристалічній формі з кори білої верби в 1828 році французьким фармацевтом Анрі Леру і італійським хіміком Раффаеле Піріа. При ферментативному гідролізі β -D-глюкозилтрансферази саліцилового спирту, саліцин утворює саліциловий спирт, який перетворюється в саліциловий альдегід і потім окислюється до саліцилової кислоти (рис. 1.2.) [12].

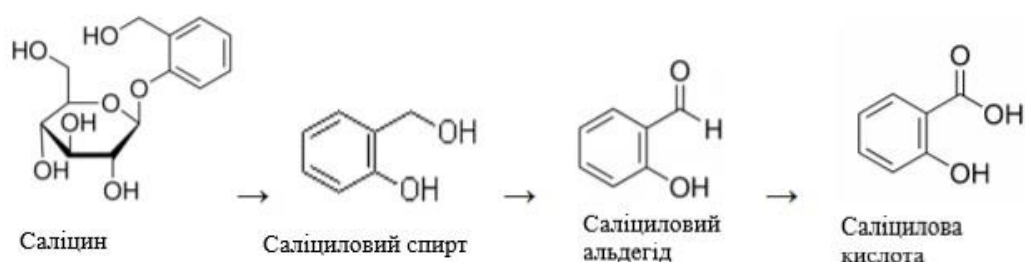


Рис. 1.2. Утворення саліцилової кислоти з саліцину

Саліцин може всмоктуватися в тонкому кишечнику, але у людини він переважно надходить у дистальний відрізок клубової кишки або товстої кишки, де флора кишечника перетворює глікозид в його аглікон, відомий як саліциловий спирт. Саліциловий спирт всмоктується і окислюється в крові, тканинах і печінці, отримуючи саліцилову кислоту, основну активну форму. Саліцин не подразнює шлунок навіть у великих дозах, на відміну від аспірину (похідним саліцилової кислоти), проте аспірин кращий за саліцин, як знеболюючий та антитромбоцитарний препарат. Саліцин виділений із кори верби білої проявляє протизапальну та жарознижувальну дію. Салікортин – похідна сполука саліцину,

при потраплянні у шлунок чи тонку кишку перетворюється на саліцин, проявляє протизапальну активність [14].

1.2.2. Флаванони

Флаванони – це похідні флаваноїдів, що за фізико-хімічними властивостями є безбарвними кристалами. Флаванони – лабільні сполуки і під впливом реагентів, що мають окислюючі властивості, переходять у халкони (клас флаваноїдів, що мають незамкнуте піранове кільце). Флаванони взаємодіють з лугами, оскільки здатні до вторинних перетворень і при взаємодії з лугами утворюють безбарвні або з жовтуватим відтінком розчини, які з часом стають яскраво-жовтими або червоними внаслідок їх ізомеризації в халкони. При взаємодії флаванонів із сірчаною кислотою з'являється яскраве жовтогаряче або червоне забарвлення, оскільки утворюються солі відповідних халконів, які мають сполучені подвійні зв'язки в іонах. Вони проявляють спазмолітичну дію [15].

Еріодіктіол є природним компонентом рослинної сировини. Він добре відомий своєю антиоксидантною, протизапальною і антимікробною активністю. Оскільки еріодіктіол має протизапальну дію, його використовують в якості потенційного терапевтичного засобу для лікування діабету 2 типу. Це привабливий кандидат на зниження рівня глюкози і поліпшення інсулінорезистентності засобів для лікування цукрового діабету. Еріодіктіол використовується у виробництві напоїв та фармацевтики для маскування гіркого смаку [16].

Нарингенін – флаваноїд, який є компонентом ряду рослини, найбільша концентрація міститься в цитрусових та помідорах. Нарингенін проявляє протипухлинні, антиоксидантні властивості та знижує рівень холестерину. Також відомо, що нарингенін прискорює метаболізм та всмоктування лікарських препаратів.

Метаболіт нарингеніну, нарингін має антипроліферативний ефект проти різних ракових клітин діючи на регуляторну дію генів p53 (білок, що регулює клітинний цикл і функціонує, як супресор пухлин) (молочна залоза, шийка матки,

матка, шлунок, підшлункова залоза, товста кишка та печінка). Нарингін суттєво пригнічує проліферацію клітин гепатоцелюлярної карциноми HepG2.

Припускається, що нарингенін може підвищити функції печінкової антиоксидантної системи та метаболізму гепатотоксичних агентів [16].

Дослідження показують, що нарингенін може чинити терапевтичний ефект проти COVID-19 через інгібування основної протеази COVID-19, 3CLpro. Одним з інших механізмів, за допомогою яких нарингенін може чинити терапевтичний ефект проти COVID-19, є часткове послаблення запальних реакцій. В цілому, сприятливі ефекти нарингеніну приводять до висновку, що нарингенін може розглядатися як перспективна стратегія лікування проти COVID-19. Однак вплив нарингеніну все ще має бути підтверджений в клінічних випробуваннях [17].

1.2.3. Катехіни кори верби білої

Катехіни відносяться до групи флаваноїдів, є поліфенольними сполуками. Катехіни – це безбарвні кристали і є оптично активними, так, катехін існує в чотирьох ізомерах, які відрізняються напрямком та кутом обертання (D- та L-катехіни, D- та L-епікатехіни) та біологічною дією [15].

Катехіни відомі своєю антиоксидантною, нейропротекторною та протизапальною активністю. Вважається, що їх здатність поглинати вільні радикали забезпечує захист від раку та серцевих захворювань.

Синергічна взаємодія між епікатехіном та епікатехіном галат запобігає пошкодженню клітин при впливі свинцю на клітини гепатоцелюлярної карциноми HepG2. При високих дозах у очищеному вигляді епікатехіну та епікатехіну галат відбувається пошкодження клітини, оскільки вони діють як виробники активних видів кисню, але при низьких концентраціях або в суміші з флаваноїдами - діють як поглиначі активних видів кисню [18].

1.2.4. Проантоціанідини

Проантоціанідини або інша їх назва – конденсовані таніни, являють собою олігомери і полімери мономерних флавоноїдів. Проантоціанідини варіюються за розміром від димерів до дуже великих полімерів, і містяться в багатьох продуктах харчування рослинної сировини і деяких харчових добавках. Проантоціанідини вважаються вторинними метаболітами рослин, тобто вони не потрібні для структурної або метаболічної цілісності організму, однак вони виконують функцію захисту рослин від впливу мікробів, грибків і т.д.

Проантоціанідини проявляють антиоксидантну, протипухлинну, протирадіаційну дію, використовується для захисту серцево-судинної системи [19].

Проціаніди – сильні антиоксиданти, його попередником є епікатехін – головний антиоксидант в зеленому і білому чаї. Так само, як і епікатехін, проціанід може ефективно пригнічувати активність найнебезпечніших вільних радикалів, посилювати активність вітаміну С і вітаміну Е в косметичних формулах, нормалізувати обмінні процеси і сприяти виведенню токсинів з шкіри [20].

Проціанідин В₂ (епікатехін-(4β-8)-епікатехін) має антиоксидантні властивості, а при взаємодії з Н₂О₂ та іонами металів проявляє – прооксидантні властивості. Дослідження показали, що проціанідин В₂ здатний інгібувати утворення 8-оксо-7,8-дигідро-2'-дезоксигуанозину (8-оксидG) у клітинній лінії лейкозу людини HL-60, обробленій системою генерування Н₂О₂. Але при високих концентраціях проціанідин В₂ здатний збільшувати утворення 8-оксидG у клітинах HL-60 [21].

1.2.5. Антоціани *Salix alba*

Антоціани – природні пігменти у рослинах – це найбільша водорозчинна група, відповідальна за червоні, фіолетові або сині рослинні пігменти, що містяться в більшості фруктів, пелюсток квітів та листя. Ці природні сполуки є промислово важливими для використання в якості харчових барвників і як потенційна заміна заборонених барвників, оскільки вони не мають негативних наслідків для здоров'я

людини. Антоціани проявляють антиоксидантні, протизапальні та антиканцерогенні властивості, вони можуть знизити ризик розвитку ішемічної хвороби серця шляхом пригнічення окислення ліпопротеїдів низької щільності у людини [18].

