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

**КІЧИМАСОВА Яна Сергіївна**

УДК 615.322:528.931.4

**Фармакогностичне вивчення ЯСЕНА ЗВИЧАЙНОГО ТА РОЗРОБКА СУБСТАНЦІЙ НА ЙОГО ОСНОВІ**

**15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія**

**Автореферат**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата фармацевтичних наук**

**Харків – 2006**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі ботаніки Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Міністерства охорони здоров’я України.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, доцент

#  ХВОРОСТ оЛЬГА пАВЛІВНА,

 Національний фармацевтичний університет,

 доцент кафедри ботаніки

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор

 **КОВАЛЬОВА АЛЛА МИХАЙЛІВНА,**

 Національний фармацевтичний університет,

 професор кафедри фармакогнозії

 доктор фармацевтичних наук, професор

  **ГРИЦЕНКО ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА,**

Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика, професор кафедри фармацевтичної хімії і фар-макогнозії

Провідна установа: **Запорізький державний медичний**

**університет,** кафедра фармакогнозії

з курсом ботаніки

Захист відбудеться “\_\_” жовтня 2006 р. о \_\_\_\_\_\_ 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 ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий “\_\_\_” вересня 2006 року.

Вчений секретар

спеціалізованої Вченої ради

доктор біологічних наук, професор Л.М.Малоштан

**Загальна характеристика роботи**

 **Актуальність теми дослідження**: Поповнення асортименту лікарських засобів новими препаратами рослинного походження було і залишається однією з важливих проблем фармації. Пошук перспективних рослин серед представників вітчизняної флори, які мають достатню сировинну базу та здавна використовуються народною медициною, є актуальним завданням сучасної фармації.

Виходячи з цього, перспективною є розповсюджена в Україні рослина – ясен звичайний, який широко використовується в промисловості завдяки цінній деревині. З літературних даних відомо, що ясен звичайний містить різні групи біологічно активних речовин (БАР): флавоноїди, кумарини, дубильні речовини, тритерпени, вітаміни тощо.

В народній медицині практично усі частини ясена використовуються як симпотоматичний засіб при захворюваннях сечовивідних шляхів, шлунково-кишкового тракту, як протизапальні, протиревматичні, антибактеріальні, антигельмінтні засоби. Листя ясена звичайного внесено до Європейської фармакопеї 4-го та 5-го видання. Листя та кора ясена звичайного використовуються для виробництва препаратів та біологічно активних добавок “Фітодолор” (протиревматичний засіб, Росія), “Ескувіт” (для лікування захворювань судин, Болгарія). Проте, рослина в Україні неофіцинальна, вітчизняною фармацевтичною промисловістю препарати з ясена звичайного не випускаються, незважаючи на його достатню сировинну базу. Плоди ясена здавна застосовують як харчовий продукт

За даними Українського державного проектного лісовпорядного виробничого об’єднання “Укрдержліспроект” станом на 01.01.2004 р., ясен звичайний в Україні займає площу 109158,4 га, можлива заготівля 23346,49 тис.м.куб. деревини.

Виходячи з сучасного стану данної проблеми, дослідження сировини ясена звичайного з метою створення субстанцій, які виявляють різні види біологічної активності є актуальним.

 **Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету “Фармакогностичне вивчення біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження” (№ держреєстрації 0103U000476) та Проблемної комісії “Фармація” МОЗ і АМН України.

**Мета і задачі дослідження.** Метою нашої роботи було дослідження груп БАР, виявлення перспективних видів сировини, отримання комплексів БАР ясена звичайного, стандартизація сировини і отриманих субстанцій та встановлення їх біологічної активності. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити задачі:

* провести попереднє вивчення хімічного складу сировини ясена звичайного та виявити перспективні види сировини для подальших досліджень;
* виділити в індивідуальному стані домінуючі сполуки та встановити їх структуру;
* провести кількісне визначення основних груп БАР в сировині і отриманих субстанціях;
* визначити технологічні параметри перспективних видів сировини та розробити оптимальні технології одержання густих екстрактів;
* провести стандартизацію сировини та густих екстрактів для розробки проектів аналітично-нормативної документації;
* підтвердити перспективність розробки лікарських форм на основі отриманих субстанцій за результатами дослідження біологічної активності.

**Об’єкти дослідження:** листя, кора, пагони, деревина, нестиглі та стиглі плоди, корені ясена звичайного, виділені з них БАР – похідні поліолів, фенольні сполуки: похідні гідроксибензойної та гідроксикоричних кислот, похідні гідроксикоричного спирту, гідроксикумарини, флавоноїди; отримані субстанції.

**Предметом дослідження** стало виявлення, виділення БАР з сировини та отриманих субстанцій, встановлення структури похідних поліолів, фенольних сполук: похідних гідроксибензойної та гідроксикоричних кислот, похідних гідроксикоричного спирту, гідроксикумаринів, флавоноїдів, визначення діагностичних ознак анатомічної будови листя та кори, встановлення кількісного вмісту основних груп БАР, визначення технологічних параметрів сировини, вибір оптимальних технологій отримання субстанцій, встановлення їх біологічної активності.

**Методи дослідження.** Якісний склад і кількісний вміст БАР визначали фармакопейними методами аналізу, використовували хроматографію в тонких шарах сорбенту (ТШХ), на папері (ПХ) та газорідинну хроматографію (ГРХ). Якісний склад ліпофільних комплексів досліджували за допомогою тривимірної скануючої спектрофлуориметрії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах спектру. Для виділення сум БАР та сполук в індивідуальному стані використовували колонкову адсорбційну хроматографію та рехроматографію на целюлозі, силікагелі та поліаміді. Хімічну будову виділених речовин встановлювали за допомогою методів УФ-, ІЧ-спектрального аналізу, визначення оптичної активності, кислотного гідролізу, метилювання та ацетилювання. Визначення біологічної активності проводили за методиками in vitro. Анатомічну будову та локалізацію сполук в листі та корі встановлювали на препаратах з поверхні та поперечних зрізах.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено системне фармакогностичне дослідження сировини ясена звичайного флори України. Встановлено якісний склад та кількісний вміст основних груп БАР: макро- та мікроелементів, жирних кислот, пігментів, органічних кислот, фенольних сполук: в тому числі суми окислювальних фенолів, елеутерозиду В, суми БАР – гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, катехінів, дубильних речовин. Вперше отримано ліпофільні фракції листя, кори та насіння ясена звичайного та визначено ряд їх числових показників.

