

На правах рукописи



Дудников Михаил Эдуардович

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПО БЕЗОТХОДНОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
ОКОЛОПЛОДНИКА
ОРЕХА ЧЕРНОГО (*Juglans nigra L.*)**

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2006

Работа выполнена в Пятигорской государственной фармацевтической академии и Ставропольском государственном университете

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Мелик-Гусейнов Валерий Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Дударь Юрий Александрович

доктор химических наук, профессор
Брыкалов Анатолий Валерьевич

Ведущая организация: Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии
им. К.И.Скрябина

Защита состоится «26» декабря 2006 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.04. при Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1, корп. 2, ауд. 506

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1.

Автореферат разослан «11» ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Джандарова Т.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время, как в России, так и за рубежом, наблюдается устойчивая тенденция к повышению интереса населения и фирм производителей к парафармацевтическим и гомеопатическим средствам из растительного сырья. Несмотря на особую социальную значимость увеличения производства этих средств, уровень их выпуска в России обеспечивает удовлетворение потребности населения всего лишь на 30-35%. Одной из причин такого положения является сокращение промышленного воздействия лекарственных растений и ограничение возможности заготовки их дикорастущих видов.

Одним из путей решения проблемы расширения ассортимента отечественных гомеопатических и парафармацевтических средств является освоение промышленной переработки растений, зарекомендовавших себя как эффективно используемые в традиционной медицине и одновременно имеющих достаточную сырьевую базу (Яковлев, 1995; Арзамасцев, 1997).

Таким объектом является орех черный *Juglans nigra* L. семейства *Juglandaceae* L. Растение завезено на Северный Кавказ в XIX веке как интродукт (Мисник, 1963; Дюваль-Строев, 1963; Кулыхин, 1998). Лист и околоплодник ореха черного в Северной Америке издавна использовались в качестве общеукрепляющего, иммуномодулирующего, противопаразитарного средства. На Российском рынке в последнее время появились биологически активные добавки к пище на основе чёрного ореха, производителями которых, в основном, являются иностранные фирмы.

Ранее исследование биологически активных веществ (БАВ) листа ореха черного выполнено Шинкаренко А.А., Дороднева В.И. (1959). Ими была выделена полифенольная фракция и проведен фармакологический скрининг. Однако отечественных парафармацевтических и гомеопатических средств на основе ореха черного до сих пор предложено не было.

В литературе сведения о ресурсах этого несомненно интересного растительного объекта и о возможностях его использования в медицинской практике и косметологии ограничены (Алентьев, 1988, 1998; Поповичев, 1998).

Изучение сырьевой базы ореха черного региона Северного Кавказа, выявление оптимальных условий его заготовки, проведение подробных биотехнологических исследований этого растения будут способствовать расширению диапазона использования флоры Северного Кавказа и пополнению ассортимента парафармацевтических и косметических средств полученных из фитосырья.

Поэтому биотехнологические исследования ореха черного, его малотоксичная комплексная переработка-вопрос важный и современный.

Цели работы – проведение биотехнологических исследований по безотходному использованию околоплодника ореха чёрного и создание технологической схемы переработки околоплодника ореха черного с использованием селективных экстракционных схем.

Задачи исследования:

- изучить с помощью химических и биотехнологических методов основные группы действующих веществ околоплодника ореха чёрного;
- оптимизировать способы стандартизации сырья с помощью физико-химических методов анализа;
- разработать комплексную биотехнологическую схему переработки свежего околоплодника ореха чёрного с учетом характеристик сырья;
- изучить влияние двух независимых биотехнологических процессов – сушки и замораживания на выход основных БАВ ореха черного;
- получить матричную гомеопатическую настойку ореха чёрного и разработать для нее нормы качества;
- получить масляный экстракт околоплодника ореха черного и предложить для него нормы качества;
- провести биологическое исследование матричной настойки и масляного экстракта;
- разработать нормативную документацию на матричную настойку ореха черного и его масляный экстракт.

Научная новизна. Проведены фитохимические исследования околоплодника ореха чёрного. Установлен его элементный состав и подтверждено высокое содержание дубильных веществ, аскорбиновой кислоты, органических кислот и флавоноидов. Показано, что орех черный содержит значительное количество гидрофобных компонентов – хлорофилла и каротиноидов. Впервые путем сравнительного биологического тестирования спиртоводных извлечений из свежих и высушенных околоплодников ореха чёрного доказана более высокая эффективность извлечений из свежесобранныго сырья.

