

На правах рукописи

Павленко Ксения Сергеевна

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЫЖИКА ОЗИМОГО
(*CAMELINA SILVESTRIS*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2014

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, профессор
Куркин Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

Абдуллина Светлана Геннадьевна, доктор фармацевтических наук, доцент, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии с курсом аналитической и токсикологической химии, профессор

Буланова Анджела Владимировна, доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный университет», кафедра физической химии и хроматографии, профессор

Ведущая организация: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «06» июня 2014 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России (г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте ГБОУ ВПО СамГМУ (<http://www.samsmu.ru/science/referats/2014/Pavlenko>).

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время заслуживают внимания растения, имеющие пищевое и народно-хозяйственное значение, опыт применения которых в народной медицине дает основание считать перспективным их детальное изучение с целью получения лекарственных препаратов. Широко известны преимущества фитопрепаратов перед синтетическими, поэтому интерес к субстанциям растительного происхождения на сегодняшний день высок (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2007; Самылина И.А. и др., 2003; 2010). Немаловажными аспектами, влияющими на доступность и экономическую целесообразность получения препаратов на основе растительного сырья, являются масштабность культивирования растений на территории Российской Федерации, а также их устойчивость к различным климатическим условиям. В этом плане, среди растений, вызывающих несомненный интерес, особого внимания заслуживает рыжик озимый (*Camelina silvestris* L.).

Рыжик озимый – масличное растение, относящееся к семейству Крестоцветные (*Brassicaceae*). В настоящее время растение культивируется с целью получения жирного масла семян. Благодаря своему уникальному составу этот продукт нашел применение в технике, мыловарении, пищевой промышленности, народной медицине.

Основными зонами возделывания рыжика являются Сибирь, Республика Мордовия, Оренбургская и Пензенская области. На сегодняшний день рыжик озимый не входит в номенклатуру официального лекарственного растительного сырья Российской Федерации и зарубежные Фармакопеи.

Недостаточная степень изученности химического состава семян, надземной части, жирного масла рыжика препятствует внедрению в научную медицину, а также получению и применению препаратов на основе лекарственного сырья.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является фармакогностическое изучение рыжика озимого, культивируемого в Самарской области, а также обоснование внедрения в медицинскую практику нового вида лекарственного растительного сырья «Рыжика озимого семена» и жирного масла данного растения.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1) проведение анализа литературных данных современного состояния исследований рыжика озимого;
- 2) сравнительное анатомо-морфологическое исследование плодов и семян рыжика озимого;
- 3) сравнительное изучение химического состава плодов, семян, травы рыжика озимого, культивируемого в Самарской области;
- 4) выделение и идентификация доминирующих компонентов из надземной части рыжика озимого;
- 5) разработка методик качественного анализа и количественного определения суммы флавоноидов в надземной части рыжика озимого;
- 6) изучение жирно-кислотного состава масла семян рыжика, культивируемого на территории Самарской области;
- 7) обоснование технологии получения лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» (1:5);
- 8) разработка методов стандартизации лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» (1:5) и масла семян рыжика;
- 9) оценка диуретической активности настоя и настойки семян рыжика озимого;
- 9) разработка проектов фармакопейных статей на новый вид лекарственного растительного вида сырья - «Рыжика озимого семена», а также «Рыжика семян жирное масло».

Научная новизна. Впервые проведено анатомо-морфологическое исследование плодов и семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области. Установлены диагностические признаки сырья, среди которых наибольшее значение имеют: строение семенной кожуры, а именно: наличие мелких щелевидных тонкостенных клеток со щелевидными полостями, в которых накапливаются крахмальные зерна; локализация слизи в клетках эпидермиса семян; наличие жирного масла в виде капель в семядолях, а также особый характер утолщения оснований ослизняющихся клеток поверхности, представляющий собой окружность.

Впервые проведено фармакогностическое изучение рыжика озимого, культивируемого в Самарской области, в результате чего обоснована целесообразность расширения сырьевой базы для использования в качестве нового вида ЛРС. На основании сравнительного исследования различных органов рыжика установлено наличие флавоноидов в траве, плодах, семенах

рыжика, что свидетельствует о целесообразности комплексного использования данного растения.

Впервые с использованием колоночной хроматографии, ^1H -ЯМР-, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов химических превращений из семян рыжика выделены и идентифицированы доминирующие флавоноиды - нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), изорамнетин, никотифлорин (3-О-рутинозид кемпферола), кемпферол.

Методом газовой хроматографии изучен жирно-кислотный состав масла семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области. Впервые идентифицированы 13 жирных кислот, среди которых доминирующими оказались линоленовая (30,7%), линолевая (20,6%), олеиновая (17,6%) кислоты. Впервые в жирном масле рыжика озимого определены эйкозодиеновая, докозодиеновая и селасоевая кислоты. Разработаны методы стандартизации жирного масла рыжика озимого.

Разработана методика определения кислотного числа жирного масла рыжика озимого (удостоверение на рационализаторское предложение №260 от 11.06.2013 г. «Методика определения кислотного числа жирного масла рыжика озимого»).

Проведены фармакологические исследования настоя и настойки (1:5) семян рыжика озимого. Установлено наличие диуретического эффекта настоя в дозе 50 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки за 4 и 24 часа. Проведенные исследования позволяют говорить о перспективе применения препаратов на основе семян рыжика в качестве фитодиуретиков.

Практическая значимость. Полученные результаты позволили расширить представления о морфолого-анатомических признаках, химическом составе и биологической активности надземной части рыжика озимого.