Вперше для досліджуваних зразків сировини виділено в індивідуальному стані та встановлено структуру 9 сполук.

Визначено технологічні параметри листя та кори ясена звичайного. Розроблено оптимальні технології отримання густих екстрактів листя та кори ясена звичайного. Проведено стандартизацію сировини та отриманих субстанцій.

Досліджено біологічну активність отриманих субстанцій листя та кори ясена звичайного та доведено їх антимікробну, цитотоксичну, мембраностабілізуючу та сперміцидну дію, а також позитивний вплив на клітинну ланку імунітету.

 Новизну проведених досліджень підтверджено деклараційним патентом на корисну модель №13236 (А61К36/00) “Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з протимікробною та мембраностабілізуючою дією” (опубл. 15.03.06. Бюл.№3).

 **Практичне значення одержаних результатів.** Дані досліджень хімічного складу ясена звичайного, анатомічної будови та технологічних параметрів сировини впроваджено в навчальний процес кафедри фармації Івано-Франківського державного університету, кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедр фармакогнозії та післядипломної підготовки з фармації Запорізького державного медичного університету, кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії медичного інституту Української асоціації народної медицини, кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

 На технологію отримання густого екстракту кори ясена звичайного оформлено технологічний регламент. За результатами досліджень розроблено проекти аналітично-нормативної документації на кору ясена звичайного та на отриманий густий екстракт кори. Технологію отримання густого екстракту кори апробовано в умовах ТОВ “Фармацевтична кампанія “Здоров’я”.

 **Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею.

 Дисертанту належить вирішальна роль у визначенні мети дослідження, шляхів її реалізації, плануванні та проведенні експерименту, інтерпретації та узагальненні одержаних результатів, формуванні основних положень та висновків, що захищаються. Крім того, проведено літературно-патентний пошук інформаційних джерел про розповсюдження, хімічний склад і використання рослин роду Ясен у науковій та народній медицині, досліджено якісний склад сировини ясена звичайного, виділено та ідентифіковано 19 сполук різної хімічної природи, визначено кількісний вміст основних груп БАР в сировині ясена звичайного та в отриманих субстанціях. Розроблено технологію одержання густих екстрактів з листя та кори ясена звичайного, визначено числові показники сировини та напрацьованих серій густих екстрактів листя та кори ясена звичайного. Розроблено проекти аналітично-нормативної документації на кору та густий екстракт кори ясена звичайного.

 **Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідались на ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія” (Харків, 2003), ІІ Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі «Ліки та життя» (Київ, 2004), Всеукраїнському науково-практичному семінарі «Перспективи створення в Україні лікарських препаратів різної спрямованості дії» (Харків, 2004), науково-практичній конференції «Лікувальна косметика: дійсність та майбутнє» (Харків, 2005), VI національному з’їзді фармацевтів України «Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України» (Харків, 2005), науково-практичній конференції «Актуальные проблемы образования, науки и производства в фармации» (Ташкент, 2005), 1-й міжнародній науково-практичній конференції «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2006).

**Публікації**. За матеріалами дисертації опубліковано 12 робіт, у тому числі 4 статті в фахових виданнях, 1 деклараційний патент на корисну модель та 7 тез доповідей.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертація викладена на 174 сторінках, має 26 рисунків, 38 таблиць і складається зі вступу, огляду літератури, 4 розділів власних досліджень, загальних висновків і списку літератури, який містить 178 джерел (з них 70 іноземних).

##### Основний зміст роботи

Об’єктами досліджень була сировина ясена звичайного та отримані з неї субстанції.

 **Розділ 1** (огляд літератури) присвячений стану досліджень рослин роду Ясен як в фармакогностичному аспекті, так і в плані застосування в науковій та народній медицині.

 **В розділі 2** наведено результати системного дослідження якісного хімічного складу сировини. Встановлено, що в листі, корі, пагонах, деревині, нестиглих та стиглих плодах, коренях ясена звичайного містяться вільні та зв’язані цукри, вільні та зв’язані амінокислоти, фенолкарбонові кислоти, кумарини, флавоноїди, дубильні речовини, стероїди, тритерпеноїди, органічні кислоти, аскорбінова кислота, каротиноїди та хлорофіли.

 Методом тримірної скануючої спектрофлуориметрії досліджено якісний склад ліпофільних фракцій листя та кори ясена звичайного (рис.1). Перспективними видами сировини є листя та кора ясена звичайного, що містять найбільші кількості таких БАР як похідні бензойної кислоти, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, дубильні речовини. Інші види сировини також представляють інтерес для подальших досліджень.