3-глюкозид ціанідину – антоціан, що є потенційно превентивною сполукою проти раку. Він проявляє високу активність проти росту твердих пухлинних клітин та метастазування *in vivo*. Дослідження показують, що 3-глюкозид ціанідину може функціонувати як потенційний протипухлинний засіб із незначною цитотоксичністю до нормальної тканини. Проте тривають подальші дослідження 3-глюкозид ціанідину, як терапевтичного та профілактичного засобу проти раку у людей [22].

1.2.6. Фенолкарбонові кислоти листя верби білої

Фенолкарбонові кислоти містяться практично у всіх рослинах як у вільному стані, так і у вигляді глікозидів. Фенолкарбонові кислоти мають виражену фармакологічну дію. Хлорогенова і кавова кислоти мають антимікробну і фунгістатичну дію, похідні кавової кислоти проявляють жовчогінну активність [23]. Також, хлорогенова і кавова кислота є антиоксидантами *in vitro*, оскільки знижують перекисне окислення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), і тому можуть сприяти профілактиці серцево-судинних захворювань [24].

Кумарова кислота і фенольна кислота, являє собою гідроксильне похідне коричної кислоти. Вони знижують перекисне окислення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) і знижують ризик раку шлунку [25].

Ферулова кислота здатна поглинати гідроксильні і пероксильні радикали, пригнічуючи поширення ланцюгової реакції перекисного окислення ліпідів. Він також зменшує еритему, викликану ультрафіолетовим випромінюванням, завдяки своїй високій ефективності в поглинанні оксиду азоту, що забезпечує високу ступінь захисту шкіри, діючи як екран, який поглинає ультрафіолетові промені. Ферулова кислота використовується в якості фотозахисного інгредієнта в багатьох лосьйонах для шкіри і сонцезахисних кремах [26].

1.2.7. Кумарини

Кумарини – вторинні метаболіти, що широко поширені в покритонасінних, але досить рідко зустрічаються серед голонасінних та нижчих рослин. Важливу роль кумарини відіграють у регулюванні росту рослин, поглинаючи УФ-світло і, таким чином, захищають рослину як від надмірного опромінення, так і від вірусних інфекцій.

Кумарини та похідні кумаринів у відповідь на інфікування або зараження рослини утворюють фітоалексини, які пригнічують розмноження патогенної мікрофлори і пришвидшують відновлення структурної та функціональної цілісності рослини. Кумарини – це безбарвні кристали у формі скляних пластинок з приємним і характерним запахом, добре розчинений у хлороформі, етанолі, ефірних оліях, але мало розчинний у воді, має максимум УФ-поглинання при 272 нм [27].

Кумарини мають різноманітну біологічну та фармакологічну дію, а саме інгібування/індукція ферментів, модуляція імунних клітин, вірусне інгібування, антиоксидантну та протипухлинну активність, стимулюють ендокринну систему. Також, застосовується у парфумерній промисловості, оскільки є запашною сполукою. Похідне кумарину, фітоалексин – виявляє антимікробну та протигрибкову активність і здатний інгібувати *Candida albicans* in vitro.

Ескулін – похідний кумарину, застосовується як судинно-захисний засіб. На основі ескуліну відомі такі препарати Ескузан, Анавенол, які є протизапальними препаратами [27].

Ескулетин, сполука кумарину, виявляє антиоксидантну та протизапальну дію, є інгібітором ксантиноксидази, а також проявляє антиоксидантну активність, індукує апоптоз у клітинах лейкозу людини шляхом збільшення цитозольної транслокації цитохрому *c* [27, 28].

1.2.8. Флавоноїди

Флавоноїди – це низько-молекулярні речовини, що містяться у фруктах, овочах, вині, чаї, найбільша їх кількість виявлена у рослинній сировині – 4000 хімічно унікальних флавоноїдів. Флавоноїди мають вагомий вплив на біохімію і фізіологію рослин, діючи як антиоксиданти, інгібітори ферментів, беруть участь в фотосенсибілізації і передачі енергії, дії гормонів росту рослин, контролі дихання, фотосинтезу і захисту рослин від інфекцій. Флавоноїди мають протиалергійну, протизапальну, противірусну, антипроліферативну та протипухлинну дії, а також впливають на певні аспекти метаболізму ссавців [29].

Кверцетин – відноситься до групи флавоноїдів, що проявляє потужну антиоксидантну активність і має багатосторонню дію на організм людини, а саме відновлення структури ушкоджених клітин печінки, перешкоджає згущенню крові, зміцнює імунну систему, регулює обмін глюкози в організмі, має здатність до підвищеного вироблення інсуліну, захищає клітини підшлункової залози від дії вільних радикалів і протидіє запальним процесам в організмі людини [30].

Кверцетин проявляє широкий спектр противірусних властивостей, які можуть впливати на кілька етапів вірулентності збудника – проникнення вірусу, реплікація вірусу, складання білка – і ці терапевтичні ефекти можуть бути посилені при одночасному застосуванні вітаміну С. Нині відомо, що до протоколу лікування COVID–19 від Eastern Virginia Medical School (США) включені кверцетин і вітамін С, як для профілактики, так і для раннього лікування інфекцій дихальних шляхів [31].

Лютеолін – це поширений флавоноїд, який використовувався у традиційній китайській медицині для лікування різних захворювань, таких як гіпертонія, запальні розлади та рак. Маючи численні біологічні ефекти, такі як протизапальні, протиалергійні та протипухлинні, лютеолін біохімічно діє як антиоксидант або прооксидант. Протипухлинна властивість лютеоліну пов'язана з індукцією апоптозу та пригніченням проліферації клітин, метастазуванням. Крім того, останні

епідеміологічні дослідження приписують лютеоліну властивість профілактики раку [32].

Апігенін – біоактивний флавоноїд, який має протизапальні, антиоксидантні та протиракові властивості. Епідеміологічні дослідження показують, що дієта, багата флавонами, пов'язана зі зниженням ризику деяких видів раку, зокрема раку молочної залози, травного тракту, шкіри, простати та деяких гематологічних злоякісних новоутворень. Існує припущення, що апігенін може захищати при інших захворюваннях, на які впливає окислювальний процес, таких як серцево-судинні та неврологічні розлади, хоча щодо цього потрібно провести більше досліджень. Клінічні випробування на людях, що б вивчали вплив добавок апігеніну на профілактику захворювання, не проводились, хоча існує значна можливість для розвитку апігеніну як хіміопротифілактичного засобу проти раку [33].

1.3. Висновки до розділу

Salix alba (верба біла) – дерево з родини *Salix*, сімейства Вербові (*Salicaceae*). *Salix alba* – поширена на більшій частині України, а саме на поліссі, лісостеп, степ, Карпати та Крим, оскільки клімат України сприятливий для росту і розвитку більшості видів роду *Salix*. Часто зустрічається уздовж річок, озер або інших природних джерел води.

В якості медичної сировини використовують кору верби білої (*Salicis cortex*), листя верби білої містять значну кількість біологічно активних речовин, але в медичній практиці листя не застосовують. Кора проявляє в'язучу, бактерицидну, діуретичну, гомеостатичну, протидіарейні і седативні властивості, є ефективною при кровохарканні і ревматичних захворюваннях. Найчастіше листя верби застосовують при простатиті, як жарознижувальний засіб, при безсонні, ревматичних болях, для розм'якшення мозолів.

Фітохімічні і фармакологічні дослідження показують, що кора верби білої у своєму складі містить фенологлікозиди, флаванони, катехіни, проантоціанідини, антоціани, лейкоантоціани, вищі жирні кислоти, полісахариди. У листках верби

білої наявні фенолкарбонові кислоти, кумарини, флавоноїди та азотні сполуки. Також, у корі та листях *Salix alba* присутні дубильні речовини від 2 до 8%. Пилок верби білої містить флаваноїди, такі як, астрагал, кверцимеритрин, кверцетин 3,7-ді-О-глюкозид.