Разработана оригинальная комплексная биотехнологическая схема переработки свежих околоплодников ореха черного с использованием двухфазного процесса экстракции. При этом получены два целевых продукта – матричная настойка и масляный экстракт. Установлены нормы оценки их качества.

Экспериментально доказано что, разработанные парофармацевтические и гомеопатические средства обладают выраженной биологической активностью; матричная настойка ореха черного достоверно снижает содержание сахара в крови при использовании модели аллоксанового диабета, а масляный экстракт при наружном применении обладает репаративным действием, оба средства не токсичны.

Теоретическая и практическая значимость. Полученный экспериментальный материал послужил теоретическим основанием для разработки комплексной биотехнологической схемы переработки свежего околоплодника ореха чёрного. С помощью разработанных технологических процессов путём последовательной экстракции действующих БАВ получены следующие продукты: матричная гомеопатическая настойка и масляный экстракт. Определены нормы стандартизации их качества, которые включены в разработанную нормативную документацию (НД). Разработаны ТУ и ТИ на настойку и масляный экстракт. Определена область применения полученных продуктов в качестве гомеопатических средств и средств дерматокосметики.

Основные положения, выносимые на защиту:

- разработка технологических процессов экстракции свежих околоплодников ореха чёрного позволяет получить парафармацевтические и гомеопатические средства с заданными фармакотерапевтическими свойствами;
- фитохимические исследования околоплодника ореха чёрного доказывают целесообразность его заготовки в регионах Северного Кавказа (Ставропольский край, Краснодарский край, Ростовская область) в августе;
- Экстракция липофильных веществ околоплодника в двухфазной системе растворителей: спирт - растительное масло дает максимальный выход готовых продуктов;

Апробация работы и публикация результатов исследований. Основные положения диссертационной работы доложены на: 57-ой, 58-ой, 59-ой региональных конференциях по фармации, фармакологии и подготовке кадров (г. Пятигорск, 2002, 2003, 2004 г.), на 61-ой научной конференции «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (г. Волгоград, 2003 г.) и на региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых Краснодарского края «Медицинская наука и здравоохранение» (г. Анапа, 2004, 2005, 2006 г.).

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в которых отражено основное содержание диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 17 рисунков и 29 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследований, трех глав собственных исследований, выводов, списка литературы, который включает 127 отечественных и 23 зарубежных источника, и приложения.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований являлся околоплодник ореха черного, произрастающего на территории Ставропольского и Краснодарского краев, Ростовской области, а также полученные из него экстракты.

В диссертационной работе использовались стандартные общепринятые методы исследований (Георгиевский, 1976; Гриневич, 1983; Беликов, 2005. Обработка экспериментальных данных (Беленький, 1963), построение графиков проводилась с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel.

Схема проведения исследований приведена на рисунке 1.

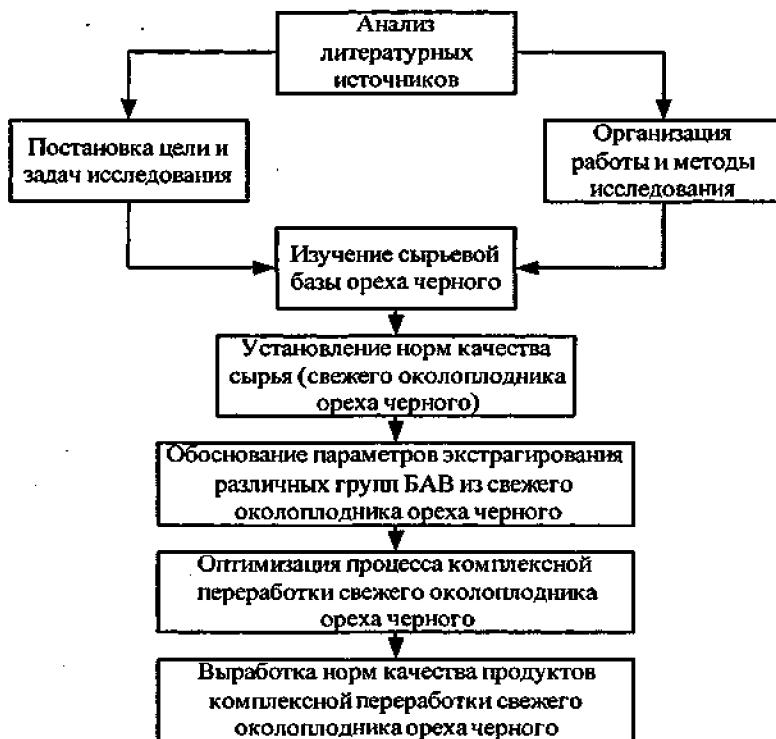


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Фитохимические и технологические исследования околоплодника ореха черного