 Використовуючи фізичні, фізико-хімічні, хімічні методи (УФ- та ІЧ-спектроскопію, визначення оптичної активності, кислотний гідроліз, лужну деструкцію), з листя та кори ясена звичайного, виділено в індивідуальному стані та встановлено структуру 19 сполук: поліол – D-маніт (речовина 1); похідне гідроксибензойної кислоти – 3,4,5,-тригідроксибензойна (галова) кислота (речовина 2); похідне гідроксикоричного спирту – 4-О-β-D-глюкопіранозил-3,5-диметоксикоричний спирт – (елеутерозид В) (речовина 3); похідні гідроксикоричної кислоти – 4-гідроксикорична (*п*-кумарова) кислота (речовина 4), 3,4-дигідроксикорична (кофейна) кислота (речовина 5), 5-О-кофеїл–D–хінна кислота (хлорогенова) кислота (речовина 6); похідні бензо-α-пірону - 6,7-дигідроксикумарин (ескулетин) (речовина 7), 6-О-β-D-глюкопіранозил-7-гідроксикумарин (ескулін) (речовина 8), 7-О-β-D-глюкопіранозил-6-гідроксикумарин (цихорин) (речовина 9), 6-метокси-7-гідроксикумарин (скополетин) (речовина 10), 5,6-дигідрокси-7-метоксикумарин (ізофраксетин) (речовина 11), 6-гідрокси-5,7-диметоксикумарин (фраксинол) (речовина 12), 6-О-β-D-глюкопіранозил-5,7-диметоксикумарин (фраксинозид) (речовина 13); похідні 2-фенілбензо-γ-пірону - 3,5,7,4’-тетрагідроксифлавон (кемпферол) (речовина 14), 3,5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон (кверцетин) (речовина 15), 3-О-α-L-рамнопіранозил-5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон (кверцитрин) (речовина 16), 3-О-β-D-глюкопіранозил-5,7,3’,4’пентагідроксифлавон (ізокверцитрин) (речовина 17), 3-О-β-D-галактопіранозил-5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон (гіперозид) (речовина 18), 3-О-β-D-галактопіранозил-(6-1)-О-α-L-рамнопіранозил-5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон (рутин) (речовина 19). Основні фізичні властивості цих речовин наведені в табл.1.

 Вперше з листя та кори ясена звичайного виділено 9 речовин. З листя ізольовано 4 речовини: елеутерозид В, ізофраксетин, кемпферол, кверцетин. З кори – 5 речовин: галова кислота, цихорин, скополетин, *п*-кумарова кислота, хлорогенова кислота.

Кількісне визначення основних груп БАР (розділ 3). **Вперше проведено аналіз елементного складу листя, кори ясена звичайного та їх густих екстрактів у порівнянні з грунтом. Встановлено наявність 21 макро- та мікроелементу. У значній кількості рослинні об’єкти накопичують натрій, калій, кальцій, магній та фосфор (табл 2).**

**Проведено визначення якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот ліпофільних фракцій листя, кори та насіння ясена звичайного (табл. 3). Встановлено, що більше компонентів цієї природи містить ліпофільна фракція насіння (11 сполук), менше – ліпофільні фракції листя та кори (9 та 7 сполук відповідно).**

**Визначення кількісного вмісту сум каротиноїдів та хлорофілів у ліпофільних фракціях листя, кори та насіння ясена звичайного за методом спектрофотометрії показало, що для ліпофільної фракції листя характерний більший вміст хлорофілів – 2,40±0,01%, для ліпофільної фракції насіння – більший вміст суми каротиноїдів 0,92±0,01%.**

8

 Таблиця 1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Шифр****речо-****вини** | **Назва речовини** | **Загальна формула** | **Т пл., ºС** | **Сировина та субстанції, з яких виділена речовина** |
|  | **D – манніт** | **С6Н14О6** | **167-168** | **густий екстракт листя** |
|  | **галова кислота** **(3, 4, 5-тригідроксибензойна кислота)** | **С7Н6О5** | **254-256** | **кора\*** |
|  | **елеутерозид В** **(4-0-β-D-глюкопіранозил-3,5-диметоксикоричний спирт)** | **С17Н24О9** | **190-192** | **листя\*** |
|  | ***п*-кумарова кислота (4-гідроксикорична кислота)** | **С9Н6О3** | **212-214** | **кора\*** |
|  | **кофейна кислота (3,4-дигідроксикорична кислота)** | **С9Н8О4** | **194-195** | **листя** |
|  | **хлорогенова кислота (5-0-кофеїл–D–хінна кислота)** | **С16Н18О9** | **185-187** | **кора\*** |
|  | **ескулетин (6,7-дигідроксикумарин)** | **С9Н6О4** | **269-272** | **густий екстракт кори** |
|  | **ескулін (6-0-β-D-глюкопіранозил-7-гідроксикумарин)** | **С15Н16О9** | **203-205** | **густий екстракт листя** |
|  | **цихорин** **(7-0-β-D-глюкопіранозил-6-гідроксикумарин)** | **С15Н16О9** | **213-215** | **кора\*** |
|  | **скополетин (7-гідрокси-6-метоксикумарин)** | **С10Н9О4** | **203-205** | **кора\*** |
|  | **ізофраксетин (5,6-дигідрокси-7-метоксикумарин)** | **С10Н8О5** | **228-230** | **листя\*** |
|  | **фраксинол (6-гідрокси-5,7-диметоксикумарин)** | **С11Н10О5** | **171-172** | **густий екстракт листя** |
|  | **фраксинозид** **(6-О-β-D-глюкопіранозил-5,7-диметоксикумарин)** | **С17Н20О11** | **134-136** | **густий екстракт кори** |
|  | **кемпферол (3,5,7,4´-тетрагідроксифлавон)** | **С15Н10О6** | **275-277** | **листя\*** |
|  | **кверцетин (3,5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон)** | **С15Н10О7** | **310-312** | **листя\*** |
|  | **кверцитрин** **(3-0-α-L-рамнопіранозил-5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон)** | **С21Н20О12** | **184-186** | **листя** |
|  | **ізокверцитрин** **(3-0-β-D-глюкопіранозил-5,7,3’,4’пентагідроксифлавон)** | **С21Н20О12** | **224-231** | **листя** |
|  | **гіперозид** **(3-0-β-D-галактопіранозил-5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон)** | **С21Н20О12** | **246-249** | **листя** |
|  | **рутин (3-О-β-D-галактопіранозил(6-1)-О-α-L-рамнопіранозил-5,7,3’,4’-пентагідроксифлавон)** | **С27Н30О16** | **195-198** | **густий екстракт кори** |

Фізичні властивості речовин, виділених з сировини та субстанцій ясена звичайного

9

Примітка: \*позначено об’єкти, з яких речовини виділені вперше.