Біологічно активні речовини кори та листя *Salix alba* мають широкий спектр різних властивостей, такі як, антиоксидантні, протизапальні, протипухлинні та противірусні. Припускається, що флаваноїд кверцетин та флаванон нарингенін можуть чинити терапевтичний ефект проти COVID–19.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

2.1. Об'єкт дослідження

Для фармацевтичної промисловості, сировиною верби білої – є кора (*Salicis cortex*). Кору *Salix alba* збирають з 2–6 річних дерев та гілок ранньої весни, до цвітіння та розпускання листків або ранньої осені. Для кращого та полегшеного зняття кори, роблять кільцеподібні надрізи на гілках, які з'єднують повздовжнім надрізом, в результаті утворюються трубочки або напівтрубочки (рис. 2.1.). Відразу після зняття, кору просушують розкладаючи в один шар на папері або тканині. Висушують кору у темному, добре провітрюваному приміщенні, також можуть використовуватись сушильні апарати при температурі не вище 50°C. Вважається кора сухою, якщо при згинанні вона тріскається [12, 34].



Рис. 2.1. Кора *Salix alba*

Макроскопічна характеристика: товщина кори від 1 мм до 2 мм, зовнішня поверхня гладка або злегка зморшкувата в поздовжньому напрямку, від зеленувато-жовтого до коричнево-сірого. Внутрішня поверхня поздовжньо гладка, без залишків деревини, блідо-солом'яного, світло-рожевого або світло-коричневого кольору.

Кора не має запаху, але має гіркий і терпкий смак. Сировину зберігають в паперових коробках, дерев'яних ящиках в сухих та добре вентильованих

приміщеннях. Облік сировини ведеться в тонах, перерахованих на вагу при відносній вологості кори 16 % [12, 34].

Порошок з кори верби білої має блідо-жовтий, зеленувато-жовтий або світло-коричневий [35].

Листя *Salix alba* необхідно збирати в період цвітіння (квітень–травень). Збирають листя в нижній та середній частини рослини разом з черешками. Листя не повинно бути пошкодженим та уражене хворобами чи комахами. Листя висушується за допомогою повітряно-тіньового сушіння або тепловим (конвективним) сушінням. При повітряно-тіньовому сушінні повинно приміщення добре провітрюватися для видалення вологи, що випаровується. Таке сушіння займає декілька діб і протягом всього періоду висушування листя необхідно перевертати. Конвективне сушіння краще за повітряно-тіньове, оскільки є можливість регулювання температури і процес висушування проходить швидше. За конвективного сушіння, листя верби розкладають у 2–3 шари і висушують при температурі 50–60°C. Висушена сировина може містити 8–15% вологи. Далі висушене листя переглядають на наявність дефектів та перевіряють якість листя. Після цього листя пакують, маркують та зберігають у сухих та вентиляваних приміщеннях [36, 37].

2.2. Методи виділення фенолглікозидів

Фенолглікозиди є предметом значного інтересу в екологічних і систематичних дослідженнях, особливо тих, які стосуються *Salicaceae*. Дослідниками Р. Л. Ліндрот та М. С. Паджунті, було виявлено що сублімаційна сушка та сушка за допомогою печі зразків роду *Salix* викликає різкі зміни загальних і відносних концентрацій конкретних фенольних глікозидів у порівнянні з аналізами свіжого матеріалу. Екстракція в водної та спиртової середовищах протягом тривалих (24 год) періодів також впливає на зміну концентрації глікозидів. Зміни концентрацій фенольних глікозидів, взаємні перетворення глікозидів є результатом гідролітичних реакцій.

Цих змін можна уникнути при використанні свіжого рослинного матеріалу, холодних неводних екстракційних розчинників та зменшення часу екстракції [38].

Стандартним методом для отримання фенолглікозидів з рослинного матеріалу є екстракція етиловим і метиловим спиртами (95, 70 і 40%). Водні витяжки очищають за допомогою дихлоретану, неполярних розчинників та чотирьох хлористим вуглецем [39].

Виділення індивідуальних сполук проводять, методом адсорбційної хроматографії на поліаміді, силікагелі, целюлози. Як елюенти використовується вода і водний розчин спирту, якщо адсорбентом служить поліамід або целюлоза.

Фенольні глікозиди в лікарській рослинній сировині можуть бути ідентифіковані методом хроматографії у тонкому шарі сорбенту або хроматографії на папері. Для хроматографії у тонкому шарі сорбенту використовують системи розчинників: 1) *n*-бутанол–оцтова кислота–вода у співвідношенні 4:1:5; 2) *n*-бутанол–оцтова кислота–вода–ксилол (6:2:3:4); 3) хлороформ–метиловий спирт (8:2). При хроматографії на папері використовують 5, 10, 15% оцтову кислоту [39].

Спосіб отримання саліцилатів (саліцину та салікортинів) з роду *Salix* був описаний у патенті RU2391408 С1.

Спосіб полягає в обробці сировини буферним розчином фосфорного калію з одночасним додаванням в кількості 0,1% від маси рослинної сировини ферментного комплексу, що містить ферменти целюлазу і β -глюканазу, з подальшою інактивацією ферментів при температурі $100\pm 5^\circ\text{C}$ протягом 10 хвилин. Після цього екстракт фільтрують, центрифугують, випарюють та висушують. Цей метод дозволяє інтенсифікувати процес екстракції фенольних сполук з рослинної сировини та зберегти біологічну цінність екстракту (рис. 2.2.).

Перший етап включає підготовку рослинної сировини, а саме кору роду *Salix* або листя висушують та подрібнюють. Другим етапом є екстракція при температурі 65°C протягом 20 годин. Екстракують калій-фосфатним буфером, $\text{pH}=5,5$ з одночасним додаванням ферментів целюлази та β -глюканази в кількості 0,1% від маси кори. Співвідношення сировини до екстрагентів 1:50 відносно маси [40].

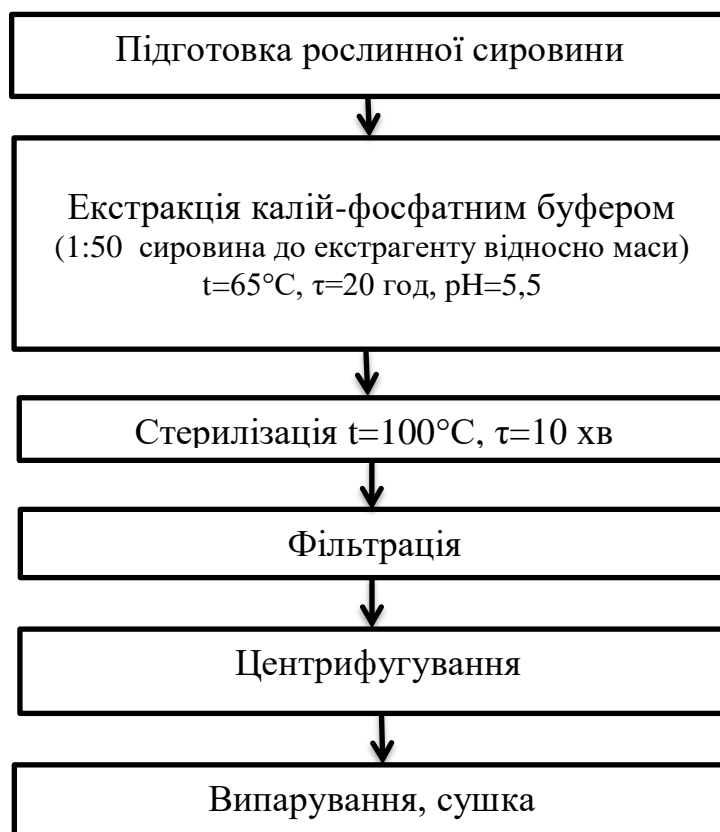


Рис. 2.2. Схема отримання саліцилатів з роду *Salix*

На третьому етапі інактивують ферменти шляхом стерилізації при температурі 100°C протягом 10 хвилин. Далі проводять фільтрацію екстракту, центрифугують, випарюють та висушують. Концентрацію саліцилатів визначають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Концентрація саліцину може становити до 15% від початкової маси кори або листя, але вона залежить від виду верби та місця її розташування.

