Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Нещерет Олена Іванівна

УДК: 582.632.1:581.45

ФАРМАКОГНОСТИЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЛИСТЯ БЕРЕЗИ БОРОДАВЧАСТОЇ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата фармацевтичних наук

Харків 2005

**Дисертацією є рукопис.**

**Робота виконана на кафедрі фармакогнозії Національного фармацевтичного університету (м.Харків), Міністерство охорони здоров’я України.**

|  |  |
| --- | --- |
| Науковий керівник: | **доктор фармацевтичних наук, професор**  КИСЛИЧЕНКО ВІКТОРІЯ СЕРГІЇВНА  **Національний фармацевтичний університет,**  **завідувач кафедри хімії природних сполук** |
| Офіційні опоненти: | **доктор фармацевтичних наук, професор**  СЕРБІН АНАТОЛІЙ ГАВРИЛОВИЧ  **Національний фармацевтичний університет,**  **завідувач кафедри ботаніки** |
|  | **кандидат фармацевтичних наук,**  **старший науковий співробітник**  ДЕРКАЧ АНАТОЛІЙ ІВАНОВИЧ  **Державне підприємство “Державний науковий центр лікарських засобів”, завідувач сектором природних гетероциклічних сполук** |
| Провідна установа: | **Запорізький державний медичний університет,**  **кафедра фармакогнозії** |

**Захист відбудеться “12” травня 2005 р. о 1200 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м.Харків, вул.Пушкінська, 53.**

**З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м.Харків, вул.Блюхера, 4).**

**Автореферат розісланий “\_\_\_\_” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2005 року**

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради**

**доктор біологічних наук, професор Л.М.Малоштан**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

***Актуальність теми.*** В сучасних умовах лікарські рослини набувають все більшої популярності як і препарати на їх основі. Обмежений спектр побічної дії, низька токсичність, висока біодоступність, можливість застосування при хронічних захворюваннях протягом тривалого часу, особливо у дитячій та геронтологічній практиці, є перевагами фітозасобів. Існує певний дефіцит препаратів, які б поєднували антимікробну, протизапальну і гіпоазотемічну дію та застосовувалися б при захворюваннях нирок, тому пошук нових видів рослинної сировини вищезазначеної активності і розробка фітозасобів на їх основі є актуальними.

Перспективною рослиною вітчизняної флори є береза бородавчаста Betula verrucosa Ehrh. родини Betulaceae, бруньки якої застосовуються в науковій медицині. Листя берези бородавчастої здавна використовуються народною медициною як антимікробний, протизапальний, діуретичний, вітамінний засоби. Ця сировина є офіцінальною у багатьох країнах світу і використовується для виробництва таких препаратів, як «Фітолізин», «Гербіон», «Урогран», «Ревмогран», «Етморен» тощо.

***Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.*** Дисертаційна робота «Фармакогностичне вивчення листя берези бородавчастої» виконана у відповідності з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету (№ держреєстрації 0198U007008) проблемної комісії «Фармація» МОЗ України.

***Мета і задачі дослідження.***Метою нашого дослідження є встановлення хімічного складу листя берези бородавчастої, визначення кількісного вмісту ряду груп біологічно активних речовин (БАР), отримання комплексів БАР, встановлення їх біологічної активності, стандартизація сировини і отриманих біологічно активних субстанцій.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. провести попереднє дослідження хімічного складу листя берези бородавчастої за допомогою якісних реакцій та хроматографічного аналізу;
2. виділити сполуки в індивідуальному стані і встановити їх структуру;
3. провести кількісне визначення ряду груп БАР в сировині і отриманих фітозасобах;
4. визначити технологічні параметри листя берези бородавчастої;
5. розробити технологію одержання настойок та густого екстракту; підтвердити перспективність розробки лікарських форм на основі отриманих субстанцій дослідженнями біологічної активності;
6. провести стандартизацію сировини та фітозасобів, розробити на них проекти АНД.

*Об’єктом дослідження* були фенольні сполуки, які зумовлюють фармакологічну активність багатьох лікарських засобів природного походження, та лікарська рослинна сировина, яка накопичує їх, а також отримані фітозасоби.

*Предметом дослідження* стало виявлення, виділення і встановлення структури фенолкарбонових кислот, флавоноїдів, тритерпенових кислот, вітамінів, визначення їх кількісного вмісту в листі берези бородавчастої, розробка оптимальної технології отримання настойок та густого екстракту, визначення числових показників сировини, підтвердження перспективності подальшого вивчення отриманих фітозасобів біологічними дослідженнями.

*Методи дослідження.* Якісний склад і кількісний вміст БАР визначали фармакопейними методами аналізу, а також використовували тонкошарову (ТШХ), паперову (ПХ) та газорідинну (ГРХ) хроматографію. Для виділення суми БАР з рослинної сировини використовували колонкову адсорбційну хроматографію на силікагелі і поліаміді та препаративну хроматографію на папері. Хімічну будову виділених речовин встановлювали методами УФ-, ІЧ-спектрального аналізу і шляхом хімічних перетворень. Тривимірні спектри флюоресценції ліпофільних сполук записували на спектрофлюориметрі Hitachi F4010. Вивчення анатомічної будови та локалізації сполук в листі вивчали на препаратах з поверхні та поперечних зрізах за допомогою мікроскопів МБР-1 та МБІ-6 з подальшим фотографуванням фотоапаратом «ФЕД-5В» на плівці «Мікрат-200» та «Мікрат-300».

***Наукова новизна отриманих результатів.*** Вперше проведено комплексне дослідження якісного складу та кількісного вмісту різних класів БАР в листі берези бородавчастої: амінокислот, фенолкарбонових кислот, флавоноїдів, макро- та мікроелементів, жирних кислот, вітамінів у листі берези бородавчастої. Вперше встановлені діагностичні ознаки анатомічної будови листя берези бородавчастої різних термінів заготівлі; визначені технологічні параметри сировини.

Розроблена оптимальна технологія отримання настойок та густого екстракту з листя берези бородавчастої. Вперше проведено стандартизацію сировини і отриманих з неї фітозасобів.