**Таблиця 2**

**Якісний склад і кількісний вміст елементів в листі, корі ясена звичайного та в густих екстрактах листя та кори в порівнянні з грунтом\* (мг%)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| №п/п | Елемент | Вміст елемента, мг% |
| листя  | густий екстракт листя | кора | густий екстракт кори | грунт |
| 1 | B | 1,40 | 0,80 | 0,70 | 0,40 | <0,50 |
| 2 | Mg | 570,00 | 400,00 | 180,00 | 38,00 | 90,00 |
| 3 | Al | 140,00 | 8,00 | 28,00 | 6,50 | 690,00 |
| 4 | P | 240,00 | 55,00 | 105,00 | 25,00 | <3,00 |
| 5 | K | 2100,00 | 3200,00 | 1100,00 | 420,00 | 1400,00 |
| 6 | Ca | 1300,00 | 800,00 | 710,00 | 100,00 | 1800,00 |
| 7 | Na | 3700,00 | 2500,00 | 3100,00 | 2100,00 | 1300,00 |
| 8 | V | 0,05 | <0,01 | 0,06 | 0,02 | 30,00 |
| 9 | Cr | 0,12 | <0,02 | 0,08 | 0,04 | 30,00 |
| 10 | Mn | 14,00 | 8,00 | 6,00 | 0,60 | 120,00 |
| 11 | Ni | 0,14 | 0,03 | 0,07 | 0,06 | 10,00 |
| 12 | Fe | 14,00 | 10,00 | 14,00 | 5,00 | 3500,00 |
| 13 | Cu | 0,35 | 0,50 | 0,05 | 0,32 | 20,00 |
| 14 | Zn | 0,55 | 0,40 | 0,28 | 0,08 | 10,00 |
| 15 | Sr | 10,00 | 1,00 | 7,00 | 0,60 | 9,00 |
| 16 | Mo | 0,07 | 0,04 | 0,04 | 0,01 | 0,50 |
| 17 | Ag | 0,07 | 0,05 | 0,02 | <0,01 | <0,30 |
| 18 | Sn | <0,02 | <0,02 | 0,07 | 0,03 | 1,00 |
| 19 | Pb | 0,07 | <0,02 | 0,14 | 0,03 | 2,00 |
| 20 | Bi | <0,02 | <0,02 | <0,02 | <0,02 | <0,02 |
| 21 | Cd | <0,02 | <0,02 | <0,02 | <0,02 | <0,02 |

**Примітка: \* в перерахунку на абсолютно суху сировину (для листя та кори),**

**або в перерахунку на абсолютно сухий залишок (для густих екстрактів листя та кори).**

**Визначено ряд числових показників ліпофільних фракцій: відносна густина, показник заломлення, кислотне число, число омилення, ефірне число та йодне число. Отримані дані необхідні для стандартизації ліпофільних фракцій листя, кори та насіння ясена звичайного.**

**Проведено визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти та суми вільних органічних кислот у повітряно-сухій сировині та у густих екстрактах листя і кори ясена звичайного.**

**Найбільший вміст аскорбінової кислоти властивий густому екстракту листя ясена звичайного (0,08±0,007%), суми органічних кислот – листю та густому екстракту листя (5,38±0,04% та 11,32±0,12% відповідно).**

**Таблиця 3**

**Кількісний вміст жирних кислот у ліпофільних фракціях ясена звичайного**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№****п/п** | **Назва жирної кислоти** | **Скорочене хімічне позначення жирної кислоти** | **Вміст жирної кислоти в ліпофільних фракціях****(% від суми)** |
| **листя** | **кори** | **насіння** |
| **1** | **лауринова** | **С12:0** | **–** | **–** | **4,37** |
| **2** | **міристинова** | **С14:0** | **–** | **–** | **7,10** |
| **3** | **пентадеканова** | **С15:0** | **1,51** | **–** | **1,49** |
| **4** | **пальмітинова** | **С16:0** | **18,10** | **24,70** | **5,48** |
| **5** | **пальмітолеїнова** | **С16:1** | **–** | **2,73** | **–** |
| **6** | **стеаринова** | **С18:0** | **4,03** | **2,07** | **4,98** |
| **7** | **олеїнова** | **С18:1** | **22,22** | **–** | **13,03** |
| **8** | **лінолева** | **С18:2** | **16,12** | **10,53** | **17,15** |
| **9** | **ліноленова** | **С18:3** | **2,31** | **–** | **5,33** |
| **10** | **арахінова** | **С20:0** | **15,83** | **48,11** | **10,02** |
| **11** | **гондолієва** | **С20:1** | **2,53** | **6,31** | **2,41** |
| **12** | **бегенова** | **С22:0** | **0,96** | **1,36** | **3,98** |
| **Сума неідентифікованих жирних кислот:** | **16,18** | **4,01** | **24,66** |
| **Сума насичених жирних кислот:** | **40,43** | **76,24** | **37,42** |
| **Сума ненасичених жирних кислот:** | **43,18** | **19,57** | **37,92** |

**Для вибору критеріїв стандартизації нами визначено кількісний вміст в сировині та субстанціях ясена звичайного таких груп фенольних сполук як суми окислювальних фенолів, елеутерозиду В, суми гідроксикоричних кислот, суми флавоноїдів, дубильних речовин та суми катехінів (табл. 4).**

**Визначення кількісного вмісту суми окислювальних фенолів у листі, корі, пагонах, стиглих і нестиглих плодах, деревині, а також у густих екстрактах листя, кори та нестиглих плодів ясена звичайного показало, що їх вміст більший у листі та корі – 6,50±0,29% та 8,80±0,13 відповідно. У густих екстрактах листя міститься 9,16±0,06%, кори – 12,86±0,043%, нестиглих плодів – 15,27±0,06%.**