В даному методі використовують ферменти целюлазу та β -глюканазу, для руйнування клітинної стінки, а саме для розщеплення целюлози та геміцелюлози, які містяться у великих кількостях в клітинній стінці. В свою чергу дезінтеграція клітинної стінки дозволяє збільшити вихід цільового продукту за рахунок підвищення інтенсивності екстракції. Екстракція відбувається при рН=5,5, що дозволяє уникнути розкладання фенольних сполук (похідних саліцину) і дозволяє зберегти біологічну цінність екстракту. Інактивація та стерилізація ферментів дозволяє знизити ризик контамінації екстракту [40].

2.3. Виділення флаванонів

Флаванони відносяться до менш полярних флаваноїдів, тому екстракцію проводять за допомогою хлороформа, дихлорметаном, діетиловим ефіром або етилацетатом.

Метод отримання еріодіктіолу описаний у патенті Роберта М. Горовіц, US2857318A, це – простий та економічно вигідний метод. Такий спосіб отримання включає в себе ферментативний гідроліз, екстракцію та очистку (рис. 2.3.) [41].

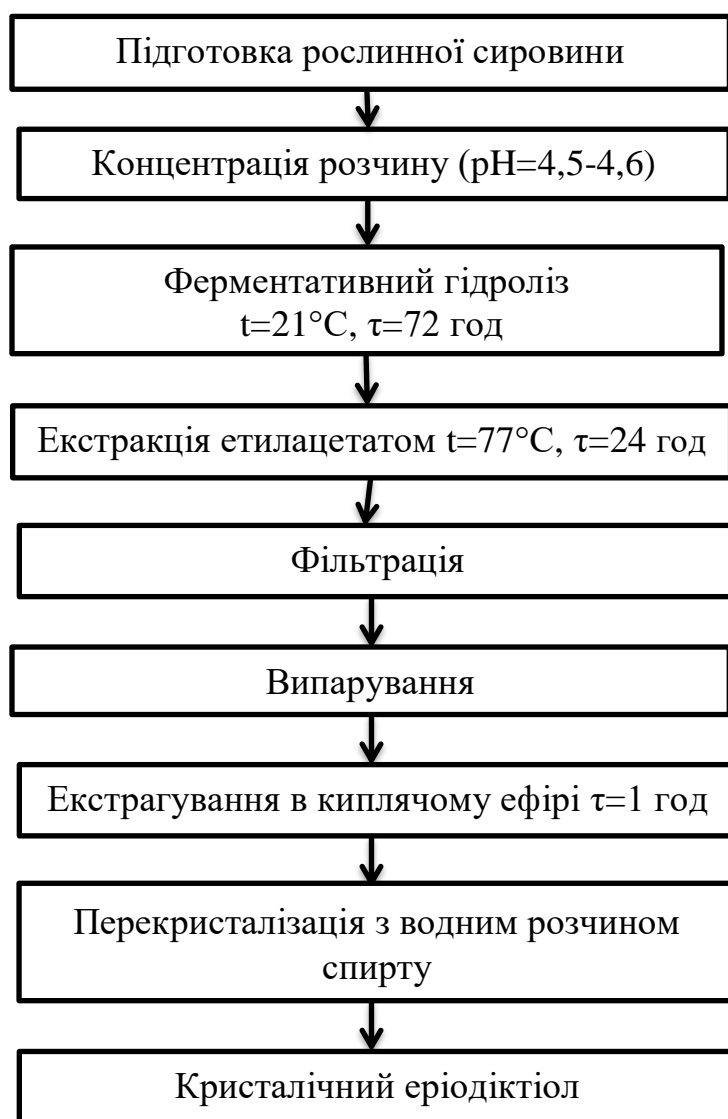


Рис. 2.3. Схема отримання еріодіктіолу

Спочатку підготовлюють лікарську сировину, висушують та подрібнюють у порошок. Порошок змішують з 0,1 М водним буферним розчином ацетату натрію і нагрівають до 50°C, потім охолоджують і фільтрують. рН розчину доводять до 4,5–4,6 оцтовою кислотою.

До розчину додають фермент геміцелюлаза і залишають на 72 години при кімнатній температурі. Після цього проводять екстракцію етилацетатом і отриманий екстракт фільтрують та випарюють. Отриманий кристалічний продукт очищають від домішок флаваноїдів шляхом екстрагування в киплячому ефірі протягом 1 години. Потім проводять доочистку методом перекристалізації з водним розчином спирту. Таким чином, отримується кристалічний еріодіктіол з температурою плавлення 268°C [41].

Відповідно до дослідження Aliefman Hakim, Jamaluddin [42] отримання нарингеніну включає такі стадії: підготовка матеріалу, мацерація, екстракція та перекристалізація (рис. 2.4.). Аналіз чистоти проводять за допомогою тонкошарової хроматографії, наявність функціональних груп перевіряють методом інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є.

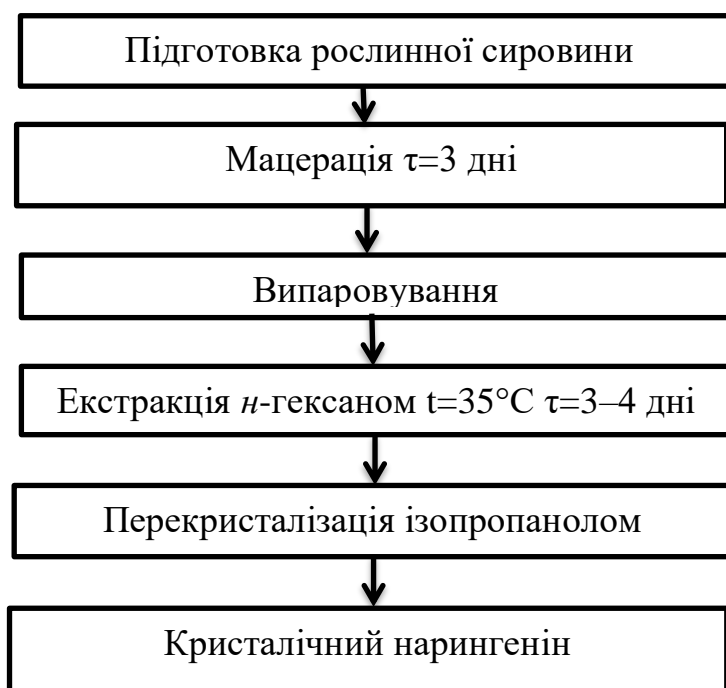


Рис. 2.4. Схема отримання нарингеніну

Попередньо підготовлений матеріал подрібнюють у порошок. Наступним етапом проводять мацерацію з метанолом протягом 3 днів. Фільтрат відділяють і випарюють у роторному випарнику для отримання сухого метанольного екстракту. До сухого метанольного екстракту додають воду та нагрівають до температури 70°C, 30 хвилин і екстрагують *n*-гексаном протягом 3–4 днів. Екстракцію проводять двічі для розчинення максимальної кількості домішок. Потім проводять перекристалізацію з ізопропанолом, для отримання кристалічного нарингеніну [42].

2.4. Методи виділення катехінів та проантоціанідинів

Для отримання катехінів та проантоціанідинів кору висушують, подрібнюють та просівають через сито для відбору частинок менше 1 мм. Для екстракції фенольних сполук використовують розчин етанол-вода у співвідношенні 30:70, екстракцію проводять при температурі 60°C. Отриманий водно-спиртовий екстракт випарюють у роторному випарнику при температурі 55°C до повного видалення розчинника.

Склад водно-спиртового екстракту визначають методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [43].

Один із способів отримання проантоціанідинів описаний в патенті RU2664709C2, цей спосіб є удосконаленим методом виділення проантоціанідинів із рослинного матеріалу, шляхом додаткової екстракції спиртової витяжки етилацетатом та ефіром (рис. 2.5.)

Висушену кору подрібнюють в порошок, просівають для отримання частинок розміром 1–3 мм. Подрібнену кору екстрагують метанолом при температурі 30–35°C протягом 3 годин. Отриманий осад відфільтровують, випарюють спиртовий розчин до 1/10 початкового об'єму. Отриманий розчин розбавляють водою (1:4) і послідовно екстрагують хлороформом, ефіром та етилацетатом. Осад виділяють на центрифугі і водний розчин випарюють у роторному випарнику. Хроматографію проводять у колонці із силікагелем з розміром частинок 0,040–0,063 мм, як елюент

використовують суміш дихлорметану з метанолом (1:1) і виділяють біологічно активну фракцію.

