

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

Факультет хімії та фармації

Кафедра фармакології та технології ліків

Д и п л о м н а р о б о т а

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

на тему: «Хімічний аналіз та фармакологічна активність екстракту
Juglans nigra».

«Chemical analysis and pharmacological activity of *Juglans nigra* extract»

Виконала: студентка денної форми навчання
Спеціальності 102 Хімія

Казанцева Анастасія Сергіївна

Керівник: к. б. н., доц. Еберле Л.В. _____
Рецензент: к.х.н., доц. Шматкова Н.В. _____

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
№ _____ від _____ 2023 р.

Захищено на засіданні ЕК № _____
протокол № _____ від « _____ » _____ 2023 р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою/ за шкалою ECTS/ бал)

Завідувач кафедри
_____ проф. Грищук О.І.
(підпис)

Голова ЕК
_____ д. х. н., проф. Шевченко О.В.
(підпис)

Одеса – 2023

Реферат

Дипломна робота виконана на кафедрі фармакології та технології ліків факультету хімії та фармації Одеського національного університету імені І.І. Мечникова і присвячена дослідженню хімічного аналізу та фармакологічній активності екстракту *Juglans nigra*.

Основна мета роботи полягала у детальному вивченні технологічних параметрів речовини, підбору оптимальних умов екстракції, які забезпечили б максимальне вилучення фенольних сполук, ідентифікації вмісту поліфенольного складу рослинної сировини методом вискоефективної рідинної хроматографії, та дослідженню фармакологічної активності екстракту.

За результатами проведеного дослідження були встановлені технологічні параметри та оптимальні умови екстракції рослинного матеріалу. Було показано, що найбільший вміст фенольних сполук відзначався в околопліднику горіху чорного, ніж в його листі. Методом вискоефективної рідинної хроматографії показано, що дослідний зразок екстракту містить 8 груп фенольних сполук, а саме: фенольні кислоти, катехіни, катехіноподібні, флаваноли, флаванони, флавоноподібні, антоціани. На моделях *in vitro* було показано, що екстракт *Juglans nigra* проявляв вираженні протизапальні та знеболюючі активності за умов трансдермального нанесення.

Кваліфікаційна робота викладена на 50 сторінках друкованого тексту та містить: 9 таблиць; 10 рисунків; використано 40 літературних джерел.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Ботанічний огляд <i>Juglans nigra</i>	7
1.2. Хімічний склад <i>Juglans nigra</i>	9
1.3. Застосування <i>Juglans nigra</i> в народній медицині.....	11
1.4. Протипоказання застосування <i>Juglans nigra</i>	13
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	14
2.1. Об'єкти дослідження.....	14
2.2. Методики проведення експерименту.....	14
2.2.1. Визначення втрати в масі при висушуванні.....	14
2.2.2. Дослідження технологічних параметрів сировини.....	14
2.2.3. Дослідження вмісту поліфенольних сполук в екстрактах методом Фоліна-Чокальтео.....	15
2.2.4. Ідентифікація фенольних сполук методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)	17
2.2.5. Дослідження трипсинового запалення у щурів.....	19
2.2.6. Дослідження аналгетичної активності при термічному подразненні у тесті «гаряча пластина».....	21
2.2.7. Дослідження аналгетичної активності на моделі термічного подразнення хвоста у щурів	22
2.2.8. Статистична обробка результатів експерименту.....	23
2.3. Результати та їх обговорення	28
2.3.1. Втрата в масі <i>Juglans nigra</i> при висушуванні в термостаті.....	28
2.3.2. Визначення технологічних параметрів <i>Juglans nigra</i>	30
2.3.3. Дослідження пігментів в сировині <i>Juglans nigra</i>	32
2.3.4. ВЕРХ спиртових екстрактів з околоплідника <i>Juglans nigra</i>	36
2.3.5. Дослідження протизапальної активності екстракту <i>Juglans nigra</i> на моделі трипси нового запалення.....	39