**Кількісне визначення елеутерозиду В у листі, корі, пагонах, а також у густих екстрактах листя і кори ясена звичайного проводили за допомогою методу спектрофотометрії. Встановлено, що більшу кількість елеутерозиду В містять кора**

## Таблиця 4

## Стандартизація сировини та густих екстрактів ясена звичайного за вмістом різних груп фенольних сполук (m=5, Р=0,95)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№****п/п** | **Об’єкти, що вивчались** | **Кількісний вміст** |
| окислю-вальнихфенолів | елеутеро-зиду В | гідрокси-коричних кислот | **флавоноїдів** | катехінів | **дубильних речовин** |
|  | листя | 6,50±0,29 | 0,59±0,01 | 2,88±0,01 | 0,87±0,01 | 1,51±0,16 | 0,18±0,01 |
|  | кора | 8,80±0,13 | 0,88±0,01 | 1,53±0,01 | 0,39±0,01 | 1,26±0,15 | 0,49±0,02 |
|  | деревина  | 1,23±0,08 | не визначали | 0,68±0,01 | 0,08±0,01 | 0,12±0,03 | 0,31±0,01 |
|  | пагони | 4,61±0,12 | 0,90±0,01 | 1,11±0,01 | 0,59±0,01 | 1,95±0,17 | 0,91±0,02 |
|  | плоди нестиглі | 4,86±0,10 | не визначали | 1,92±0,01 | 0,50±0,01 | 2,10±0,17 | 0,26±0,01 |
|  | плоди стиглі | 2,48±0,13 | не визначали | 1,01±0,01 | 0,58±0,01 | 0,71±0,14 | 0,81±0,02 |
|  | густий екстракт листя\* | 9,16±0,06 | 0,050±0,001 | 4,05±0,05 | 2,04±0,01 | 0,60±0,09 | 0,62±0,02 |
|  | густий екстракт кори\* | 12,86±0,04 | 0,050±0,001 | 3,52±0,04 | 1,36±0,01 | 0,09±0,03 | 1,11±0,01 |
|  | густий екстракт плодів нестиглих\* | 15,27±0,06 | не визначали | 3,52±0,01 | 1,04±0,01 | 0,24±0,01 | 0,97±0,02 |

**Примітка: в перерахунку на абсолютно суху сировину, або \* - на абсолютно сухий залишок.**

**та пагони – 0,88±0,01% і 0,90±0,01% відповідно. Густі екстракти листя та кори містять незначні кількості елеутерозиду В – 0,05±0,01% та 0,05±0,04% відповідно.**

**Вміст суми гідроксикоричних кислот у досліджуваних видах сировині та субстанціях визначали спектрофотометричним методом в перерахунку на хлорогенову кислоту. Для листя їх вміст складає 2,88±0,01%, що в 1,5-4,2 рази вище ніж в решті видів сировини. Густий екстракт листя містить значну кількість гідроксикоричних кислот – 4,05±0,05%, що в 1,2 рази перевищує вміст цієї групи сполук в густих екстрактах кори – 3,52±0,04% та нестиглих плодів – 3,52±0,01%.**

**Вміст суми флавоноїдів у сировині та субстанція, що досліджували, визначали спектрофотометричним методом в перерахунку на рутин. Із сировини більшу кількість флавоноїдів містять листя – 0,87±0,01%. Із густих екстрактів більший вміст флавоноїдів (в 1,5-2 рази більше решти густих екстрактів) притаманний густому екстракту листя і дорівнює 2,04±0,01%.**

**За методом спектрофотометрії у перерахунку на (+)-катехін визначено кількісний вміст суми катехінів у сировині та субстанціях, що досліджували. Із сировини більшу кількість досліджених сполук містять нестиглі плоди та пагони (2,10±0,17% та 1,95±0,17% відповідно), із густих екстрактів – густий екстракт листя (0,60±0,09%).**

**Визначено кількісний вміст дубильних речовин в перерахунку на танін у досліджуваних видах сировини та субстанціях. Встановлено, що найбільшу кількість дубильних речовин містять пагони і стиглі плоди – 0,91±0,02% та 0,81±0,02% відповідно. Із густих екстрактів більше, ніж густий екстракт листя, дубильних речовин містять густі екстракти кори і нестиглих плодів – 1,11±0,01% та 0,97±0,02% відповідно.**

**Аналіз отриманих даних дозволив нам обрати критерії стандартизації сировини та субстанцій ясена звичайного за вмістом основних груп БАР. Для листя основними показниками є вміст суми окислювальних фенолів та суми гідроксикоричних кислот, для кори – вміст суми окислювальних фенолів, елеутерозиду В та суми гідроксикоричних кислот.**

Розробка технологій отримання густих екстрактів з листя та кори ясена звичайного (4 розділ). **Початковим етапом було визначення технологічних параметрів листя і кори ясена звичайного: втрата в масі при висушуванні, середній розмір часток, питома, об’ємна, насипна маси, а також пористість, порізність та вільний об’єм шару сировини, питома поверхня часток, плинність, кут природного ухилу і коефіцієнти поглинання екстрагентів.**

Наступний етап полягав у підборі оптимальних параметрів технологічного процесу. Для цього нами було обрано відповідні розчинники для екстрагування БАР сировини ясена звичайного. Встановлено, що для листя ясена звичайного доцільно використовувати 70%-вий спирт, який вилучає 37,49±0,22% екстрактивних речовин і 6,62±0,04% суми окислювальних фенолів, а кору доцільно екстрагувати 80%-вим спиртом, при цьому вміст екстрактивних речовин становить 22,55±0,12%, а вміст суми окислювальних фенолів – 9,06±0,03%.

Визначено оптимальне співвідношення сировина-екстрагент для сировини ясена звичайного: для листя та кори воно складає 1:15. При цьому співвідношенні сума окислювальних фенолів становить одну п’яту від екстрактивних речовин листя та дві п’ятих – від екстрактивних сполук кори ясена звичайного.