Новизна розробленого оригінального фітозасобу підтверджена пріоритетним висновком на заявку на корисну модель, надісланої до Державного підприємства «Український інститут промислової власності» (УКРПАТЕНТ) «Засіб з протизапальною та антимікробною дією» № u 2005 00032 від 04.01.2005.

***Практичне значення отриманих результатів.*** Дані досліджень хімічного складу листя берези бородавчастої, анатомічної будови впроваджені в учбовий процес кафедр фармакогнозії та ботаніки Національного фармацевтичного університету, фармацевтичних факультетів Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я.Горбачевського та Запорізького державного медичного університету.

На густий екстракт листя берези бородавчастої розроблений і апробований в умовах ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров’я» технологічний регламент. За результатами досліджень розроблені проекти АНД на листя берези бородавчастої, отримані з нього настойки та густий екстракт.

***Особистий внесок здобувача.*** У наукових працях, опублікованих зі співавторами Кисличенко В.С., Хворост О.П., Картмазовою Л.С., Васильченко Є.О., Ткаченко О.Ю., Ковальовим С.В. особисто автором:

1. проведено аналіз літературних даних про розповсюдження, хімічний склад і використання берези бородавчастої у народній та науковій медицині;
2. досліджено якісний склад листя берези бородавчастої;
3. виділено та ідентифіковано 18 сполук різної хімічної природи;
4. визначено кількісний вміст основних груп БАР в листі берези бородавчастої та отриманих фітозасобах;
5. розроблено і обгрунтовано технологію одержання настойок та густого екстракту з листя берези бородавчастої;
6. визначено числові показники сировини та напрацьованих серій настойок і густого екстракту з листя берези бородавчастої;
7. розроблено проекти АНД на листя берези бородавчастої, настойки та густий екстракт листя берези бородавчастої.

***Апробація результатів дисертації.*** Матеріали дисертаційної роботи доповідались на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Вчені України - вітчизняній фармації» (Харків, 2000), республіканській науковій конференції «Научные направления в создании лекарственных средств в фармацевтическом секторе Украины» (Харків, 2001), Всеукраїнській науково-практичній конференції „Фармація ХХІ століття» (Харків, 2002), ХІ конгресі світової федерації українських лікарняних товариств, присвяченому 25-річчю СФУЛТ (Луганськ, 2002), науково-практичній конференції “Фармація XXІ століття” (Харків, 2002), науково-практичній конференції «Фітотерапія в реабілітації хворих» (Харків, 2003), міжнародній науково-практичній конференції «Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок» (Тернопіль, 2004).

***Публікації.*** За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових виданнях та 5 тез доповідей.

***Обсяг та структура дисертації.*** Дисертація викладена на 155 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, 3 глав власних досліджень, загальних висновків, списку використаних літературних джерел, який містить 164 найменування, у тому числі 39 іноземних авторів, та додатків. Робота ілюстрована 15 рисунками і 23 таблицями.

# ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Проведений аналіз літературних даних свідчить, що різні види сировини рослин роду береза широко використовуються у народній медицині, офіцінальною ж сировиною в Україні є лише бруньки берези. Перспективним видом рослинної сировини є листя берези бородавчастої, які мають широкий спектр біологічної дії, і можуть стати новим джерелом отримання фітозасобів для лікування ниркових захворювань.

# Дослідження хімічного складу листя берези бородавчастої

**з виділенням і встановленням структури біологічно активних сполук**

За допомогою якісних реакцій, хроматографії на папері і в тонкому шарі сорбенту встановлено наявність в листі берези бородавчастої вуглеводів, амінокислот, фенолкарбонових кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, стероїдів, тритерпеноїдів, органічних кислот, хлорофілів і каротиноїдів

Для з’ясування якісного складу ліпофільної фракції був отриманий тривимірний спектр флуоресценції, що наведений на рис.1. Аналіз спектру показав наявність піків в областях λ*ехс* – 270 нм , λ*епі* - 315-330 нм, характерних для випромінення простих фенольних сполук та деяких ліпідів і фосфоліпідів. Серія піків у області збудження флуоресценції λ*еmi* від 300 до 700 нм та випромінення λ*em* - 650-750 нм притаманна для суміші хлорофілів *а* та *b*. Характерно, що вміст ненасичених ліпідів набагато менший за вміст хлорофілів. Однаковий характер розширення піків при збудженні при 400-430 нм и при 650-680 нм свідчить про приблизно рівне співвідношення хлорофілів *a* і *b* в їх суміші.



Рис.1 Тривимірний спектр флюоресценції ліпофільного екстракту

листя берези бородавчастої

Примітка: Emission – довжина хвилі випромінювання, нм;

excitation -довжина хвилі збудження, нм

Для виділення БАР і розділення їх на індивідуальні компоненти використовували методи рідинно-рідинної екстракції, колонкової адсорбційної хроматографії на силікагелі та поліаміді, препаративної хроматографії на папері і в тонкому шарі сорбенту.

В результаті з листя берези бородавчастої виділено в індивідуальному стані 18 сполук: 2 похідних бензойної кислоти – галова та елагова кислоти, 3 похідних коричної кислоти - кофейна, хлорогенова і n-кумарова кислоти, 3 флавонолових аглікони - кемпферол, кверцетин, мірицетин, 4 флавонолових глікозиди - авікулярин, кверцитрин, ізокверцитрин, кверцетин-3-О-β-L-галактопіранозид, 2 похідних катехінової природи - (+)-катехін, (-)-епікатехін, 2 тритерпенові кислоти - урсолову і олеанолову, стероїд β-ситостерин, каротиноїд лютеїн. Їх фізичні та фізико-хімічні властивості наведені в табл.1. З листя берези бородавчастої лютеїн виділено вперше.

Структуру виділених речовин встановлювали за допомогою фізичних, хімічних, фізико-хімічних методів аналізу.