2.3.6 Дослідження аналгетичної активності мазі на основі екстракту <i>Juglans nigra</i> в тесті «гаряча пластина» та «теплова імерсія хвоста».....	40
2.3.7. Дослідження аналгетична активність мазі з екстрактом чорного горіха в тесті «формалін-індукованого болю».....	42
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	45

ВСТУП

Актуальною проблемою фармацевтичної науки на сучасному етапі є пошук нових джерел ефективних препаратів, а зокрема, за рахунок розширення асортименту з відомих традиційних лікарських рослин. Одною з таких перспективних культур, адаптованих до умов України, є чорний горіх (*Juglans nigra*) з сімейства Горіхових (*Juglandaceae*).

В Україні чорний горіх відомий своїми лікувальними властивостями, який застосовується, як антибактеріальний (за рахунок багатого вмісту: таніну, елагової кислоти, йоду), протизапальний, противірусний, антиоксидантний, протигрибковий, знеболюючий, седативний та імуностимулюючий засіб. [1].

Листя та плоди *Juglans nigra* містять ряд біологічно активних речовин, таких, як: сполуки поліфенольної природи, флавоноїди, сапоніни, антоціаніди, фітостероли, поліпреноли та дубильні речовини [2, 3].

Мало вивченими є плоди дерева – горіхи *Juglans nigra*. У складі ядра цих плодів міститься багато споживчих речовин, а саме: жиру – 48-66%, багато білку та вуглеводів, а також мінеральні речовини, такі як азот, фосфор, кобальт, сірка, цинк, йод, дубильні речовини, вітаміни А, В, С, Е та інші. Але калорійність в нього, набагато більша, ніж у коров'ячого молока або м'яса свинини та близька за значенням до масла з вершків. Також горіх має велику кількість ненасичених жирних кислот у своїй олії. І саме ці жирні кислоти захищають наш організм від канцерогенних речовин, які утворюють пухлини і сприяють поширенню метастаз. І навіть переважають плоди грецького горіху за кількістю вітаміну С у 10 разів, а цитрусові майже у 40-50 разів [4].

У фармакології плоди чорного горіху використовують для виготовлення препаратів юглон і карнон. Велике значення ця культура має для селекції, оскільки легко запилюється іншими видами роду *Juglans*, утворюючи гібриди природним шляхом. Гібриди горіха чорного та грецького

дозволили б збільшити ареал розповсюдження цих рослин і підвищувати їх урожай [5].

Таким чином, є доцільним подальше вивчення *Juglans nigra* і створення на підставі проведених фіто-хімічних досліджень мазі на основі екстракту чорного горіху для впровадження в терапевтичну практику.

Метою наших досліджень було фітохімічне та фармакологічне дослідження *Juglans nigra* в якості джерела нового виду лікарської рослинної сировини.

Для досягнення поставленої мети були встановлені наступні завдання:

1. Дослідити технологічні параметри листя, плоду та околопліднику горіху *Juglans nigra*.

2. Встановити оптимальні умови екстрагування *Juglans nigra* в залежності від концентрації етилового спирту.

3. Дослідити кількісний вміст поліфенольних сполук в листі, плодах та околопліднику горіху *Juglans nigra* по методу Фоліна-Чокальтео.

4. Провести аналіз поліфенольних сполук в екстракті околопліднику горіху *Juglans nigra* методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

5. Дослідити протизапальну активність екстракту *Juglans nigra* на моделі трипси нового запалення.

6. Встановити аналгетичну активність екстракту *Juglans nigra* на термічних та хімічних моделях дослідження.

Об'єкт дослідження – листя, плід, околоплідник *Juglans nigra*.

Предмет дослідження – вибір оптимальної технології отримання екстракту, встановлення кількісного вмісту основних груп БАР, технологічні параметри, аналіз ВЕРХ, протизапальна та аналгетична активність.