Встановлено оптимальний температурний режим екстракції сировини та кратність зливів екстрагенту: для листя та кори екстракцію доцільно проводити при 90°С, кратність зливів становить 3. Таким чином, на підставі отриманих даних було розроблено технології отримання густих екстрактів з листя та кори ясена звичайного, вихід яких склав: 29,0-31,0% від маси повітряно-сухого листя та 20,5-22,0% від маси повітряно-сухої кори. Кількісний вміст суми окислюваних фенолів становив не менш 8,80% – у густому екстракті листя та не менш 11,80% – у густому екстракті кори, елеутерозиду В в густому екстракті кори становив не менш 0,04%, суми гідроксикоричних кислот міститься не менше 4,00% – у густому екстракті листя та не менше 3,50% – у густому екстракті кори.

На технологію отримання густого екстракту кори оформлено технологічний регламент, технологію апробовано в умовах ТОВ “Фармацевтична кампанія “Здоров’я”.

**Стандартизація сировини ясена звичайного та отриманих з неї субстанцій (5 розділ).** Для стандартизації сировини визначено показники 5 серій листя та кори ясена звичайного 2003-2005 рр. заготівлі: макро- та мікроскопічні ознаки; ідентифікація, втрата в масі при висушуванні (не більше 10% для листя та 7% для кори), загальна зола (не повинна перевищувати для листя 10%, для кори 9%), домішки для листя (потемнілої сировини не більше 2%, органічних домішок не більше 1%, мінеральних – не більше, ніж 1%), домішки для кори (потемнілої сировини не більше 5%, органічних домішок не більше, ніж 1%, мінеральних домішок не більше 1%), вміст екстрактивних речовин (не менше 37,00% для листя та не менше 16,50% для кори); вміст суми окислювальних фенолів (не менше 6,50% в листі, 8,70 % в корі), вміст елеутерозиду В для кори (не менше 0,80%), вміст гідроксикоричних кислот (не менше 2,50% для листя, для кори 1,40%).

За результатами досліджень 5 серій густого екстракту листя та 5 серій густого екстракту кори ясена звичайного розроблено розділи до проектів АНД: опис, розчинність, ідентифікація, однорідність. Сухий залишок складає 72-75% для густого екстракту листя, 70-73% – для густого екстракту кори. Вміст важких металів – не більше 0,006-0,007% для густого екстракту листя, не більше 0,005-0,006% для густого екстракту кори. Кількісний вміст діючих речовин: суми окислюваних фенолів не менше 8,80% у густому екстракті листя, не менше 11,80% у густому екстракті кори, елеутерозиду В в густому екстракті кори – не менше 0,04%, суми гідроксикоричних кислот – не менше 4,00% у густому екстракті листя, не менше 3,50% – у густому екстракті кори.

Вперше проведено вивчення анатомічної будови листя та кори ясена звичайного та визначено діагностичні ознаки сировини*.*Встановлено, що для верхньої епідерми листя притаманні прямостінні чотирьох- і п'ятикутні клітини. Для нижньої – прямостінні чотирьохкутні клітини, продихи аномоцитного типу, короткі одноклітинні трихоми, щитковидні залозки. Черешки опушені одно- і багатоклітинними волосками, а також вкриті щитковидними багатоклітинними залозками. Під епідермою знаходиться п’яти- десятишарова кутова коленхіма, глибше розташована рихла паренхіма і провідні пучки, характер проходження яких є діагностичною рисою сировини.

Основною діагностичною ознакою кори ясена звичайного є розташування склеренхімних кілець. Глибокі шари кори ясена звичайного представлені переривчастими склеренхімними кільцями, що утворені групами луб’яних волокон та склереїд.

Біологічну активність густих екстрактів листя та кори ясена звичайного досліджували на базі Харківського науково-дослідницького інституту мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова під керівництвом ст.н.с., д.ф.н. А.В. Мартинова, д.м.н. Т.І. Коляди та на базі кафедри фізіології Національного фармацевтичного університету під керівництвом д.біол.н., проф. Л.М. Малоштан. Було визначено спектр антимікробної активності, бактерицидну, бактеріостатичну дію, проведено тест на клітинний імунітет. Встановлено, що досліджувані субстанції мають досить широкий спектр антимікробної активності, а також проявляють бактерицидну та бактеріостатичну дію. Густий екстракт листя підвищує клітинний імунітет. 2% розчин густого екстракту кори має виражену цитотоксичну активність та сперміцидну дію, а 2% розчин густого екстракту листя виявляє мембраностабілізуючу активність.

Результати досліджень впроваджено у навчальний процес учбових закладів ІІІ-ІV рівня акредитації. Новизна розробки підтверджена деклараційним патентом на корисну модель №13236 (А61К 36/00) “Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з протимікробною та мембраностабілізуючою дією” (опубл. 15.03.06. Бюл.№3). Напрацьований густий екстракт кори ясена звичайного переданий на кафедру промислової фармації НФаУ, де під керівництвом к.ф.н. доц. О.О.Ляпунової проводяться науково-дослідницькі роботи з розробки твердих та м’яких лікарських форм з цією субстанцією. Комплекс доклінічних досліджень цієї субстанції проводиться на базі Центральної науково-дослідницької лабораторії НФаУ під керівництвом д.ф.н. проф. Л.В.Яковлевої.