Установлено, что культуры ореха черного, созданные посевом в изучаемой местности, достаточно многочисленны и имеют надежную сырьевую базу для производства. В ходе исследований определены товароведческие

показатели сырья, собранного в различных районах произрастания, в разные годы, и в разное время сбора. Плоды собирались с деревьев 30-40-летнего возраста произрастания в Ростовской области, Ставропольском и Краснодарском краях в июне, июле, августе и сентябре 2002-2005 гг. Как следует из полученных данных, основные числовые показатели, зеленого околоплодника черного ореха имеют незначительный разброс в зависимости от места произрастания.

Минеральный состав околоплодника ореха чёрного включает Ba, B, Bi, Ga, Y, Yb, Co, Mn, Cu, Mo, Ni, Sn, Pb, Sr, Sc, Tl, Ti, P, Cr, Zn, Zr. В целом содержание отдельных элементов не превышает средние значения распространенности этих химических элементов в земной коре (Beraldo, 1985) и фитосырье (Ноздрюхина, 1980; Медико-биологические..., 1990; СанПиН 2.3.2.1293-03). Количество токсических элементов в золе околоплодника, оказалось не выше допустимых норм. А присутствие таких элементов как марганец, медь, фосфор, хром, цинк, бор позволяет спрогнозировать терапевтическую значимость околоплодника черного ореха.

Результаты анализа качественного состава БАВ приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты анализа качественного химического состава околоплодника ореха черного

БАВ	Реактивы, используемые для идентификации	Извлечение из околоплодника ореха чёрного	
		Спиртовые	Петролейный эфир
Дубильные вещества	Раствор хлорида железа (III) 1%	Зеленое, переходящее в черное окрашивание	–
	Раствор ванилина в конц. серной кислоте 1%	Малиновое окрашивание	Слабое окрашивание
Флавоноиды	Циннадиновая проба	Оранжево-красное окрашивание	–
	Натрия гидроксида 10%	Желтое окрашивание	–
	Алюминия хлорид	Желтое окрашивание	–
Аскорбиновая кислота	Раствор 2,6-дихлорфенолидениндофенолята натрия	Розовое окрашивание раствора	–
Органические кислоты	Раствор ацетата свинца 2% в уксусной кислоте	Белый осадок	–
Каротиноиды	Раствор фосфорномолибденовой кислоты	Синее окрашивание	Синее окрашивание
Хлорофилл гидрохиноны	УФ-свет при 320 нм	Красное свечение	Красное Свечение

Как следует из представленных данных, химический состав околоплодника ореха черного довольно разнообразен и богат как гидрофильными, так и гидрофобными соединениями. Для подтверждения качественного химического состава полученных спиртовых и эфирных извлечений нами были изучены их УФ спектры.

На рисунке 2 представлена спектральная кривая поглощения спиртового извлечения околоплодника ореха черного в диапазоне длин волн 240-400 нм с двумя максимумами поглощения, характерных для полифенольных соединений.

На рисунке 3 приведена спектральная кривая поглощения пигментного состава липидной фракции околоплодника ореха черного.

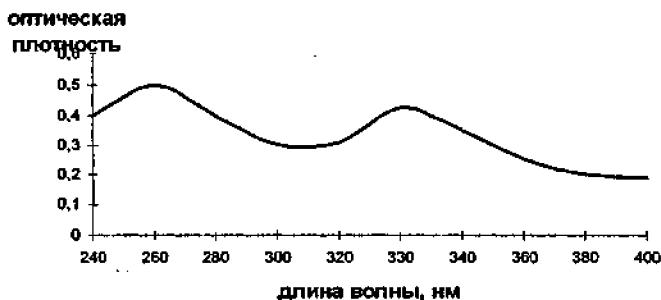


Рисунок 2 – Спектральная кривая поглощения спиртового извлечения из околоплодника ореха черного