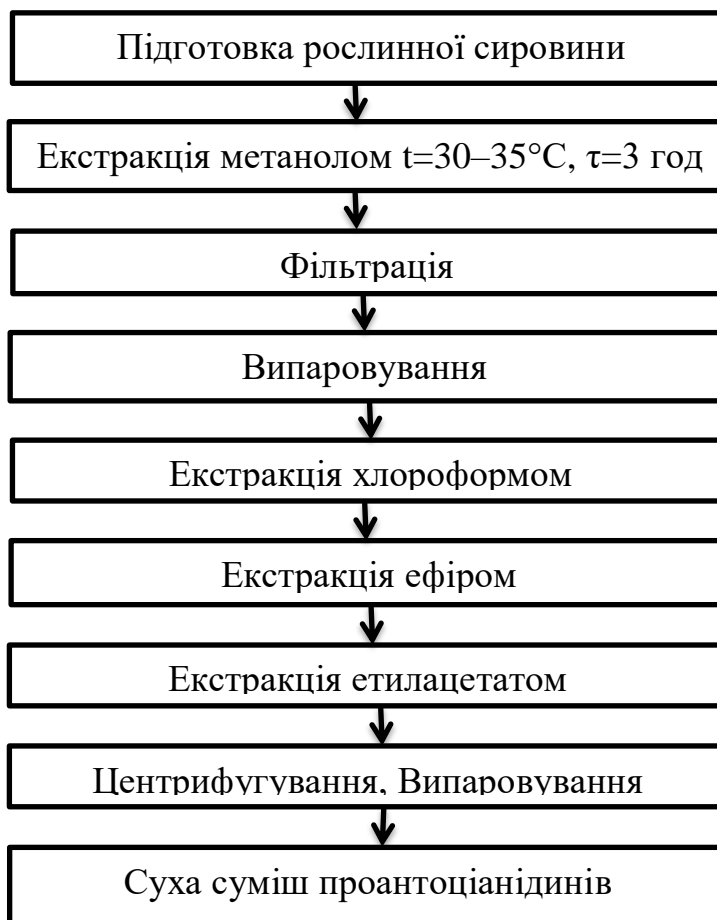


Рис. 2.5. Схема отримання проантоціанідинів

У якості сорбента вибраний силікагель, оскільки має високі показники хроматографічних властивостей і є економічним у використанні за рахунок його ефективної регенерації.

Підтвердженням того, що виділенні саме проантоціанідинів, є характерна для них реакція формування антоціанідинів. Проантоціанідинів нагрівають в кислих розчинах (етиловий спирт, що містить 4–7% хлоридної кислоти) в результаті утворюється ціанідин [44].

2.5. Методи виділення флавоноїдів із листя *Salix alba*

Для отримання флавоноїдів з рослинної сировини проводять підготовку сировини, а саме висушують, потім відбувається екстракція (етанолом, метанолом). Наступним кроком є випарювання спиртових витяжок, щоб залишився водний залишок, далі додають гарячу воду та видаляють баластні речовини такі як, хлорофіли, жирні олії, смоли (ліпофільні речовини). Після цього послідовно додають діетиловий ефір, етилацетат, пропанол та бутанол для отримання таких фракцій: аглікони, монозиди, біозиди та тріозиди відповідно. Отримані фракції поділяють на компоненти за допомогою колонної хроматографії на силікагелі, целюлози або поліаміді, елюентом є суміш хлороформу з спиртом [37].

Спосіб отримання кверцитину описаний у патенті WO2011073961A1 є високоефективним методом отримання кверцитину при зниженій витраті розчинника, а також екологічним, оскільки розчинники, що використовуються не є забруднювачами навколишнього середовища і в процесі не утворюються побічні продукти. Основними етапами отримання кверцитину є: підготовка рослинної сировини, водно-спиртова екстракція та висушування (рис. 2.6.) [45].

Рослинну сировину подрібнюють за допомогою млина ножевого. Далі проводять екстракцію при кип'ятінні із зворотнім холодильником протягом 12 год і включають такі стадії: а) Подрібнену сировину додають у водно-спиртову витяжку (1:1, вода:96% етанол) і проводять екстракцію при температурі 80°C протягом трьох з половиною годин у закритому реакторі. Суміш фільтрують до отримання першого проміжного водно-спиртового екстракту та залишку, що містить неекстраговану суміш з рослинної сировини. б) Отриманий водно-спиртовий екстракт повторно екстрагують з водно-спиртовим розчином (співвідношення 1:20), екстракція відбувається протягом трьох годин при температурі 80°C у закритому реакторі. в) Змішування першого та другого проміжних водно-спиртових екстрактів для отримання третього екстрагованого розчину. г) Екстракція свіжоподрібненої рослинної сировини третім екстрагованим розчином (співвідношення 1:30,

подрібнена рослина сировинна до третього екстрагованого розчину) протягом трьох годин при 80°C.

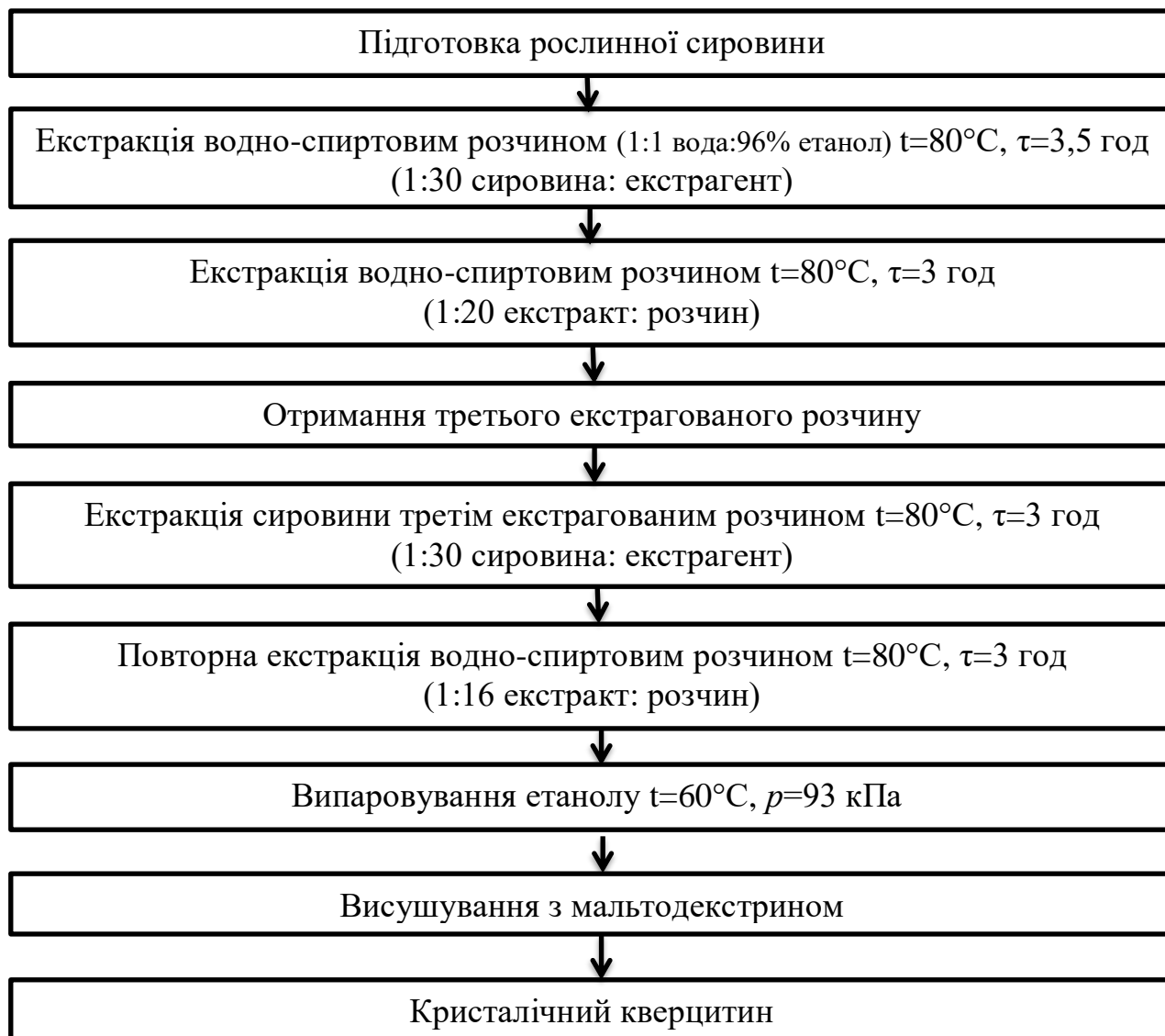


Рис. 2.6. Схема отримання кверцетину

д) Повторна екстракція водно-спиртового екстракту із стадії 2 температура 80°C протягом трьох годин в результаті отримуємо остаточно екстрагований розчин.