Методи дослідження: титрометричні, спектрофотометричні, статистичні.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що маса сухого залишку листя, плоду та подрібненого околоплідника *Juglans nigra* складає $41,8 \pm 0,9$ %, $83,3 \pm 4,1$ % та $30 \pm 0,17$ %, відповідно. Вміст вологи в зразках листя, плоду та околоплідника *Juglans nigra* складає 58,2 %, 16,7 % та 70 %, відповідно.

2. Вперше розроблено спосіб отримання екстракту з чорного горіху, використовуючи результати визначення технологічних параметрів (насипної маси, питомної маси, об'ємної маса, порізненість сировини, пористість сировини, вільний об'єм).

3. Визначено, оптимальні умови екстрагування *Juglans nigra* для максимального вилучення поліфенолів з використанням як екстрагенту 70 % водно-етанольної суміші у співвідношенні 1:8 та подрібненні рослиної сировини діаметром до 3 мм.

4. Досліджено сумарний вміст ПФС методом Фоліна-Чекольтео в перерахунку на галову кислоту в листі ($3,78 \pm 0,4$ мг/г сухої сировини), плодах ($3,65 \pm 0,6$ мг/г сухої сировини) та околопліднику ($4,55 \pm 0,5$ мг/г сухої сировини) *Juglans nigra*.

5. Методом високоефективної рідинної хроматографії було ідентифіковано та встановлено кількісний вміст катехінів (катехін – 22,17 мкг/мл), флаванолів (рутин – 8,36 мкг/г, кверцетин – 4,74 мкг/г, міріцитін – 45,43 мкг/г), флаванонів (нарингенін – 12,48 мкг/г), фенольних кислот, флаваноподібних.

6. Встановлено, що 2 % мазь на основі екстракту *Juglans nigra* проявляє вираженні протизапальні властивості за умов трансдермального нанесення.

7. Дослідження анальгетичної активності мазі на основі *Juglans nigra* показало, що дослідний зразок мазі ефективно знижує поріг больової чутливості у піддослідних тварин, як на моделях термічного болю так і на моделі хімічного болю не поступаючись препарату порівняння.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Швиденко А.І., Циганков А.І. Культура чорного горіха: Вид-во: Львів. «Вища школа». 2008. 94 с.
2. Дайронас Ж.В., Пшукова І.В. Вивчення складу ліпофільної фракції листя волоського горіха, що росте в Кавказьких Мінеральних Водах. Хімія рослинної сировини. 2010. № 4. 91-93 с.
3. Фітохімічне дослідження плодів маньчжурського горіха (*Juglans mandshurica* М.) як перспективної сировини для отримання біологічно активних речовин. Хімія рослинної сировини. / Матющенко Н.В., Земляк К.Г., Степанова Т.О., Окара О.І. 2013. № 2. 147-152 с.
4. Cosmulescu S., Trandafir I., Nour V. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves. *Pharm. Biol.*, 2014. Vol. 52. №5. P. 575–580.
5. Еберле Л. В., Коберник А. О., Кравченко І. А. Дослідження умов екстракції імбиру. *Медицина наука та практика: виклики і сьогодення: зб. наук. робіт учасників міжнар. наук.-практ. конф., м. Львів, 24–26 серп. 2017 р. Львів, 2017.. 90–91. с*
6. Huseini H.F., Effects of *Juglans regia* L. leaf extract on hyperglycemia and lipid profiles in type two diabetic patients: a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Ethnopharma col*, 2014. Vol. 152. №3. P. 451–456.
7. Fang F., Qin Y., Qin L. [et al.]. *Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells. Iran J. Basic Med. Sci.* 2015. Vol. 18. № 6. P. 544–548.
8. Лозовицький Д.А. Вивчення ліпофільних речовин трави *Taraxacum officinale wigg.* *Науковий результат. Медицина і фармація.* 2017. Т. 3. № 1. 56-62. с.
9. Державна Фармакопея України: в 3 т. ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 1 вид. Х.: ДП