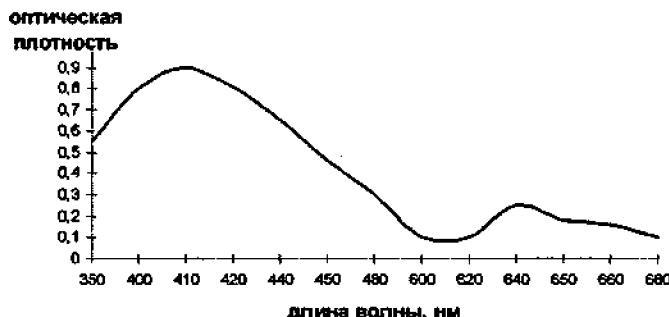


Рисунок 3 – Спектральная кривая поглощения петролейного извлечения из околоплодника ореха черного

На профиле спектра отмечено 2 максимума, характерных для каротиноидов ($\lambda = 410$ нм), и хлорофилла ($\lambda = 668$ нм).

Следующим этапом наших исследований явилось установление оптимального срока заготовки околоплодника. Для этого был проведен сравнительный анализ 12 образцов сырья, собранных в разные сроки созревания плодов ореха черного. Динамика накопления основных групп БАВ ореха черного приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследования химического состава околоплодника ореха черного в зависимости от сроков сбора (в пересчете на сухое вещество, %)

Показатели	Содержание, %			
	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
Сухой остаток, %	17,7±0,6	23,7±1,1	32,6±1,6	49,7±2,1
Дубильные вещества, %	3,2±0,12	8,6±0,31	14,1±0,44	8,3±0,21
Кислота аскорбиновая, мг%	701±8,2	402±8,20	440±6,3	130,2±2,6
Кислоты органические, %	10,2±0,61	9,3±0,40	9,7±0,55	5,3±0,37
Флавоноиды, %	0,012±0,0005	0,023±0,0001	0,044±0,002	0,015±0,0007
Общие липиды, %	1,01±0,05	1,24±0,06	1,8±0,09	1,6±0,08
Каротиноиды, мг%	2,28±0,045	10,41±0,21	31,73±0,63	22,61±0,45
Хлорофиллы, мг%	15,67±0,91	13,62±0,27	5,28±0,12	3,26±0,06

Как следует из данных, представленных в таблице, в околоплоднике ореха черного по мере созревания накапливаются как липофильные, так и гидрофильные БАВ. Максимальное количество основных природных соединений в околоплоднике ореха черного наблюдается в июле-августе, а в середине сентября содержание многих веществ резко падает, что свидетельствует об активно проходящих биохимических процессах старения. Исходя из этого, нами установлен оптимальный срок сбора для околоплодника ореха черного – август. Установлено накопление дубильных веществ в гидрофильной и каротиноидов в липофильной фракциях сырья; в дальнейших исследованиях мы ориентировались на эти группы БАВ.

Для изучения биологической активности экстракта околоплодника ореха черного в качестве биологической модели использовали культуру *Ragwiesia caudatum*, выделенную из естественных мест обитания, из которой получены отдельные клонны (из одной особи бесполым путем). Результаты исследований приведены в таблице 3.

Как следует из результатов, представленных в таблице 3, извлечения из околоплодника ореха черного, как из свежего, так и из высушенного, стимулируют размножение парамеций, переводя их из стационарной в лаг-фазу. При этом установлено, что наиболее выраженное стимулирующее влияние на размножение клеток инфузорий оказывает фитокомпозиция из

свежего окологлодника, которая стимулировала размножение в концентрации, начиная с 10^{-3} . Данное стимулирующее действие наиболее выражено проявляется с увеличением разведения до 10^{-3} - 10^{-6} . Фитокомпозиция, выделенная из сухого сырья, заметно стимулировала размножение только в разведении 10^{-4} . Таким образом, извлечение из свежего окологлодника проявляет активность, которая подчиняется принципу гомеопатического разведения. Как следует из полученных в дальнейшем данных, повышение толерантности клеточной культуры к неблагоприятному воздействию раствора перекиси водорода достоверно значимо оказывают оба извлечения из окологлодника. Однако протективная активность фитокомплекса свежего окологлодника ореха черного в среднем на 50% выше, чем сухого. Таким образом, в хроническом опыте антиоксидантная активность экстракта, полученного из свежего окологлодника выше, чем у такого из сухого. Это позволяет сделать вывод о том, что в процессе сушки ряд веществ, определяющих антиоксидантное действие окологлодника ореха черного, подвергаются деструкции.