Після екстракції, з отриманого розчинну випарюють етанол, за допомогою вакуум випарної установки при температурі 60°C, вакуум 700 мм рт. ст. Отриману суміш змішують з мальтодекстрином та висушують за допомогою розпилювальної сушарки при температурі на вході 185°C на виході 85°C. В результаті утворюється жовтий кристалічний кверцетин [45].

2.6. Висновки до розділу

Для фармацевтичної промисловості, сировиною верби білої – є кора. Кору *Salix alba* збирають з 2–6 річних дерев та гілок ранньої весни, до цвітіння та розпускання листків або ранньої осені. *Salicis cortex* висушують у темному місці та добре провітрюваному приміщенні, або використовують сушильні апарати, але за температури не вище 50°C. Суха кора при згинанні повинна тріскатись.

Загальними стадіями для отримання біологічно активних речовин з *Salix alba* є підготовка рослинного матеріалу, а саме очищення, висушування та подрібнення кори. Екстракцію для фенолглікозидів, катехинів, проантоціанідинів проводять метиловим та етиловим спиртами, а для флаванонів, як екстрагенти використовують хлороформ, дихлорметан, діетиловий ефіром або етилацетат. Після екстракції розчин фільтрують, випаровують та отримують суху суміш біологічно активних сполук.

Найбільш цінними біологічно активними речовинами з кори верби білої є фенолглікозида, а саме саліцин та салікортин, а з листя – флавоноїд – кверцитин. Саліцилати екстрагують з попередньо висушеної та подрібненої кори, екстракцію проводять калій фосфатним буфером з одночасним додавання ферментів целюлази та β-глюканази. Ферменти додають для руйнування клітинної стінки, що дозволить підвищити інтенсивність екстракції і тим самим збільшити цільовий вихід продукту. Після цього, відбувається інактивація ферментів, шляхом стерилізації. Отриманий екстракт фільтрують, центрифугують, випарюють та висушують. Концентрацію саліцилатів визначають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Кверцитин отримують з листя верби білої, шляхом чотирьох разового повторювання екстракції із водно–спиртовою витяжкою, випаровуванням етанолу та висушуванням. Такий метод отримання кверцитину є високоефективним та екологічно чистим.

РОЗДІЛ 3

ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ КОРИ ТА ЛИСТЯ *SALIX ALBA*

3.1. Дослідження ринку лікарських препаратів на основі кори та листя *Salix alba*

Протягом останніх років на світовому фармацевтичному ринку спостерігається зростаюча тенденція використання рослинної сировини як основи для лікарських препаратів. За оцінкою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), частка лікарських препаратів на основі рослинної сировини в загальному обсязі фармацевтичних препаратів в найближчому майбутньому складе 60 відсотків, оскільки більше 12 відсотків населення світу страждає алергією, в тому числі на синтетичні препарати. За статистичними даними ВООЗ, близько 80% людей надають перевагу лікарським препаратам на рослинній сировині. Згідно з опитуваннями громадської думки, більше половини населення США та Німеччини вважають за краще лікування травами, і майже кожна друга людина в США приймає лікарські трави щодня, адже при правильному прийомі вони не мають негативного впливу, є доступними, та у комплексному застосуванні є ефективними. Рослинна лікарська сировина є перспективною основою для створення новітніх лікарських препаратів, оскільки вона є широко розповсюджена, відносно легко культивується, ефективною та безпечною [46–47].

Предметом дипломного дослідження є кора та листя верби білої, як рослинна сировина для фармацевтичної промисловості. Верба біла у своєму складі містить велику кількість біологічно активних сполук, такі як: фенологікозиди (саліцин, салікортин), що проявляють протизапальну, знеболюючу та жарознижувальну дію; флаванони (еріодіктіол, нарингенін) та катехіни (епікатехін, епікатехін галат) мають антиоксидантні, протизапальні та протимікробні властивості; проантоціанідини

застосовуються як антиоксиданти, протипухлинні агенти та здатні до захисту серцево-судинної системи [48].

Комплексна дія біологічно активних речовин з кори *Salix alba* проявляють антисептичну, протизапальну, протівірусну дію, підвищують бронхіальну секрецію, сечогінну дію, розширюють кровоносні судини та знижують ритм серця. Екстракт верби білої є перспективним при лікуванні артриту [49].

Кора *Salix alba* представлена у Американській, Британській та Європейській фармакопеях, і як сировину використовують – кору молодих гілок або однорічні гілки, діаметр яких не перевищує 10 мм. Наприклад, у Німеччині на фармацевтичному ринку зареєстровані 3 лікарських препарати, у яких сухий екстракт кори верби білої – є єдиною діючою речовиною: “Assalix”, “Optovit actiFlex” та “Proactiv”. У Франції зареєстровано 5 лікарських препаратів [50]. У Сполучених Штатах Америки застосовують препарати “Alleviate”, “Megaprin”, а у Пакистані – “Insti”, де верба біла є одним із основним компонентом лікування. Також, порошок верби білої використовують якості біологічно активних добавок – “Eight”, “VitaHelp” (США), “Гербаспрін” (Росія) [51].



Рис. 3.1. Лікарські препарати на основі кори верби білої

В Україні *Salix alba* не є фармакопейною рослиною, однак в останні роки широко вивчається хімічний склад кори та листя, методи виділення біологічно активних речовин, є дані про розробку параметрів стандартизації кори верби білої

[10], а це все створює умови для застосування сировини *Salix alba* на фармацевтичному ринку України та створювати нові лікарські препарати.

3.2. Вербка біла для лікування ревматоїдного артриту

Протягом останніх років ревматичні захворювання все більш привертають увагу дослідників. На даний момент найпоширенішим серед ревматичних хвороб – є ревматоїдний артрит. За даними А. Ногас ревматоїдний артрит уражає 1% населення (у Європі та США – 1–2%, а в Україні – 0,4%). Ревматоїдний артрит є не лише медичною проблемою, через швидкий перебіг захворювання та недостатньо ефективним лікуванням, а ще й є соціальною проблемою, оскільки внаслідок цього захворювання люди втрачають працездатність. Це захворювання частіше спостерігається у жінок і близько 50% хворих в розвинених країнах втрачають працездатність протягом 3–5 років з моменту захворювання [52].

Національний інститут раку описує ревматоїдний артрит (рис. 3.2.) як «аутоімунне захворювання, яке викликає біль, набряк і скутість суглобів і може викликати серйозне пошкодження суглобів, втрату їх функцій та інвалідність.



Рис. 3.2. Ревматоїдний артрит

Хворобу можна охарактеризована за чотирма окремими фазами: початкова фаза, на цьому етапі немає клінічних ознак захворювання, але у деяких пацієнтів можуть бути маркери в крові, які вказують на аутоімуннітет; рання запальна фаза, включає клінічні прояви, які можуть супроводжуватися або не супроводжуватися підтвердженим діагнозом ревматоїдного артриту; деструктивна фаза, що включає ерозії і прогресування хвороби; і хронічна фаза, що супроводжується незворотнім руйнуванням суглоба [53].