- «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. Т. 1. 1140 с.
10. Трінеева О.В., Слівкін А.І., Сафонова Е.Ф. Визначення гідроксикоричних кислот, каротиноїдів і хлорофілу в листках кропиви дводомної (*Urtica Dioica* L.) Хімія рослинної сировини. 2015. №3. 105–110. с.
 11. Бадалов П.П. Інтродукція горіхів на Веселобоковенській селекційно-дендрологічній станції. Лісівництво і агролісомеліорація. Київ, 1971. 25 с.
 12. Бондар А.О. Лісові культури горіха чорного. Вінниця: ВАТ «Віноблдрукарня», 1997. 48 с.
 13. Zhou D.J., Mu D., Jiang M.D. [et al.]. Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of α -SMA and collagen III. *Mol. Med. Rep.* 2015. Vol. 12. №3. P. 4095– 4102.
 14. Поляков А.К. Інтродукція деревних рослин в умовах техногенного середовища. Донецьк: Ноулідж, 2009. 268 с.
 15. Щепотьєв Ф. Л., Ріхтер А. А., Павленко Ф. А. і ін. Оріхоплодові лісові та садові культури. 2-е, пероб. і доп. М.: Архівна копія від 1 квітня 2016 на Wayback Machine. 285 с.
 16. Optimization of extraction methods for total polyphenolic compounds obtained from rhizomes of *Zingiber officinale* / L. Eberle, A. Kobernik, O. Alexandrova, I. Kravchenko. *Trends in Phytochemical Research*. 2018. № 2 (1). 37–42. с
 17. Косенко І., Балабак О. Рекомендації зі створення насаджень та вирощування фундука. Орешник. 2018. № 2. С. 38-41.
 18. Державна Фармакопея України: в 3 т. ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Х.: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1130 с.

19. Дайронас Ж.В. Морфолого – анатомічної вивчення плодів горіх волоський (*Juglans regia* L.) і горіхи чорному (*Juglans nigra* L.). Сучасні проблеми науки та освіти. 2015. № 1–2.
20. Щепотьєв Ф.Л., Кеніг А.Е. Вирощування культур горіхів з роду *Juglans* на Україні, лісівництво та агролісомеліорація. Книга, 1971. № 25. 39–46. с.
21. Дайронас Ж.В. Експериментально-теоретичне дослідження лікарської рослинної сировини, що містить нафтохінони, і його стандартизація: дис. докт. фармац. наук. 15.00.02. М. 2017. 388 с.
22. Дайронас Ж.В., Зілфікаров І. Н. Вивчення фенольних сполук листя горіха волоського і горіха чорного методом високоефективної рідинної хроматографії. *Питання біологічної, медичної та фармацевтичної хімії*. 2013. 57–60. с.
23. Масалітіна Н. Ю., Близнюк О. М., Чернявська С. М. Фізико-хімічні основи визначення флавоноїдів в оплодні горіха чорного *Juglans nigra* L. Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження: матеріали 3-ї Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 2 квітня 2021 р.
24. Дайронас Ж.В., Зілфікар І.М. Вивчення фенольних сполук листя горіха волоського та горіха чорного методом високоефективної рідинної хроматографії. *Питання біологічної, медичної та фармацевтичної хімії*. Книга, 2013. № 3. 57-60. с.
25. Su-Jin Kim, Gil-Yong Lee, Ji-Wook Jung. The Ameliorative Effect of Sophoricoside on Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation in Vivo and in Vitro. *Molecules* 2013. P. 6113–6127.
26. Ковтун-Водяницька С. М. Сумарний вміст фенольних сполук у надземній частині інтродуцентів роду *Isodon* (*Schrad. ex Benth.*). *Наук. записки. Біологія та екологія*. 2015. 25–28. С.