Таблица 3 – Результаты сравнительной оценки стимулирующего действия извлечений из окологлодника ореха черного свежего и высушенного на размножение инфузорий

Разведение	Количество особей парамеций в поле зрения			
	Опыт острый		Опыт хронический	
	Высушенное	Свежее	Высушенное	Свежее
10^{-2}	3-5 шт.	3-5 шт.	3-5 шт.	5-8 шт.
10^{-3}	Так же	Так же	3-5 шт.	20-25 шт.
10^{-4}	«-«	«-«	20-25 шт.	5-15 шт.
10^{-5}	«-«	«-«	10-15 шт.	30 шт.
10^{-6}	«-«	«-«	3-5 шт.	50-70 шт.

С целью разработки технологической схемы комплексной переработки окологлодника ореха черного нами были изучены сроки и условия хранения свежего сырья. Установлено уменьшение концентрации дубильных веществ и аскорбиновой кислоты в процессе хранения окологлодника ореха черного; особенно быстрые изменения происходят при температуре выше +20°C. При хранении в темном месте внешних изменений в плодах ореха и падения концентрации действующих веществ не наблюдалось в течение 1 месяца; при замораживании плодов – 3 месяцев. Таким образом, наиболее оптимальным является хранение плодов ореха черного до переработки в опилках в темном и прохладном месте в течение не более 1 месяца, в замороженном состоянии допустимо хранить более 3-х месяцев.

Тем самым, доказана целесообразность проведения технологического процесса переработки сырья в сезон сбора окологлодника ореха черного.

2. Разработка комплексной биотехнологической схемы производства гомеопатических и парофармацевтических средств на основе околоплодника ореха черного

В результате проведенных исследований, нами предложена биотехнологическая схема последовательной экстракции из свежего околоплодника ореха черного (I этап – спирт этиловый, 70%, II этап – двухфазная система экстрагентов: спирт этиловый 90% – масло растительное в соотношении 1:2).

Биотехнологическая схема комплексной переработки околоплодника ореха черного представлена на рисунке 4. Целевые продукты приведенной схемы – гомеопатическая настойка ореха черного (матричная) и масляный экстракт.

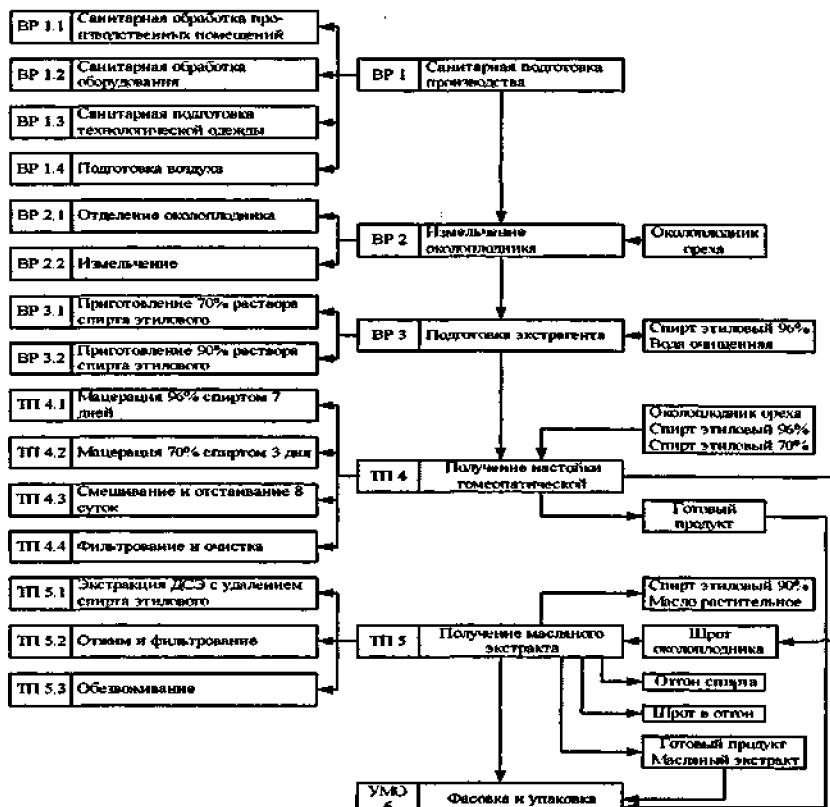


Рисунок 4 – Биотехнологическая схема комплексной экстракции околоплодника ореха черного

Результаты качественного и количественного состава БАВ гомеопатической настойки представлены в таблице 4. Из полученных данных следует, что все проанализированные серии настойки ореха черного по основным показателям соответствуют требованиям НД.