**Похідні бензойної кислоти.** Речовини 1.1-1.2 за допомогою якісних реакцій, даних хроматографічного аналізу, хімічних перетворень віднесені до похідних галової кислоти, що підтверджується даними УФ-спектрів. На підставі фізико-хімічних досліджень ідентифікували речовину 1.1 як галову кислоту, чи 3,4,5-триоксибензойну кислоту, а речовину 1.2 як елагову кислоту, чи дилактон гексаоксидифенової кислоти (табл.1).

**Гідроксикоричні кислоти.** Речовини 1.3-1.5 за даними хроматографічної поведінки, якісними реакціями, даними УФ- та ІЧ-спектрів віднесені до гідроксикоричних кислот.

В продуктах лужної деструкції речовин 1.3 (кофейна кислота) і 1.4 (хлорогенова кислота) знайдено 3,4-дигідроксибензойну (протокатехову) кислоту, речовини 1.5 (n-кумарова кислота) - n-гідроксибензойну кислоту. Порівняння фізико-хімічних властивостей речовини 1.3 і кофейної кислоти вказало на їх ідентичність. Лужний гідроліз речовини 1.4 приводить до утворення еквімолекулярних кількостей кофейної і D-хінної кислот. Місце приєднання кофейної кислоти до D-хінної встановлено лактонізацією речовини 1.4.

На підставі проведених досліджень і результатів порівняння з вірогідними зразками речовини 1.3, 1.4, 1.5 відповідно ідентифіковані з 3,4-дигідроксикоричною (кофейною), 5-О-кофеіл-D-хінною (хлорогеновою), 4-гідроксикоричною (n-кумаровою) кислотами (табл.1).

**Флавоноїди.** Флавоноїдна природа речовин 1.6-1.14 підтверджується якісними реакціями, даними хроматографічного, спектрального аналізу, продуктами гідролізу, фізико-хімічними характеристиками. В ІЧ-спектрах цих сполук присутні смуги поглинання, характерні для флавоноїдів: в області 3400-2900 см-1 (фенольні гідроксили), 1665-1615 см-1 (карбонільна група γ-пірону), 1640-1450 см-1 (валентні коливання ароматичних кілець).

Результати якісних реакцій та УФ-спектроскопії свідчать про належність досліджуваних речовин до похідних флавонолу.

Таблиця 1

# Деякі фізико-хімічні властивості речовин, виділених з листя берези бородавчастої

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Шифр речовини | Речовина, її структурна характеристика | Загальна формула | Т топл. 0С | [б],  град | Rf у системах розчинників\* | |
| Систе  ма | Rf |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Похідні бензойної кислоти | | | | | | |
| **1.1** | **Галова кислота** (3,4,5-тригідробензойна кислота) | C7H6O5 | 254-256 | - | А  В | 0,65  0,44 |
| **1.2** | **Елагова кислота** (дигалактон гексагідроксидифенової кислоти) | C14H6O5 | 360 розл | - | А  В | 0,33  0,02 |
| Похідні коричної кислоти | | | | | | |
| **1.3** | **Кофейна кислота** (3,4-дигідроксикорична кислота) | C9H8O4 | 194-195 | - | А  Б | 0,81  0,32 |
| **1.4** | **Хлорогенова кислота** (5-О-кофеіл-D-хінна кислота) | C16H18O9 | 203-205 | -32  метанол | А  Б | 0,62  0,66 |
| **1.5** | **n-кумарова кислота** (4-оксикорична кислота) | С9 Н6 О3 .  Н2О | 212-214 |  | А  Б | 0,48  0,89 |
| **2-феніл-γ-пірони (флавоноли)** | | | | | | |
| 1.6 | Кемпферол (3,5,7,4’-тетраокси-флавон) | С15 Н10 О6 | 275-277 | - | А  Д | 0,80  0,36 |
| 1.7 | Кверцетин (3,5,7,3’,4’ –пентаоксифлавон) | С15Н10О7 | 310-312 | - | А  Д | 0,71  0,44 |
| **1.8** | **Мірицетин (3,5,7,3’,4’,5’-пентаоксифлавон)** | С15Н10О8 | 344-350 | - | А  Д | 0,65  0,37 |
| **1.9** | **Авікулярин** (кверцетин-3-О-α-L-арабінофуранозид) | С20Н18О11 | 209-211 | -159.0  метанол | А  В | 0,69  0,29 |
| **1.10** | **Кверцитрин** (кверцетин-3-О-α-L-рамнозид) | С21Н20О12 | 184-186 | -183,4  етанол | А  В | 0,63  0,39 |
| **1.11** | **Ізокверцитрин** (кверцетин-3-О-β-D-глюкопіранозид) | С21Н20О12 | 224-231 | -33,0 | А  В | 0,52  0,36 |
| **1.12** | **Гіперозид** (кверцетин-3-О-β-D-галактопіранозид) | С21Н20О12 | 244-246 | -59,9  етанол | А  В | 0,53  0,33 |
| **2-фенілбензопірани (флавани)** | | | | | | |
| **1.13** | **(+)-катехін** (3,5,7,3’,4’-пентагідроксифлаван) | С15Н14О6 | 175-176 | +17,2  етанол | А  В | 0,72  0,50 |
| **1.14** | **(-)-епікатехін** (3,5,7,3’,4’-пентагідроксифлаван) | С14Н15О6 | 243-245 | - 60,8  етанол | А  В | 0,55  0,45 |
| Тритерпеноїди | | | | | | |
| **1.15** | **Урсолова кислота** | С30Н48О3 | 280-283 | +62,5  хлороф. | А  Г | 0,89  0,45 |
| **1.16** | **Олеанолова кислота** | С30Н48О3 | 300-303 | +79,0  хлороф. | А  Г | 0,90  0,44 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Стерини | | | | | | |
| **1.17** | **β-ситостерин** | С29Н50О | 134-136 | +37,5  хлороф. | А  Г | 0,95  0,54 |
| **Каротиноїди** | | | | | | |
| 1.18 | Лютеїн | C40H56O2 | 193-194 | - | Д | 0,75 |

**Примітка**: \* - системи розчинів при паперовій і тонкошаровій хроматографії виділених сполук:

А. н-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:2); Б. 2% розчин оцтової кислоти; В. 5% розчин оцтової кислоти; Г. толуол-етиловий ефір оцтової кислоти-оцтова кислота (12:4:0.5);

Д. хлороформ-етанол (8:2)

За рухомістю на хроматограмах в різних системах розчинників, а також за результатами ціанідинової реакції за Бріантом речовини 1.6-1.8 віднесені до агліконів, 1.9-1.12 - до глікозидів.