ВИСНОВКИ

1. Вперше в Україні проведено системне фармакогностичне вивчення ясена звичайного з дослідженням груп БАР, виявленням перспективних видів сировини, отриманням комплексів БАР, стандартизацією сировини та субстанцій, встановленням їх біологічної активності.
2. На підставі результатів хроматографічного скрінінгу з точки зору накопичення груп БАР виділено перспективні види сировини – листя та кору, які накопичують в переважаючій кількості похідні гідроксибензойної кислоти, гідроксикоричні кислоти, гідроксикумарини, флавоноїди, дубильні речовини.
3. Використовуючи фізичні, фізико-хімічні, хімічні методи (УФ- та ІЧ-спектроскопію, визначення оптичної активності, кислотний гідроліз, лужну деструкцію) з листя та кори ясена звичайного, виділено в індивідуальному стані та встановлено структуру 19 сполук: поліол, похідне гідроксибензойної кислоти, похідне гідроксикоричного спирту, 3 похідні гідроксикоричної кислоти, 7 похідних бензо-α-пірону, 6 похідних 2-фенілбензо-γ-пірону. З них вперше для листя та кори ясена звичайного виділено 9 речовин: з листя – 4 речовини, з кори – 5 речовин.
4. Вперше визначено кількісний вміст жирних кислот, макро- та мікроелементів, суми органічних кислот в сировині та субстанціях ясена звичайного.
5. Встановлено кількісний вміст ряду груп фенольних сполук: суми окислювальних фенолів, елеутерозиду В, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин та катехінів в сировині ясена звичайного та отриманих густих екстрактах.
6. Визначено технологічні параметри сировини, розроблено оптимальні технології отримання густих екстрактів з листя та кори ясена звичайного.
7. Встановлено фізичні та хімічні показники сировини та отриманих субстанцій, які використані для їх стандартизації.
8. Отримані субстанції з сировини ясена звичайного мають антимікробну активність, чинять позитивний вплив на клітинний імунітет, а також виявляють цитотоксичну, мембраностабілізуючу та сперміцидну дію.
9. Вперше розроблені проекти АНД на кору та густий екстракт кори ясена звичайного дають можливість стандартизувати та контролювати якість продукту, а технологічний регламент отримання густого екстракту кори ясена звичайного апробовано в умовах ТОВ «Фармацевтична кампанія «Здоров’я».

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ВИКЛАДЕНИЙ У РОБОТАХ**

* 1. Крюкова Я.С., Хворост О.П. Исследование анатомического строения ассимилирующих и одревесневших побегов растений рода Ясень Fraxinus L. (Oleaceae) // Запорожский мед. журн. – 2004. -Т.2, №1. -С.101-103. (особистий внесок – експериментальні дослідження, участь в узагальненні результатів, підготовці статті).
	2. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Кількісний вміст різних груп фенольних сполук в ясені звичайному, густих екстрактах його кори, листя та нестиглих плодів, а також цитотоксична активність отриманих субстанцій // Фітотерапія. Часопис. –2005. -№3. -С.56-58. (особистий внесок – проведення досліджень, участь в узагальненні результатів, написанні статті).
	3. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Визначення деяких числових показників листя та кори ясена звичайного як перспективних видів лікарської рослинної сировини // Фармац. журн. – 2005. -№6. -С.76-79. (особистий внесок – здійснення кількісного визначення показників, участь в обговоренні експериментальних даних, підготовка статті).
	4. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Дослідження ліпофільних фракцій листя, кори та насіння ясена звичайного // Запорожский мед. журн. – 2006. -№1(34). -С.52-55. (особистий внесок – участь в плануванні та проведенні досліджень, обробка отриманих результатів, написання статті).
	5. Деклараційний патент України на корисну модель №13236 (А61К36/00) “Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з протимікробною та мембраностабілізуючою дією” / Я.С.Кічимасова, О.П.Хворост, В.М.Маркова, Л.М.Малоштан, В.В.Малий. - № u 2005 09620; Заявл. 13.10.2005; Опубл. 15.03.2006. Бюл. №3 (особистий внесок – участь в хіміко-технологічних дослідженнях, оформлення патенту).
	6. Сербін А.Г., Крюкова Я.С. Гістохімічне вивчення вегетативних органів ясена звичайного (Fraxinus excelsior L.) // Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія: Тез. доп. III Міжнар. наук.-практ. конф. Ч.I – Х.: Вид-во НФаУ, 2003. –С.33.
	7. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Дослідження анатомічної будови листя рослин роду Ясен – перспективної лікарської сировини // Перспективи створень в Україні лікарських препаратів різної спрямованості дії: Тез. доп. Всеукр. наук.-практ. семінару – Х.: Вид-во НФаУ, 2004. –С.233.
	8. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Дослідження морфолого-анатомічної будови кори ясена звичайного – перспективної лікарської сировини // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: Тез. доп. VI Нац. з′їзду фармац. України – Х.: Вид-во НФаУ, 2005. –С.717.
	9. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Визначення елементного складу органів ясена звичайного в порівнянні з грунтом та одержаними густими екстрактами // Ліки та життя: Тез II міжнар. мед.-фармац. конгр. – К.: 2005. –С.62.
	10. Кічимасова Я.С., Сердюк Є.В. Розробка субстанцій з ясена звичайного з мембраностабілізуючою дією // Лікувальна косметика: дійсність та майбутнє: Мат. наук.-практ. конф. – Х.: Вид-во НфаУ, 2005. –С.40.
	11. Кичимасова Я.С., Хворост О.П. Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот в свежесобранных и воздушно-сухих листьях ясеня обыкновенного сем. Маслинные // Актуальные проблемы образования, науки и производства в фармации: Тез. мат. науч.-практ. конф. – Ташкент, 2005. –С.148.
	12. Кічимасова Я.С., Хворост О.П. Перспективи розробки лікарських засобів на основі нової сировини – листя та кори ясена звичайного // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Мат. 1-ї міжнар. наук.-практ. конф. – Тернопіль, 2006. –С.38.

# Кічимасова Я.С. Фармакогностичне вивчення ясена звичайного та розробка субстанцій на його основі – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2006.