Таблица 4 – Результаты анализа пяти серий настойки ореха черного

Показатель качества	Норматив по ГФ XI и проекту НД	Серии				
		1	2	3	4	5
Описание	Жидкость темно-бурого цвета со слабым специфическим запахом	Соответствует				
Подлинность:						
- дубильные вещества	Образование осадка (мути) с 1% раствором желатина; к 1 мл препарата добавляют 3-5 капель раствора железоаммониевых квасцов, появляется черно-зеленое окрашивание.	Положительная				
- флавоноиды	Оранжево-красное окрашивание в результате цианидовой реакции; максимум поглощения комплекса спиртового раствора с AlCl_3 при длине волны $398 \pm 2 \text{ нм}$	Положительная				
Содержание этилового спирта, % об., не менее	65,0	67,7	66,8	65,1	66,3	69,2
Сухой остаток (экстрактивные вещества), %, не менее	1,5	1,72	1,84	1,78	1,91	1,69
Содержание действующих веществ, %						
- дубильных веществ	Не менее 1,2	2,02	1,99	1,94	1,96	2,04
- флавонOIDов	Не менее 0,01	0,019	0,018	0,015	0,017	0,021
Плотность	От 0,970 до 0,995 г/ см ³	0,988	0,984	0,974	0,979	0,991
Микро-биологическая чистота	В 1 мл препарата должно быть не более 10^4 аэробных бактерий; 10^2 общее число грибов; 10^2 интербактерий и других грамотрицательных бактерий; отсутствие в 1 мл – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Соответствуют				

В процессе хранения выявлено, что основные показатели качества настойки стабильны в течение 2,5 лет. Следовательно, установлен срок хранения – 24 месяца.

Стандартизацию масляного экстракта орехоплодника ореха черного проводили по следующим показателям: описание, подлинность, числовые показатели, количественное содержание хлорофилла и каротиноидов. Проведенные исследования позволили регламентировать качество масла орехоплодника ореха черного по комплексу основных параметров. Все исследования проведены для образцов масляного экстракта, заложенных на хранение при граничных значениях нормальной температуры помещения (при температуре +15°C и при температуре +25°C).

Установлено, что накопление в масляном экстракте перекисных соединений зависит от условий хранения, в частности от температуры. При хранении экстракта при пониженной комнатной температуре (+15°C) изменений в показателях кислотного и перекисного числа не наблюдали в течение 2,5 лет.

3. Фармакологическое изучение разработанных гомеопатических и парафармацевтических средств

С помощью биохимических исследований крови у лабораторных животных определяли токсичность полученной гомеопатической настойки (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты клинического анализа крови ($M \pm m$, $n = 12$)

Показатели	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа
Эритроциты. 10^{12} г/л	$4,2 \pm 0,03$	$4,7 \pm 0,13$	$4,6 \pm 0,1$	$4,54 \pm 0,05$	$4,6 \pm 0,13$
Ретикулоциты. %	$2,15 \pm 0,12$	$2,16 \pm 0,19$	$2,14 \pm 0,1$	$2,15 \pm 0,1$	$2,15 \pm 0,2$
Гемоглобин. г/л	$144,1 \pm 2,1$	$139,8 \pm 7,1$	$144,7 \pm 3$	$144,5 \pm 4,4$	$147,4 \pm 7,6$
СОЭ, мм/ч	$2,3 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,4$
Гематокрит	$0,45 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02$
Оsmотическая резистентность, % NaCl	$0,37 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,03$
Лейкоциты, 10^9 /л	$4,9 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,04$	$4,8 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,09$
Эозинофилы, %	$1,0 \pm 0,18$	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,18$	$0,8 \pm 0,18$	$1,5 \pm 0,18$
Базофилы, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	$5,9 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,4$
Нейтрофилы сегментоядерные, %	$32,6 \pm 0,9$	$34,8 \pm 1,8$	$33,3 \pm 1,8$	$32,6 \pm 0,9$	$34,8 \pm 1,08$
Лимфоциты, %	$53,5 \pm 1,8$	$56,1 \pm 0,8$	$58,6 \pm 2,5$	$52,1 \pm 1,8$	$54,5 \pm 1,2$
Моноциты, %	$4,3 \pm 0,42$	$4,4 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,03$	$4,3 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,2$
Тромбоциты. 10^9 /л	$528,5 \pm 21$	$520,1 \pm 11$	$517,0 \pm 7,3$	$522,0 \pm 16$	$521,0 \pm 18$

Примечание: для всех показателей $p < 0,05$.