Схема хімічних перетворень речовин 1.9-1.12 представлена на рис.2.

Речовини, що досліджувалися, у результаті ферментного і кислотного гідролізу утворювали цукрові компоненти та аглікон, який за фізико-хімічними властивостями ідентичний кверцетину. Тотожність аглікону кверцетину підтверджено його хімічними перетвореннями з подальшою ідентифікацією продуктів повного метилювання та повного ацетилювання, а також за продуктами лужної деструкції, внаслідок якої утворюються флороглюцин та протокатехова кислота.



Рис. 2 Схема хімічних перетворень похідних 2-фенілбензо-γ-пірону на прикладі глікозидів кверцетинового ряду: авікулярину (R=R1), кверцитрину (R=R2), ізокверцитрину (R=R3), гіперозиду (R=R4). R1=α-L-Ara; R2=α-L-Rha; R3=β- L-Glu; R4=β-D-Gal

Таким чином, за даними фізико-хімічних досліджень, УФ та ІЧ-спектроскопії, а також за продуктами лужної деструкції, кислотного гідролізу, ацетилювання, метилювання ідентифіковано: речовину 1.6 як 3,5,7,4’-тетрагідроксифлавон, або кемпферол; речовину 1.7 як 3,5,7,3’,4’ –пентагідроксифлавон (кверцетин); речовину 1.8 як 3,5,7,3’,4’,5’-пентагідроксифлавон (мірицетин); речовину 1.9 як кверцетин-3-О-α-L-арабінофуранозид (авікулярин); речовину 1.10 як кверцетин-3-О-α-L-рамнозид (кверцитрин); речовину 1.11 як кверцетин-3-О-β-D-глюкопіранозид (ізокверцитрин) і речовину 1.12 - як кверцетин-3-О-β-D-галактопіранозид, або гіперозид (табл.1).

**Катехіни.** Речовини 1.13, 1.14 за якісними реакціями, забарвленню плям на хроматограмах після проявлення 1% розчином ваніліну у концентрованій хлористоводневій кислоті і 3% спиртовим розчином n-толуолсульфокислоти та даних УФ-спектрів віднесені до катехінів.

Максимуми поглинання УФ-спектрів речовин 1.13 і 1.14 містяться в діапазоні хвиль 278-280 нм. Невеликий батохромний зсув довгохвильового максимуму в присутності етилату натрію (12-14 нм) свідчить про відсутність в молекулах речовин супряження гідроксилу з карбонільною групою. На відміну від флавонолових агліконів досліджувані речовини оптично активні.

На підставі проведених досліджень та порівняння з достовірними зразками речовина 1.13 ідентифікована як (+)-катехін (D-3,5,7,3′,4′-пентагідроксифлаван), а 1.14 - як (-)-епікатехін (L-3,5,7,3′,4′-пентагідроксифлаван) (табл.1).

**Речовини ліпофільної фракції.** На підставі фізичних, фізико-хімічних властивостей, даних хроматографічного аналізу, ІЧ-спектрів речовини 1.15, 1.16, 1.17, 1.18 були ідентифіковані як урсолова кислота, олеанолова кислота, β-ситостерин та лютеїн відповідно (табл.1).

**Визначення кількісного вмісту різних груп БАР в листі**

**берези бородавчастої і отриманих субстанціях**

Наступним етапом нашої роботи стало визначення кількісного вмісту тих груп біологічно активних речовин, що в значних кількостях містяться в листі берези бородавчастої або відомості про вміст яких чи суперечні, чи відсутні.

Визначено кількісний вміст **16** амінокислот і загального білка у листі берези бородавчастої травневого і серпневого термінів заготівлі. Результати досліджень наведені в таблиці 2. Домінуючими амінокислотами для листя берези бородавчастої травневого збору є глутамінова кислота (1,05%) і гліцин (0,88%), для листя серпневого збору - пролін (1,65%) і глутамінова кислота (1,53%). Кількісний вміст загального білка в листі, зібраному в серпні вище (13,01%), ніж у листі травневого терміну заготівлі (11,52%).

Таблиця 2

Якісний склад і кількісний вміст амінокислот у листі берези бородавчастої

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Амінокислота | Загальна формула | Rf БОВ (4:1:2) | Кількісний вміст амінокислот в перерахунку на суху вагу, %, у листі берези бородавчастої | | Кількісний вміст кожної амінокислоти у 100 г білка в перерахунку на суху вагу, %, у листі берези бородавчастої | |
| травневого терміну заготівлі | серпневого терміну заготівлі | травневого терміну заготівлі | серпнево го терміну заготівлі |
| 1 | Глутамінова кислота | С5Н9О4N | 0,17 | 1,050 | 1,525 | 9,115 | 11,722 |
| 2 | Гліцин | С2Н5О2N | 0,21 | 0,884 | 0,560 | 7,674 | 4,304 |
| 3 | Пролін | С5Н9О2N | 0,24 | 0,606 | 1,651 | 5,260 | 4,043 |
| 4 | Аспарагінова кислота | С4Н7О4N | 0,16 | 0,571 | 0,680 | 4,957 | 5,227 |
| 5 | Серін | С3Н7О3N | 0,15 | 0,501 | 0,574 | 4,348 | 4,412 |
| 6 | Аланін | С3Н7О2N | 0,20 | 0,432 | 0,879 | 3,750 | 6,756 |
| 7 | Лізин | С6Н14О2N2 | 0,05 | 0,404 | 0,566 | 3,507 | 4,350 |
| 8 | Лейцин | С6Н13О2N | 0,64 | 0,387 | 0,976 | 3,359 | 3,359 |
| 9 | Валін | С5Н11О2N | 0,43 | 0,371 | 0,663 | 3,220 | 5,096 |
| 10 | Треонін | С4Н9О3N | 0,18 | 0,300 | 0,570 | 2,604 | 4,381 |
| 11 | Аргинін | С6Н14О2N4 | 0,04 | 0,244 | 0,563 | 2,128 | 4,327 |
| 12 | Ізолейцин | С6Н13О2N | 0,72 | 0,187 | 0,472 | 1,623 | 3,628 |
| 13 | Фенілаланін | С9Н11О2N | 0,32 | 0,158 | 0,547 | 1,372 | 4,204 |
| 14 | Гістидин | С6Н9О2N3 | 0,10 | 0,141 | 0,279 | 1,224 | 2,145 |
| 15 | Метіонін | С5Н11О2NS | 0,39 | 0,097 | 0,266 | 0,842 | 2,045 |
| 16 | Тирозин | С9Н11О3N |  | 0,093 | 0,357 | 0,807 | 2,744 |
| Вміст загального білка, % | | | | 11,52 | 13,01 |  |  |