27. Hoek A. C., Hermans-Lokkerbol A. C. An improved NMR method for the quantification of alpha-acids in hops and hop products. *Phytochem Anal.* 2011. № 12. 53–57. P.
28. Близнюк О. М. Оптимізація ультразвукового екстрагування в біотехнології фітопрепаратів горіха чорного *Juglans nigra* L. / О. М. Близнюк, Н. Ю. Масалітіна, С. І. Самойленко // Теоретичні та практичні дослідження молодих вчених : зб. тез доп. 14-ї Міжнар. наук.-практ. конф. магістрантів та аспірантів, 1-4 грудня 2020 р. / ред. Є. І. Сокол ; Нац. техн. ун-т "Харків. політехн. ін-т". – Харків : НТУ "ХПІ", 2020. – С. 335.
29. Войцехівська О.В., Ситар Н.Ю., Таран В.А. Фенольні сполуки: різноманіття, біологічна активність, перспективи застосування. *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Серія «Біологія»*, 2015. Вип. 1.. 104–119. с.
30. Іщук Г. П., Шлапак В. П. Горіх чорний (*Juglans nigra* L.) у лісових культурах Моївського лісництва на Вінничині // Науковий вісник НЛТУ України: Збірник науково-технічних праць. – Львів: НЛТУ України. – 2007. – Вип. 17.7 .. 20–26. с. ISSN 1994-7836. (Дата звернення 11.04.2017).
31. Thomas A.L., Reid W. R. Hardiness of black walnut and pecan cultivars in response to an early hard freeze. *Amer. Pomolog.* 2006. Soc. 60 (2). P. 90–94.
32. Лановенко В. Волоський горіх і груша як варіант комбінованого саду. *Горішник. Технології та інновації*. 2020. № 1. С. 22-23.
33. Інтенсивні технології вирощування горіхів: рекомендаційний покажчик літератури / уклад. І. А. Фисенко; за ред. О. Г. Пустова, Д. В. Ткаченко. Миколаїв: МНАУ, 2021.
34. Харкевич Д. А. Фармакологія: 9-е изд. — М.: Изд-во ГЭОТАР-медиа, 2006. — 664 с.
35. Роудс, Енн; Блок, Тімоті (5 вересня 2007 р.). Рослини Пенсільванії (2-ге вид.). Філадельфія, Пенсільванія: видавництво Пенсільванського університету. ISBN 978-0-8122-4003-0.

36. Бурлака А. Проектування горіхових насаджень з міжрядним заповненням плодово-ягідними та овочевими культурами. Орешник. 2016. № 1. 54-55. с.
37. Hu, F.B.; Stampfer, M.J.; Manson, J.E.; Rimm, E.B.; Colditz, G.A.; Rosner, B.A.; Speizer, F.E.; Hennekens, C.H.; Willet, W.C. Frequent Nut Consumption and Risk of Coronary Heart Disease in Women: Prospective Cohort Study. *BMJ* 1998, 317, 1341–1345. 2186 CÂMARA AND SCHLEGEL
38. Mudrak O.V., Mudrak H.V., Polishchuk V.M. (2015). Etalony pryrody Vinnychchynu: Monohrafiya. [Standards of Nature of Vinnytsia: Monograph]. Vinnytsya: TOV «Konsol». [in Ukrainian].
39. Neyko I.S., Monarkh V.V. (2017). Suchasnyy stan ta prychny vsykhannya derev lypy shyrokolystoyi (*Tilia platyphyllos scop.*) po vul. Soborniy m. Vinnytsia. [Current state and causes of drying of broadleaf (*Tilia platyphyllos scop.*) Trees on the street. Cathedral city of Vinnytsia]. *Mizhnarodnyy naukovyy zhurnal Internauka – International Scientific Journal of International Science*. Issue 2. 114-119. [in Ukrainian].
40. Щепотьєв Ф.Л. Павленко Ф.А., Ріхтер О.А. Горіхи. К.: Вид-во Урожай, 1987. 184 с.