Гематологические исследования показали отсутствие достоверных отличий по результатам клинического анализа крови у животных, принимавших воду очищенную, спирт этиловый 10% и матричную настойку окологрудника ореха черного в объеме 2,5 и 5 мл/кг в течение 28 дней, что свидетельствует об отсутствии токсичности разработанной матричной настойки.

Исследование гипогликемической активности матричной настойки показало, что содержание глюкозы в плазме крови у животных с аллоксановым диабетом под влиянием разработанной настойки из окологрудника ореха черного достоверно снижалось до 45% относительно контрольной группы.

При изучении ранозаживляющей активности наружных лекарственных форм на модели термического повреждения кожи у белых крыс, динамику заживления ожогового повреждения оценивали по изменению площади раны весовым методом. Результаты ожогового повреждения оценивались на 2-е и 8-е сутки. Результаты эксперимента отображены на рис. 5.

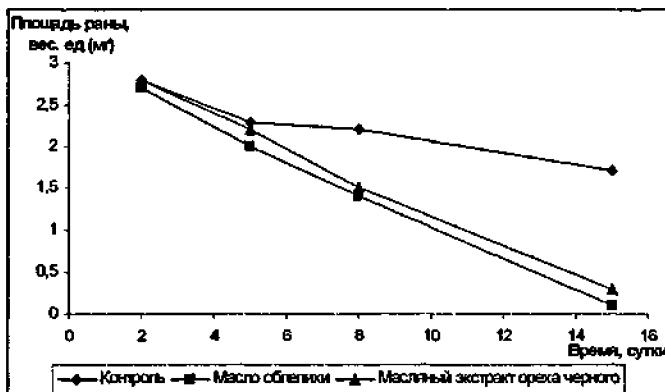


Рисунок 5 – Влияние масла ореха черного на процесс заживления ожоговой раны

Под влиянием масляного экстракта ореха черного наблюдали равномерное образование мягкой корочки. Нагноения ран у опытных животных отмечено не было. Визуально животные опытных и контрольных групп не отличались ни по поведению, ни по потреблению корма и воды. Различие во внешнем виде животных различались от контрольной группы, которым ежедневно наносили физиологический раствор на поврежденную поверхность. Площадь ожогового повреждения достоверно уменьшилась по сравнению с контролем, но несколько была выше, чем у масла облепихи.

Контролировали течение воспалительного процесса с помощью скорости оседания эритроцитов. Под влиянием масла ореха черного скорость оседания эритроцитов достоверно уменьшалась относительно физиологического раствора и масла облепихи к 15 суткам. Таким образом, противоожоговая активность у масла ореха черного сравнима с активностью масла облепихи.

ВЫВОДЫ

1. Проведены фитохимические исследования околоплодника ореха черного и установлен его элементный состав. Обнаружены марганец, медь, фосфор, хром, цинк, бор, молибден. Количественное содержание токсических элементов, оказалось не выше допустимых норм. Идентифицированы основные биологически активные вещества и установлено их количественное содержание: дубильных веществ – 14,1%, аскорбиновой кислоты – 0,44%, органических кислот – до 9%, суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин - 0,04%, а также липидов общих – 1,8%, каротиноидов – 32 мг%, хлорофилла – до 6,1 мг%.

2. Установлено, что максимальное количество биологически активных веществ в околоплоднике накапливается в августе. Определены сроки хранения и условия хранения свежего сырья до переработки: при температуре 15°C в темном месте до 30 дней, в замороженном состоянии при -8°C до 3-х месяцев.

3. Проведен и теоретически обоснован выбор способа экстракции из свежего околоплодника ореха черного на основании базовых технологических характеристик сырья: двухфазная экстракция. Разработана комплексная технологическая схема, позволяющая из свежего околоплодника ореха черного последовательной экстракцией получить матричную гомеопатическую настойку (70%) и масляный экстракт.