На фармацевтичному ринку світу є препарати на основі верби білої, що застосовуються при ревматичному артриті (рис. 3.3.), такі як: «Alleviate» – мазь, що застосовується для профілактики та лікування суглобово-м'язових травм і запалень, а саме при міозитах, артритах різного походження, ревматизмі, остеохондрозі [49]; «Assalix» – німецький препарат у вигляді таблеток, що застосовують при ревматичних запаленнях, болях у суглобах, поперековому та шийному відділах хребта і проявляє протизапальну та протиревматичну дію; американський препарат «Megaprin» – проявляє антиоксидантні, протизапальні та знеболюючі властивості, покращує кровообіг, застосовується при артриті, остеохондрозі, захворюваннях хребта, ішемічній хворобі серця [51].



Рис. 3.3. Лікарські препарати для лікування ревматоїдного артриту

За даними «GlobalData» очікується, зростання препаратів для лікування ревматоїдного артриту на фармацевтичного ринку і складатиме 29,1 млрд дол. США, що на 2,9 млрд дол. США більше чим було у 2019 (26,2 млрд дол. США). Незважаючи на зростання та розвиток ринку, проте на ринок будуть серйозно впливати патенти на біологічні препарати, у яких закінчується строк дії та

збільшення кількості біосимілярів (частка біосимілярів збільшиться з 5% до 28% протягом 2019–2029 років) [54].

3.3. Висновки до розділу

Протягом останніх років на світовому фармацевтичному ринку спостерігається зростаюча тенденція використання рослинної сировини як основи для лікарських препаратів. За оцінкою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), частка лікарських препаратів на основі рослинної сировини в загальному обсязі фармацевтичних препаратів в найближчому майбутньому складе 60 відсотків, оскільки більше 12 відсотків населення світу страждає алергією, в тому числі на синтетичні препарати.

На сьогоднішній день відомо декілька лікарських препаратів на основі кори верби білої, “Assalix”, “Alleviate” та “Megaprin”, що застосовуються при лікуванні ревматоїдного артриту; “Uroflux ” для лікування нирок, та біологічно-активні добавки: “VitaHelp”, “Гербаспрін”, що використовуються як допоміжні препарати при лікуванні бронхо-легеневих захворювань.

В Україні *Salix alba* не є фармакопейною рослинною, однак в останні роки широко вивчається хімічний склад кори та листя, методи виділення біологічно активних речовин, є дані про розробку параметрів стандартизації кори верби білої, а це все створює умови для застосування сировини *Salix alba* на фармацевтичному ринку України та створювати нові лікарські препарати.

ВИСНОВКИ

1. *Salix alba* (верба біла) – дерево з родини *Salix*, сімейства Вербові (*Salicaceae*). *Salix alba* – поширена на більшій частині України, а саме на поліссі, лісостеп, степ, Карпати та Крим. Як медичну сировину використовують кору верби білої (*Salicis cortex*). Фітохімічні і фармакологічні дослідження показують, що кора *Salicis cortex* у своєму складі містить фенологікозиди, флаванони, катехіни, проантоціанідини, антоціани, лейкоантоціани, вищі жирні кислоти, полісахариди. У листках верби білої наявні фенолкарбонові кислоти, кумарини, флавоноїди та азотні сполуки.

2. В якості медичної сировини використовують кору верби білої (*Salicis cortex*), листя верби білої містять значну кількість біологічно активних речовин, але в медичній практиці листя не застосовують. Кора проявляє в'язучу, бактерицидну, діуретичну, гомеостатичну, протидіарейні і седативні властивості, є ефективною при кровохарканні і ревматичних захворюваннях. Найчастіше листя верби застосовують при простатиті, як жарознижувальний засіб, при безсонні, ревматичних болях, для розм'якшення мозолів.

Біологічно активні речовини кори та листя *Salix alba* мають широкий спектр різних властивостей, такі як, антиоксидантні, протизапальні, протипухлинні та протівірусні. Припускається, що флаваноїд кверцетин та флаванон нарингенин можуть чинити терапевтичний ефект проти COVID–19.

3. Найбільш цінними біологічно активними речовинами з кори верби білої є фенологікозиди, а саме саліцин та салікортин, а з листя флаванон – кверцетин.

Саліцилати екстрагують з попередньо висушеної та подрібненої кори, екстракцію проводять калій фосфатним буфером з одночасним додавання ферментів целюлази та β -глюканази. Ферменти додають для руйнування клітинної стінки, що дозволить підвищити інтенсивність екстракції і тим самим збільшити цільовий вихід продукту. Після цього, відбувається інактивація ферментів, шляхом стерилізації. Отриманий екстракт фільтрують, центрифугують, випарюють та висушують.

Концентрацію саліцилатів визначають за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії.

Кверцитин отримують з листя верби білої, шляхом чотирьох разового повторювання екстракції із водно-спиртовою витяжкою, випаровуванням етанолу та висушуванням. Такий метод отримання кверцитину є вискоєфективним та екологічно чистим.

4. В Україні *Salix alba* не є фармакопейною рослиною, однак в останні роки широко вивчається хімічний склад кори та листя, методи виділення біологічно активних речовин, є дані про розробку параметрів стандартизації кори верби білої, а це все створює умови для застосування сировини *Salix alba* на фармацевтичному ринку України та створювати нові лікарські препарати.

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ

1. Ива белая – *Salix alba* L. Аналитический обзор / Б.М. Зузук, Р.В. Куцик, А.Т. Недоступ [и др.]. // Провизор. – 2005. – №16. – С. 27–29.
2. Пастушенков, Л. В. Лекарственные растения. Использование в народной медицине и быту: 5-е изд., перераб. и доп. / Л. В. Пастушенков, А. Л. Пастушенков, В. Л. Пастушенков. – Санкт-Петербург: БХВ-Петербург, 2012. – 432 с.
3. Залесова Е. Н. Полный русский иллюстрированный словарь-травник и цветник / Е. Н. Залесова, О. Н. Петровская. – Москва: "Остеон-Фонд", 2014. – 557 с.
4. Лавренов В. К. Современная энциклопедия лекарственных растений / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – Москва: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп», 2003. – 272 с.
5. *Salix alba*-White Willow [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/girard_stev/habitat.htm.
6. Chevallier A. Encyclopedia of Herbal Medicine: 550 Herbs and Remedies for Common Ailments / Andrew Chevallier. – New York: Dorling Kindersley, 2016. – 336 p.
7. Іщук Л. П. Рід *Salix* L. в Україні/ Л. П. Іщук. // Вісті Біосферного заповідника "Асканія-Нова". – 2015. Т.17. – С. 35–43.
8. Лавренов В. К. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – Санкт-Петербург: Нева, 2003. – 272 с.
9. Подоляк А. Травник. Описание 300 лекарственных растений и способы их применения от 100 самых распространенных заболеваний / А. Подоляк. – Москва: Эксмо, 2015. – 896 с.
10. Тернинко І.І. Розробка параметрів стандартизації сировини верби білої / Тернинко І.І. / Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин : матеріали I Міжнародної науково-практичної internet-конференції (м. Харків, 20-21 березня 2014 р.). – 2014. – С. 260–261.
11. Khare C. P. Indian herbal remedies / C. P. Khare. – New Delhi: Springer, 2004. – 533 p.