Методом атомно-абсорбційної спектроскопії визначений якісний склад та кількісний вміст мінеральних сполук у листі та бруньках берези бородавчастої. Встановлена наявність 27 макро- і мікроелементів. В значних кількостях містяться елементи Na, K, Ca, Mg, P.

Проведено вивчення якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот у ліпофільному екстракті листя берези бородавчастої (дані див. табл. 3). Встановлено, що в листі берези бородавчастої містяться 13 жирних кислот, серед яких переважають ненасичені жирні кислоти, а серед них – поліненасичені – лінолева та ліноленова з домінуванням останньої – 53,88 % від суми жирних кислот.

Досліджено кількісний вміст найбільш поширених жиро- і водорозчинних вітамінів: каротиноїдів (22,47мг%), токоферолів (33,64мг%), тіаміну (0,67 мг%), рибофлавіну (1,45 мг%), аскорбінової (0,52 мг%) та нікотинової кислот (0,79 мг%). З вітамінів, що досліджувалися, в листі берези бородавчастої переважають каротиноїди та токофероли.

Таблиця 3

Кількісний вміст жирних кислот в листі берези бородавчастої

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Жирна кислота | Індекс | Вміст, % від суми |
| 1 | Лаурінова | 12:1 | 0,99 |
| 2 | Лаурінолеїнова | 13:0 | 1,93 |
| 3 | Міристинова | 15:0 | 1,48 |
| 4 | Ізопальмітинова | 16:0 | 0,75 |
| 5 | Пальмітинова | 16:1 | 14,09 |
| 6 | Пальмітолеїнова | 17:0 | 2,03 |
| 7 | Маргаринова | 17:1 | 0,62 |
| 8 | Маргаринолеїнова | 17:1 | 0,53 |
| 9 | Стеаринова | 18:0 | 3,1 |
| 10 | Олеїнова | 18:1 | 3,06 |
| 11 | Лінолева | 18:2 | 14,97 |
| 12 | Ліноленова | 18:3 | 53,88 |
| 13 | Бегенова | 22:0 | 1,66 |
| Сума насичених ЖК | | 22,69 | |
| Сума ненасичених ЖК | | 77,31 | |

Визначено кількісний вміст ряду груп фенольних сполук: суми окислювальних фенолів (перманганатометричним методом за ДФ СРСР ХІ видання), суми гідроксикоричних кислот і флавоноїдів (спектрофотометричним методом в перерахунку на хлорогенову кислоту та гіперозид відповідно) та дубильних речовин (комплексонометричним методом в перерахунку на танін) у листі берези бородавчастої та отриманих фітозасобах. Результати наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Кількісний вміст різних груп фенольних сполук в листі берези бородавчастої та отриманих з нього фітозасобах (m=5, %, в розрахунку на абсолютно суху речовину)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Об’єкт, що досліджувався | Вміст різних груп фенольних сполук | | | |
| суми окислювальних фенолів | Гідроксикорич  них кислот | флавоноїдів | дубильних речовин |
| Листя берези бородавчастої | 3,64±0,03 | 2,43±0,01 | 1,04±0,01 | 1,93±0,02 |
| Настойка на 40% спирті (1:5) | 0,97±0,05 | 0,54±0,02 | 0,13±0,01 | 0,76±0,02 |
| Настойка на 40% спирті (1:10) | 0,43±0,04 | 0,59±0,02 | 0,06±0,01 | 0,85±0,13 |
| Настойка на 70% спирті (1:5) | 1,15±0,03 | 0,61±0,03 | 0,19±0,01 | 0,81±0,03 |
| Настойка на 70% спирті (1:10) | 1,25±0,04 | 0,63±0,03 | 0,10±0,02 | 0,88±0,04 |
| Густий екстракт | 12,64±0,04 | 3,89±0,02 | 4,71±0,02 | 4,15±0,03 |

Розробка технології отримання настойок, густого

екстракту з листя берези бородавчастої та стандартизація

рослинної сировини і субстанцій

**Для розробки оптимальної технології отримання настойок та густого екстракту необхідно було провести стандартизацію сировини і визначити її технологічні показники, а також оптимальні параметри екстрагування, очистки та концентрації цих фітозасобів і стандартизувати їх.**

**Нами визначені наступні параметри 5 серій листя берези бородавчастої 2001-2002 рр. заготівлі: макро- та мікроскопічні ознаки; ідентифікація; вміст вологи (не перевищував 9%); вміст загальної золи (не більше 10%); вміст екстрактивних речовин (не менш 20%); вміст суми гідроксикоричних кислот (не менше 2,43%); вміст суми флавоноїдів (не менше 1,04%).**

**Визначено технологічні показники сировини: питома вага, об’ємна маса; насипна маса, пористість, порізність плинність, вільний об’єм шару, коефіцієнт поглинання екстрагенту.**

Розроблена технологія отримання настойок з листя берези бородавчастої та визначені їх числові показники.