4. Разработана технология производства масляного экстракта из шрота околоплодника, остающегося после получения настойки. Предложена экстракция липофильных веществ двухфазной системой экстрагентов: смесью спирта 90% и масла растительного в соотношении 1:2 с последующим удалением спирта этилового при нагревании.

5. Установлены нормы и критерии качества и проведена стандартизация настойки гомеопатической околоплодника ореха черного по следующим показателям: описание, подлинность, сухой остаток, содержание спирта этилового, микробиологическая чистота, количественное содержание дубильных веществ и флавоноидов. Определен срок годности настойки – 2 года.

6. Установлены нормы и критерии качества, проведена стандартизация масляного экстракта околоплодника ореха черного по следующим параметрам: описание, подлинность, числовые показатели, содержание каротиноидов

и хлорофиллов. Установлены условия хранения и срок годности масляного экстракта околоплодника черного ореха, который составил 24 месяца.

7. Проведены фармакологические исследования настойки ореха черного: изучена острые и субхроническая токсичность. Доказано, что настойка околоплодника ореха черного является нетоксичным препаратом (LD_{50}) и обладает гипогликемическим действием.

8. Исследовано противоожоговое и ранозаживляющее действие масляного экстракта ореха черного, и установлено, что репаративная активность масла ореха черного в среднем на 30 – 35 % выше по сравнению с контролем, и не значительно уступает маслу облепихи.

9. По результатам проведенных исследований составлена и утверждена нормативная документация ТУ и ТИ на сырье, матричную настойку и масляный экстракт околоплодника ореха черного.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Дудников М.Э., Арчинова Т.Ю., Андреева И.Н. Экспериментальное обоснование способа получения настойки ореха черного // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2002. – С. 45-46.

2. Дудников М.Э. Технологические аспекты и изучение эффективности суппозиториев с экстрактом черного ореха в комплексном бальнеолечении // Мат. 61-й итог. науч. конф. студентов и молодых ученых ВолГМУ 21-25 апр. 2003 г. – Волгоград, 2003. – С. 171.

3. Дудников М.Э., Арчинова Т.Ю., Андреева И.Н. Сравнительные исследования суммарных фитопрепаратов, полученных из околоплодников некоторых разновидностей орехов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2003. – С. 203-204.

4. Дудников М.Э., Камова Н.Н., Степанова Э.Ф. Биологически активные вещества ореха черного и возможности их применения в медицинской практике // Медлайн. – 2004. - №3. – С. 43-44.

5. Дудников М.Э., Арчинова Т.Ю., Андреева И.Н. Комплексная технология переработки околоплодника ореха черного как возможность получения эффективных и экономичных БАД // Медицинская наука и здравоохранение: Мат. 2-й регион. науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов Краснодарского края 21-23 апр. 2004 г. – Анапа, 2004. – С. 142-143.

6. Дудников М.Э., Арчинова Т.Ю., Андреева И.Н. Разработка малоотходной технологической схемы переработки околоплодника ореха черного для получения лекарственных и косметических средств // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2004. – С. 81-82.

7. Дудников М.Э., Мелик-Гусейнов В.В. Фармако-технологические и ресурсные исследования ореха черного, произрастающего в районе Кавказских минеральных вод // Здоровье и образование в XXI веке: мат. VI междунар. науч.-практич. конф. – Москва, 2005. – С. 333-334.
8. Дудников М.Э., Мелик-Гусейнов В.В. Динамика БАВ в зависимости от сроков и условий хранения околоплодников ореха черного В.В. Мелик-Гусейнов // Владикавказский медико-биологический вестник– Владикавказ, 2005. – С. 189-190.
9. Дудников М.Э. Разработка и фармакотехнологическое изучение па-рафармацевтических препаратов ореха черного // Медицинская наука и здравоохранение: Мат. 3-ей регион. науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов Краснодарского края 21-24 апр. 2005 г. – Анапа, 2005. – С. 312-313.
10. Дудников М.Э., Мелик-Гусейнов В.В. Микроэлементный и фитохимический анализ околоплодника ореха черного (сем. JUGLANDACEAE) // Вестник СГУ. – 2006. - №47. – С. 130-134.

Подписано в печать 22.11.2006

Формат 60×84 1/16
Бумага офсетная

Усл.печл. 1,05
Тираж 100 экз.

Уч.-изд.л. 0,89
Заказ 422

Отпечатано в Издательско-полиграфическом комплексе
Ставропольского государственного университета.
355009, Ставрополь, ул.Пушкина, 1.