Вперше в Україні проведено системне фармакогностичне дослідження сировини ясена звичайного та показано перспективність створення на його основі лікарських форм різної спрямованості дії. Встановлено, що листя та кора ясена звичайного є перспективними видами сировини. З листя та кори виділено в індивідуальному стані 19 сполук. З листя ясена звичайного вперше виділено 4 речовини, з кори ясена звичайного вперше виділено 5 речовин. Вперше визначено кількісний вміст жирних кислот, макро- та мікроелементів, суми органічних кислот та ряду груп фенольних сполук в сировині та субстанціях ясена звичайного. Визначено технологічні параметри сировини, розроблено оптимальні технології отримання густих екстрактів з листя та кори ясена звичайного, встановлено показники сировини та отриманих субстанцій необхідні для їх стандартизації. Встановлено антимікробну, цитотоксичну, мембраностабілізуючу, сперміцидну дію отриманих субстанцій, їх здатність підвищувати клітинний імунітет. Вперше розроблено проекти АНД на кору та густий екстракт кори. Оформлено технологічний регламент отримання густого екстракту кори ясена звичайного.

**Ключові слова:** ясен звичайний, фармакогностичне вивчення, БАР, густі екстракти листя та кори, антимікробна, цитотоксична, мембраностабілізуюча, сперміцидна дія, підвищення клітинного імунітету.

**Кичимасова Я.С. Фармакогностическое изучение ясеня обыкновенного и разработка субстанций на его основе** – Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2006.

 Впервые проведено системное фармакогностическое исследование ясеня обыкновенного и показана перспективность создания лекарственных форм различной направленности действия на его основе.

 Установлено, что листья и кора ясеня обыкновенного накапливают производные гидроксибензойной кислоты, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества, что определяет их перспективность в медицине, как источника биологически активных веществ.

Из листьев и коры ясеня обыкновенного выделено в индивидуальном состоянии 19 веществ: полиол, производное гидроксибензойной кислоты, производное гидроксикоричного спирта, 3 производных гидроксикоричной кислоты, 7 производных бензо-α-пирона, 6 производных 2-фенилбензо-γ-пирона. Из них впервые для листьев и коры ясеня обыкновенного выделено 9 веществ. Из листьев – 4 вещества: элеутерозид В, изофраксетин, кемпферол, кверцитин. Из коры – 5 веществ: галловая кислота, п-кумаровая кислота, хлорогеновая кислота, цихорин, скополетин.

 Проведено определение количественного содержания жирных кислот, суммы каротиноидов и хлорофиллов в липофильных фракциях листьев, коры и семян ясеня обыкновенного. Определен ряд числовых показателей полученных липофильных фракций: относительная плотность, показатель преломления, кислотное число, число омыления, эфирное число и йодное число.

**В сырье и субстанциях ясеня обыкновенного определено количественное содержание макро- и микроэлементов, суммы органических кислот и аскорбиновой кислоты, суммы окисляемых фенолов, элеутерозида В, суммы гидроксикоричных кислот, флавоноидов, катехинов и дубильных веществ.**

 Впервые определены технологические параметры листьев и коры ясеня обыкновенного, выбраны оптимальные растворители для экстракции биологически активных веществ сырья ясеня обыкновенного, определено оптимальное соотношение сырье-экстрагент, установлен оптимальный температурный режим экстракции сырья и кратность сливов экстрагента. На основе полученных данных были разработаны технологии получения густых экстрактов из листьев и коры ясеня обыкновенного. Установлены числовые показатели полученных субстанций.

Определены показатели для стандартизации листьев, коры, густых экстрактов листа и коры ясеня обыкновенного. Впервые разработаны проекты АНД на кору и густой экстракт коры ясеня обыкновенного.

 Исследования, проведенные на базе института микробиологии и иммунологии им.И.И.Мечникова АМН Украины под руководством ст. науч. сотр., д.ф.н. А.В.Мартынова и д.мед.н. Т.И.Коляды, а также на базе кафедры физиологии НФаУ, под руководством д.биол.н., проф. Л.Н.Малоштан показали, что густые экстракты листьев и коры ясеня обыкновенного обладают антимикробным, цитотоксическим, мембраностабилизирующим, спермицидным действием, повышают клеточный иммунитет.

Оформлен технологический регламент получения густого экстракта коры. Технология получения густого экстракта коры апробирована в условиях ООО «Фармацевтическая кампания «Здоровье». Новизна полученной субстанции подтверждена декларационным патентом на полезную модель №13236 U “Способ получения комплекса биологически активных веществ с противомикробным и мембраностабилизирующим действием”.

 **Ключевые слова:** ясень обыкновенный, фармакогностическое изучение, БАВ, густые экстракты листа и коры, антимикробное, цитотоксическое, мембраностабилизирующее, спермицидное действие, повышение клеточного иммунитета.

**Kichimasova Ya.S. Pharmacognostical study of ash tree (Fraxinus excelsior L.)** **and development of substances on its basis. Manuscript.** Thesis for a Candidate Degree by speciality 15.00.02 – Pharmaceutical chemistry and Pharmacognosy. National University of Pharmacy, Kharkiv, 2006.

 For the first time in Ukraine systemate pharmacognostical stady of ash tree (f. excelsior) raw material has been carried out and worth-while development on its basis medicinal forms of various actions has been shown. It has been established that leaves and bark of ash tree are worth-while kinds of raw material. 19 substances have been extracted from its leaves and bark in individual state. 4 substances have been extracted from ash tree leaves the first time. 5 substances have been extracted from ash tree bark for the first time. Quantitative content of fatty acids, macro- and microelements, ascorbic acid, sum of organic acids and series of phenolic compounds in raw material and substances of ash tree have been established for the first time. Technological parameters of raw materials have been distinguished, optimal technologies for receiving dense extracts of leaves and bark of ash tree have been developed, indications of raw material and received substances needed for standardization have been established. It has been distinguished that received substances show antimicrobial, citotoxic, membrane stabilizing, spermicidal action, increase cell immunity. Project of analytical nominative documentation for bark and dense extract of bark have been developed for the first time. Technological time-limit for receiving of dense bark extract of ash tree.

**Key words:** ash tree, pharmacognostical study, biological active substances, dense extracts of bark and leaves, antimicrobial, citotoxic, membrane stabilizing, spermicidal action, increase cell immunity

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