Для отримання густого екстракту визначали оптимальні параметри технологічного процесу за допомогою пакету «Statgrafics for Window». Матриця планування експерименту відображена в табл.5. Критеріями оцінки були вихід екстрактивних речовин та вміст суми окислювальних фенолів. Встановлені наступні оптимальні параметри: співвідношення сировина-екстрагент - 1:15, кратність зливів - 3, екстрагент - 70% етиловий спирт, час настоювання – 12 годин.

Вихід густого екстракту листя берези бородавчастої становив 21,5%.

На розроблену технологію оформлений технологічний регламент отримання густого екстракту листя берези бородавчастої. Технологію апробовано в умовах ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров’я».

З метою стандартизації визначений ряд числових параметрів 5 серій густого екстракту листя берези бородавчастої 2001-2002 рр. заготівлі: опис; розчинність; ідентифікація; однорідність; сухий залишок (75-78%); вміст важких металів (не більш 0,006%); мікробіологічна чистота; кількісний вміст діючих речовин – гідроксикоричних кислот (не менш 3,5%) і флавоноїдів (не менше 4,5%).

## Таблиця 5

Матриця планування експерименту по визначенню

оптимальних умов екстракції листя берези бородавчастої

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Назва фактору та його рівень | | | | Вихід, % від абсолютно сухої сировини | |
|  | А - співвідношення сировина – екстрагент | В - час настоювання | С - кратність зливів | D -  екстрагент | екстрактивні речовини | сума окислювальних фенолів |
| 1. | 1:5 | 12 | 1 | вода | 15,40 | 0,02 |
| 2. | 1:15 | 12 | 1 | вода | 34,35 | 0,84 |
| 3. | 1:5 | 48 | 1 | вода | 11,71 | 0,38 |
| 4. | 1:15 | 48 | 1 | вода | 19,96 | 0,65 |
| 5. | 1:5 | 12 | 3 | вода | 24,80 | 0,31 |
| 6. | 1:15 | 12 | 3 | вода | 52,09 | 0,81 |
| 7. | 1:5 | 48 | 3 | вода | 11,56 | 0,33 |
| 8. | 1:15 | 48 | 3 | вода | 12,85 | 0,77 |
| 9. | 1:5 | 12 | 1 | 70% спирт | 13,97 | 1,34 |
| 10. | 1:15 | 12 | 1 | 70% спирт | 20,75 | 2,30 |
| 11. | 1:5 | 48 | 1 | 70% спирт | 17,62 | 1,93 |
| 12. | 1:15 | 48 | 1 | 70% спирт | 18,51 | 2,86 |
| 13. | 1:5 | 12 | 3 | 70% спирт | 11,11 | 0,99 |
| 14. | 1:15 | 12 | 3 | 70% спирт | 19,15 | 2,79 |
| 15. | 1:5 | 48 | 3 | 70% спирт | 14,01 | 2,58 |
| 16. | 1:15 | 48 | 3 | 70% спирт | 11,83 | 3,14 |

**Для підтвердження перспективності подальшого вивчення отриманих фітозасобів з листя берези бородавчастої з метою впровадження їх в практику охорони здоров’я були проведені дослідження їх біологічної активності.**

На базі лабораторії експериментальної фармакології ДП «ДНЦЛЗ» під керівництвом старшого наукового співробітника, к.м.н. Васильченко Є.О. були проведені дослідження біологічної дії in vivo настойок листя берези бородавчастої на 40% та 70% спирті у співвідношенні сировина-екстрагент 1:5 і 1:10, які показали наявність діуретичного та салуретичного ефектів, що за вираженістю дії не поступаються Леспенефрилу, який застосовується при функціональних порушеннях нирок, гострій нирковій недостатності.

Під керівництвом д.ф.н., професора Яковлевої Л.В. на базі ЦНДЛ досліджено, що густий екстракт листя берези бородавчастої, отриманий шляхом мацерації 70% етиловим спиртом, в дозі 7 мг/кг виявляє виражену гіпоазотемічну дію, покращує загальний стан, зменшує набряк нирок при гострій нирковій недостатності, за вираженістю дії не поступається Канефрону.

Крім того, встановлено, що густий екстракт листя берези бородавчастої викликає затримку росту мікроорганізмів: C. diphtheriae, St.aureus, Ps.aeruginosa, E.coli, B.subtillis, C. albicans та виявляє помірну сперміцидну активність.