12. Vasfilova E. S. Medicinal plants: *Salix alba* L / E. S. Vasfilova. // Skvortsovia. – 2020. – №5. – P. 10–21.
13. Енциклопедичний тлумачний словник фармацевтичних термінів : українсько-латинсько-російсько-англійський: навч. посіб. для студ. вищих навч. закладів / [уклад.: І. М. Перцев, Є. І. Світлична, О. А. Рубан та ін.]; за ред. проф. В. П. Черниха. – Вінниця : Нова Книга, 2014. – 824 с.
14. Bone K. Principles and Practice of Phytotherapy. Modern Herbal Medicine / K. Bone, S. Mills. – Texas: Churchill Livingstone Elsevier, 2013. – 1065 p.
15. Лікарські рослини і лікарська рослинна сировина, які містять фенольні сполуки, алкалоїди і різні групи БАР. Товарознавчий аналіз. Модуль 2 : навчально-методичний посібник з фармакогнозії з основами фітокосметики для студентів 3 курсу фармацевтичного факультету (спеціальність «Технології парфумерно-косметичних засобів») / уклад. С. Д. Тржецинський, В. С. Доля, О. М. Денисенко [та ін.]. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2014. – 136 с.
16. Ronald Ross Watson. Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease / Ronald Ross Watson, Victor R Preedy, Sherma Zibadi. – San Diego: Academic Press, 2018. – 484 p.
17. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19 [Електронний ресурс] / Helda Tutunchi, Fatemeh Naeini, Alireza Ostadrahimi, Mohammad Javad Hosseinzadeh-Attar // NCBI. – 2020. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361426/>.
18. Jean-Hugues B. Hatier. Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications / Jean-Hugues B. Hatier, Kevin S. Gould. – New York: Springer-Verlag, 2009. – 345 с.
19. Encyclopedia of dietary supplements / Paul M. Coates, Marc Blackman, Jeffrey D. White та ін.]. – New York: Marcel Dekker, 2005. – 842 p.
20. Орасмяэ-Медер Т. Наука красоты: из чего на самом деле состоит косметика / Т. Орасмяэ-Медер, О. Шатрова. – Москва: Альпина Паблицер, 2016. – 376 с.

21. Procyanidin B₂ has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage / Katsuhisa Sakano, Mika Mizutani, Mariko Murata та ін.]. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2005. – №39. – P. 1041–1049.
22. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity / Min Ding, Rentian Feng, Shiow Y. Wang та ін.]. // *Journal of biological chemistry*. – 2006. – №281. – P. 17359–17368.
23. Изучение фенолкарбоновых кислот побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на северном Кавказе/ Е. Г. Санникова, О. И. Попова, Е. В. Компанцева, О. О. Фролова. // *Фармация и фармакология*. – 2015. – №2. – С. 13–17.
24. Margreet R. Olthof. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans / Margreet R. Olthof, Peter C. H. Hollman, Martijn B. Katan. // *The Journal of Nutrition*. – 2001. – №131. – P. 66–71.
25. Ismail Kilic. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid / Ismail Kilic, Yeşim Yeşiloğlub. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2013. – №115. – P. 719–724.
26. Wypych G. Handbook of Uv Degradation and Stabilization / George Wypych. – Toronto: ChemTec Publishing, 2020. – 500 p.
27. Sherma J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis / J. Sherma, M. Waksmundzka-Hajnos. – New York: CRC Press, 2010. – 998 p.
28. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells / Chia-YihChu, Yu-YingTsai, Chau-JongWang та ін.]. // *European Journal of Pharmacology*. – 2001. – №416. – P. 25–32.
29. Harborne J. B. The Flavonoids advances in research since 1986 / J. B. Harborne. – New York: CRC Press, 2017. – 689 p.
30. Івашків Л. Я. Нові класи інгредієнтів продуктів харчування та їхні функціональні властивості / Л. Я. Івашків. // *Проблеми харчування*. – 2010. – №3–4. – С. 61–66.
31. Quercetin and Vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19) [Електронний ресурс] / Ruben Manuel Luciano Colunga Biancatelli, Max Berrill, John D. Catravas, Paul

Е. Marik // *Frontiers Immunology*. – 2020. – Режим доступу до ресурсу: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451> .

32. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy [Електронний ресурс] / Yong Lin, Xia Wang, Ranxin Shi, Han-Ming Shen // *Current Cancer Drug Targets*. – 2008. – Режим доступу до ресурсу: <https://doi.org/10.2174/156800908786241050> .

33. Sanjeev Shukla. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention [Електронний ресурс] / Sanjeev Shukla, Sanjay Gupta // *Springer link*. – 2010. – Режим доступу до ресурсу: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-010-0089-7>.

34. Акаткіна Н. В. Морфологія та анатомія пагонової системи *Salix alba* : кваліфікаційна робота бакалавра біол. наук : 014.05 / Акаткіна Н. В. – Херсон, 2020. – 36 с.

35. Willow bark [Електронний ресурс] / *European Pharmacopeia 5.0* // *European Pharmacopeia 5.0* – Режим доступу до ресурсу: http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_q-z/Willow%20bark.pdf .

36. Гаммерман А. Ф. Справочник по сбору лекарственных растений / А. Ф. Гаммерман. – Москва: Союзхимфармторг, 1959. – 288 с.

37. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків: НФаУ, 2004. – 704 с.

38. Lindroth R. L. Chemical analysis of phenolic glycosides: art, facts, and artifacts / R. L. Lindroth, M. S. Rajutee. // *Oecologia*. – 1987. – № 74. – Р. 144–148.

39. Биологически активные вещества растений (полисахариды, эфирные масла, фенологликозиды, кумарины, флавоноиды) : Учебное пособие / В.М. Миревич, Е.Г. Привалова. – Иркутск: ИГМУ, 2018. – 70 с.

40. ПАТЕНТ РФ 2391408 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.docme.ru/doc/2703447/patent-rf-2391408> .

41. Google Patents [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://patents.google.com/patent/US2857318A/en> .

42. New method for isolation of naringin compound from *Citrus maxima* / Hakim A., Jamaluddin, Loka I.N та ін.]. // Natural Resources. – 2019. – №10. – P. 299–304.

43. Rodrigo A Sarria-Villa. Isolation of catechin and gallic acid from colombian bark of *Pinus patula* [Електронний ресурс] / Rodrigo A Sarria-Villa, José A Gallo-Corredor, Martha Isabel Páez // Chemical Science Journal. – 2017. – Режим доступу до ресурсу:

https://www.researchgate.net/publication/322782574_Isolation_of_Catechin_and_Gallic_Acid_from_Colombian_Bark_of_Pinus_patula .

44. Google Patents [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://patents.google.com/patent/RU2664709C2/ru> .

45. Google Patents [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://patents.google.com/patent/WO2011073961A1/en> .

46. Россияне тратят на органические продукты в 100 раз меньше американцев [Електронний ресурс] // Agro2b. – 2018. – Режим доступу до ресурсу: <http://agro2b.ru/ru/news/47545-rossiane-tratat-na-organiceskie-produkty-v-100-raz-mense-amerikancev.html>.

47. Шостак А. Т. Особливості фармацевтичної розробки рослинних препаратів (огляд літератури) / А. Т. Шостак, Т. Г. Калинюк, Н. І. Гудзь. // Біологія та фармація. – 2014. – №4. – С. 77–82.

48. Фролова О. О. Биологически активные вещества растений рода Ива (*Salix* L.) / О. О. Фролова, Е. В. Компанцева, Т. М. Дементьева. // Pharmacy & Pharmacology. – 2016. – Т.4 – С. 41–59.

49. Вишневська Л. І. Дослідження щодо перспективності розробки лікарських препаратів із корою верби білої / Л. І. Вишневська, Д. О. Михайлик, В. В. Постой. // Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології і: Матеріали науково-практичної конференції, присвяченій 100 річчю з дня народження видатного українського фармаколога, професора Ярослава Борисовича Максимовича, 10 річчю з дня заснування Одеського медичного інституту МГУ, та Дню Фармацевта. м. Одеса, 4 жовтня 2019 р. – 2019. – С. 120–123.

50. Ерденбай А. Н. Изучение химического состава CO₂ экстракта коры ивы белой, полученного а докритических условиях / А. Н. Ерденбай, Э. М. Бисенбаев, Г. С. Ибадуллаева. // Вестник КазНМУ. – 2017. – №1. – С. 424–428.

51. Щодо розробки екстемпорального гелю для терапії гострих запалень суглобів / В. В. Постой, Л. І. Вишневська, М. Л. Бавикіна, Д. О. Михайлик // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології : зб. наук. пр. – 2018. – Вип. 4. – С. 195–198.

52. Ногас А. Ревматоїдний артрит – сучасний стан проблеми / А. Ногас. // Лікувальна фізична культура, спортивна медицина й фізична реабілітація. – 2013. – №1(21). – С. 298–301.

53. Michael H. Weisman. Rheumatoid Arthritis / Michael H. Weisman. – New York: Oxford University Press, 2011. – 91 p.

54. Прогнозується зростання світового ринку препаратів для лікування ревматоїдного артриту [Електронний ресурс]. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.apteka.ua/article/582285> .