# ВИСНОВКИ

1. Проведено фармакогностичне дослідження листя берези бородавчастої та показано перспективність створення лікарських форм з отриманням комплексів БАР діуретичної, гіпоазотемічної, антимікробної дії.
2. За допомогою якісних реакцій, хроматографії на папері і в тонкому шарі сорбенту в листі берези бородавчастої встановлено наявність вуглеводів, амінокислот, фенолкарбонових кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, стероїдів, тритерпеноїдів, органічних кислот і хлорофілів.
3. З листя берези бородавчастої виділено в індивідуальному стані 18 сполук. Використовуючи фізико-хімічні, хімічні методи (УФ- та ІЧ-спектроскопію, визначення оптичної активності, кислотний, ферментативний гідроліз та ін.) встановлено структуру цих речовин: похідні бензойної кислоти – 3,4,5-тригідроксибензойна (галова) кислота (речовина 1.1), дилактон гексагідроксидифенової кислоти (елагова кислота) (речовина 1.2); похідні коричної кислоти – 3,4-дигідроксикорична (кофейна) кислота (речовина 1.3), 5-О-кофеіл-D-хінна (хлорогенова) кислота (речовина 1.4), 4-гідроксикорична (n-кумарова) кислота (речовина 1.5); похідні 2-фенілбензо-g-пірону – 3,5,7,4’-тетрагідроксифлавон (кемпферол) (речовина 1.6); 3,5,7,4’-тетрагідроксифлавон (кверцетин) (речовина 1.7); 3,5,7,3,’4’,5’-гексагідроксифлавон (мірицетин (речовина 1.8), кверцетин-3-О-a-L-арабінофуранозид (авікулярин) (речовина 1.9), кверцетин-3-О-a-L-рамнопіранозид (кверцитрин) (речовина 1.10), кверцетин-3-О-b-D-глюкопіранозид (ізокверцитрин) (речовина 1.11), кверцетин-3-О-b-L-галактопіранозид (речовина 1.12); похідні 2-фенілбензопірану: 3,5,7,3’,5’-пентагідроксифлаван ((+)-катехін) (речовина 1.13), 3,5,7,3’,4’-пентагідроксифлаван ((-)-епікатехін) (речовина 1.14), тритерпеноїди – урсолова (речовина 1.15) і олеанолова (речовина 1.16) кислоти; стероїд - b-ситостерин (речовина 1.17); лютеїн (речовина 1.18). Вперше виділено з листя берези бородавчастої лютеїн (речовина 1.18).
4. Вперше визначений кількісний вміст амінокислот, жирних кислот, макро- та мікроелементів, вітамінів в листі берези бородавчастої.
5. В листі берези бородавчастої та отриманих фітозасобах встановлено кількісний вміст ряду груп фенольних сполук: суми окислювальних фенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та дубильних речовин.
6. Визначені технологічні параметри та вперше проведена стандартизація сировини, розроблена технологія отримання настойок і густого екстракту з листя берези бородавчастої, встановлені числові показники отриманих субстанцій.
7. Оформлений технологічний регламент отримання густого екстракту листя берези бородавчастої. Технологію апробовано в умовах «ТОВ Фармацевтична компанія «Здоров’я».
8. Дослідженнями, проведеними у ДП «ДНЦЛЗ» під керівництвом старшого наукового співробітника, к.м.н. Васильченко Є.О; в ЦНДЛ НФаУ під керівництвом д.ф.н., професора Яковлевої Л.В., встановлено, що настойки листя берези бородавчастої виявляють діуретичну, салуретичну активність, густий екстракт має гіпоазотемічну, антимікробну та помірну сперміцидну дію. Ці факти свідчать, що листя берези бородавчастої і отримані фітозасоби є перспективними для подальшого вивчення і створення на їх основі препаратів діуретичної, гіпоазотемічної, антимікробної дії.
9. Вперше розроблені проекти АНД на листя берези бородавчастої, настойки та і густий екстракт з нього.
10. Результати роботи впроваджені в навчальний процес кафедр фармакогнозії та ботаніки Національного фармацевтичного університету, фармацевтичних факультетів Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я.Горбачевського та Запорізького державного медичного університету.

# Список опублікованих робіт за темою дисертації

1. Борисенко О.І., Кисличенко В.С., Ковальов С.В. Кількісне визначення вмісту дубильних речовин і флавоноїдів у листках, бруньках та отриманих з них фітозасобах.//Фізіологічно -активні речовини. – 2000. - №2. – С.96-100. (Особистий внесок – проведені експериментальні дослідження та узагальнені результати. Участь у написанні статті).
2. Кисличенко В.С., Ткаченко О.Ю., Борисенко О.І. Вивчення впливу водних екстрактів та полісахаридних комплексів з кори гілок представників роду Ribes L. на імунологічні показники.//Фарм.журнал. – 2000. - №2. – С.85-86. (Особистий внесок – проведені експериментальні дослідження та узагальнені результати. Участь у написанні статті).
3. Борисенко О.І., Кисличенко В.С., Васильченко Є.О. Береза бородавчаста: фармакотерапевтичні властивості, медичне застосування, власні дослідження впливу настойок на функції нирок. //ФАРМАКОМ. – 2002. - №3. – С.78-84. (Особистий внесок – зареферовані наукові джерела, підготовлені матеріали для написання огляду. Проведені експериментальні дослідження та узагальнені результати. Участь у написанні статті).
4. Анатомічна будова, вивчення амінокислотного та мікроелементного складу листя берези бородавчастої./В.С.Кисличенко, О.І.Борисенко, О.П.Хворост, Л.С.Картмазова //Вісник фармації. – 2002. - №4(32). – С.23-27. (Особистий внесок – участь в проведенні експериментальних досліджень та узагальненні результатів. Участь у написанні статті).
5. Кисличенко В.С., Хворост О.П., Борисенко О.І. Вивчення жирнокислотного та вітамінного складу листя та кори берези бородавчастої і берези пухнастої. / Збірник наук. праць співробітників КМАПО ім.П.Л.Шупика, вип.11, кн.2. – Київ. – 2002. – С.665-670. (Особистий внесок – участь в проведенні експериментальних досліджень та узагальнення результати. Участь у написанні статті).
6. Ковальов С.В., Борисенко О.І., Кисличенко В.С. Листя берези – перспективна лікарська рослинна сировина // Тез.докл. наук.-практ. конф. НФАУ «Вчені України – вітчизняній фармації», 19 жовтня, Харків, 2000. – С.99-100. (Особистий внесок – узагальнення результатів досліджень. Підготовка тез)
7. Борисенко О.І. Листя берези бородавчастої – перспективна рослинна сировина.//Тез.докл. ХІ конгресу світової федерації українських лікарняних товарств, присвяченого 25-річчю СФУЛТ, 19-22 серпня. – Луганськ. - 2002. – С.23.
8. Борисенко О.І., Кисличенко В.С. Розробка та вивчення нової лікарської форми з листя берези бородавчастої.//Тез.докл. наук.-практ. конф. «Фармація ХХІ століття», 24 жовтня. – Харків. – 2002. – с. 87. (Особистий внесок – узагальнення результатів досліджень. Підготовка тез).
9. Зарудко І.М., Борисенко О.І., Хворост О.П. Листя берези бородавчастої – перспективна лікарська сировина.//Тез.докл. наук.-практ. конф. «Фітотерапія в реабілітації хворих», 14 жовтня. – Харків. – 2003. – С.94. (Особистий внесок – узагальнення результатів досліджень. Підготовка тез).
10. Борисенко О.І., Кисличенко В.С., Хворост О.П. Дослідження комплексу ліпофільних сполук листя берези бородавчастої.//Тез.докл. міжнародн. наук.-практич. конф. «Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок», 14-15 вересня. – Тернопіль. – 2004. – С.56. (Особистий внесок – узагальнення результатів досліджень. Підготовка тез).

**Нещерет Олена Іванівна.** «Фармакогностичне вивчення листя берези бородавчастої». – Рукопис. Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата фармацевтичних наук за фахом 15.00.02 – фармацевтична хімія і фармакогнозія. Національний фармацевтичний університет, Харків, 2004.

Вперше проведено фармакогностичне вивчення листя берези бородавчастої. Досліджено якісний склад та кількісний вміст різних груп біологічно активних речовин у сировині та отриманих фітозасобах.

З листя берези бородавчастої виділено і встановлено структуру 18 індивідуальних сполук: 2 похідних бензойної кислоти, 3 похідних коричної кислоти, 7 флавоноїдів, 2 катехіни, 2 тритерпенових кислоти, 1 речовину стероїдної природи, і 1 речовину каротиноїдної природи, а також 16 амінокислот, 13 жирних кислот, 27 макро- та мікроелементів.

Вперше досліджено діуретичну і салуретичну активність настойок листя берези бородавчастої. Встановлено, що густий екстракт виявляє гіпоазотемічну дію, а також антимікробну та помірну сперміцидну активність.

Ключові слова: береза бородавчаста, фармакогностичне вивчення, фенольні сполуки, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, амінокислоти, вітаміни, жирні кислоти, мінеральні речовини, діуретична, салуретична, гіпоазотемічна активність.

**Нещерет Елена Ивановна.** “Фармакогностическое изучение листьев березы бородавчатой.” - Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2005.

Впервые проведено комплексное фитохимическое исследование листьев березы бородавчатой. Установлено наличие различных групп биологически активных веществ (БАВ): углеводов, аминокислот, витаминов, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, дубильных веществ, стероидов, тритерпеноидов, органических кислот, витаминов, макро-и микроэлементов.

Впервые проведено количественное определение содержания аминокислот и общего белка в листьях березы бородавчатой майского и августовского сроков заготовки. В листьях майского сбора преобладают глутаминовая кислота (1,05%) и глицин (0,88%), в листьях августовского сбора - пролин (1,65%) и глутаминовая кислота (1,53%).

Проведено изучение жирнокислотного состава листьев березы бородавчатой. Установлено, що в исследуемом виде сырья преобладают ненасыщенные жирные кислоты, среди них: линолевая (14,97 мг% от суммы) и линоленовая (53,88 мг% от суммы). Установлено количественное содержание основных жиро- и водорастворимых витаминов: провитамина А, токоферолов, тиамина, рибофлавина, аскорбиновой и никотиновой кислот.

Впервые проведено количественное определение содержания суммы окисляемых фенолов, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, дубильных веществ в листьях березы бородавчатой и полученных из них фитосредствах: настойках на 40% и 70% спирте (в соотношении сырье-экстрагент 1:5 и 1:10) и густом экстракте из листьев березы бородавчатой.

Из листьев березы бородавчатой выделено и установлено структуру 18 веществ: 2 производных бензойной кислоты, 3 производных коричной кислоты, 7 флавоноидов, 2 катехина, 2 тритерпеновых кислоты, 1 вещество стероидной природы и 1 вещество каротиноидной природы, а также 16 аминокислот, 13 жирных кислот, 27 макро- и микроелементов. Впервые выделен из листьев березы бородавчатой лютеин.

Впервые в Украине проведена стандартизация листьев березы бородавчатой. Впервые разработаны технологии получения настоек и густого экстракта из листьев березы бородавчатой. Осуществлена стандартизация полученных фитокомплексов.

Оформлен технологический регламент получения густого экстракта из листьев березы бородавчатой. Технология апробирована у условиях ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье».

Фармакологичекие исследования, проведенные на базе лаборатории экспериментальной фармакологии ГП «ГНЦЛС» под руководством старшего научного сотрудника, к.мед.н. Васильченко Е.А. показали, что настойки листьев березы бородавчатой проявляют диуретическую и салуретическую активность.

Исследованиями, проведенными под руководством д.фарм.н., профессора Яковлевой Л.В. на базе ЦНИЛ НФаУ, установлено, что густой экстракт листьев березы бородавчатой обладает гипоазотемическим действием, а также проявляет антимикробную и умеренную спермицидную активность.

Разработаны проекты АНД на листья березы бородавчатой, настойки и густой экстракт из этого вида сырья.

Результаты работы внедрены в учебный процесс Национального фармацевтического университета, Тернопольского государственного медицинского университета им. И.Я.Горбачевского и Запорожского государственного медицинского университета.

**Neshcheret Elena Ivanovna.** “Pharmacognostic study of Betula verrucosa leaves”. Manuscript. Thesis for the candidate of pharmaceutical science Degree in speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. National University of Pharmacy, Kharkov, 2005.

For the first time the pharmacognostic study of Betula verrucosa leaves has been carried out. The presence, qualitative and quantitative determinations of different groups of compounds have been determined.

2- individual compounds (2 benzoic asids, 3 oxycinnamine acids, 7 flavonoids, 2 katehins, 2 triterpenoid acids, 1 compound of steroid nature, 2 porfirine derivatives and a 1 compound of carotinoid nature, 16 aminoacids, 13 fat acids, 27 macro- and microelements have been isolated.

This is the first study in tee course of which diuretic saluretic activity of Betula verrucosa leaves has been determined; the extract has gipoazotemic action, and also spermicide activity, antimicrobial activity.

Keywords: Betula verrucosa leaves, pharmacognostic study, phenolic compounds, flavonoids, aminoacids, vitamins, fat acids, mineral compounds, diuretic, saluretic, gipoazotemic activity.

Підписано до друку 05.04.2005. Формат 60х84 1/16

Папір офсетний. Друк різографія.

Умовних друк. арк. 1,19. Тираж 100 пр. Зам. №123.

Надруковано ПП „Азамаєв В.Р.”

Україна, 61144, м. Харків, вул. Героїв Праці, б. 17, кв. 284

Тел. 65-92-41

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>