Для установления подлинности сырья рыжика разработана методика качественного анализа семян рыжика методом тонкослойной хроматографии с использованием в качестве растворов сравнения РСО нарциссина, никотифлорина (3-О-рутинозида кемпферола), изорамнетина и кемпферола.

Обоснована также целесообразность использования для целей идентификации спектрофотометрия (максимум поглощения при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 256 \pm 2 \text{ нм}, 362 \pm 2 \text{ нм}$).

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого в пересчете на рутин (методом спектрофотометрии с использованием реакции комплексообразования с алюминия хлоридом).

Изучены показатели качества нового вида ЛРС, включая содержание суммы флавоноидов, а также характеристики жирного масла рыжика озимого.

В результате морфолого-анатомического исследования выявлены диагностические признаки для определения подлинности сырья, установлены показатели качества сырья. Материалы аналитических и морфолого-анатомических исследований включены в проекты ФС «Рыжика озимого семена», «Рыжика семян жирное масло», направленные в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания.

Разработана технология получения лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» (1:5). Изучены его показатели качества, предложены методы их оценки.

Результаты диссертационных исследований используются в учебном процессе на кафедрах фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, фармацевтической технологии, химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, ЗАО «Самаралектравы» (п. Антоновка), ГНУ «Самарский НИИ сельского хозяйства РАСХН им. Н.М. Тулайкова (п. Безенчук), ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (г. Самара).

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты морфолого-анатомических исследований плодов и семян рыжика озимого, включая установленные диагностические признаки сырья.
2. Результаты сравнительного изучения химического состава плодов, семян, травы рыжика озимого, культивируемого в Самарской области.
3. Результаты выделения и определения доминирующих компонентов из надземной части рыжика озимого.
4. Результаты разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого.
5. Результаты изучения физико-химических характеристик и жирно-кислотного состава масла семян рыжика, культивируемого на территории Самарской области.

6. Результаты разработки технологии получения лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» (1:5), методов его стандартизации.
7. Результаты исследования диуретической активности настоя и настойки рыжика.
8. Результаты исследований и обоснование показателей качества семян с целью стандартизации сырья «Рыжика озимого семена».
9. Результаты исследований и обоснование показателей качества жирного масла с целью стандартизации и разработки проекта ФС «Рыжика семян жирное масло».

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены и обсуждены на Всероссийских конференциях с международным участием «Молодые ученые – медицине» «Аспирантские чтения (г. Самара, 2012; 2013); II Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молодежь и наука: Модернизация и инновационное развитие страны» (Пенза, 2012); I Международной интернет-конференции «Современные тенденции в сельском хозяйстве» (Казань, 2012); Международной виртуальной интернет-конференции «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы» (Казань, 2013), V Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы использования природных ресурсов России» (г. Самара, 2013); XVIII Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека» (Самара, 2013).

Личный вклад автора. Автор принимал участие в выборе направления исследования, постановке целей и задач. Диссертантом проведен информационно-аналитический поиск результатов современных исследований по изучению объектов; выполнены анатомо-морфологические, химические, аналитические, фармакологические исследования. Автором разработаны методики качественного и количественного анализа сырья, методики стандартизации предложенных субстанций. Автором разработаны проекты ФС «Рыжика озимого семена», «Рыжика семян жирное масло». Под руководством научного руководителя осуществлен анализ полученных экспериментальных данных, проведена статистическая обработка результатов, сделаны выводы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Результаты диссертационной работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 3 и 6 паспорта специальности.

Связь задач исследования с планами научной работы. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ Гос. регистрации 01200900568).

Публикации. Основные результаты диссертационных исследований отражены в 18 научных работах, из них 7 - в изданиях, включенных в Перечень журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, характеризующей материалы и методы исследования, экспериментальной части (четырёх глав), общих выводов, списка литературы и приложений. В тексте содержится 12 таблиц, 44 рисунка. Список цитируемой литературы включает 142 источника, из них 12 – на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, поставлены цели и задачи исследования, показаны научная и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе (обзоре литературы) приведены сведения, отражающие современное состояние изучения рыжика озимого, его ботаническое описание, народно-хозяйственное значение. Обоснована актуальность выбора объектов и направлений проведения настоящего исследования.

Во второй главе приведена характеристика объектов и методов исследований.

Материалы третьей главы отражают результаты морфолого-анатомического строения плодов и семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области.

В четвертой главе представлены материалы фитохимического исследования сырья рыжика озимого, методики выделения и идентификации доминирующих флавоноидов надземной части рыжика озимого, а также результаты по изучению динамики накопления флавоноидов в различные фазы вегетации растения.

В пятой главе приведены данные по изучению физико-химических констант, а также жирно-кислотного состава масла семян рыжика озимого методом газовой хроматографии.

Материалы шестой главы отражают результаты исследований по стандартизации лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» (1:5), а также фармакологических экспериментов, направленных на изучение диуретической активности препарата.

В Приложении приводятся материалы, подтверждающие практическую значимость проведенных исследований (проекты фармакопейных статей «Рыжика озимого семена», «Рыжика семян жирное масло», акты внедрения, рационализаторское предложение).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили:

1. Образцы травы, семян, плодов рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.), культивируемого в ГНУ «Самарский НИИ сельского хозяйства РАСХН им. Н.М. Тулайкова (п. Безенчук);
2. Рыжик озимый, культивируемый на фармакопейном участке кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ Ботанического сада Самарского государственного университета;
3. Водно-спиртовые извлечения из воздушно-сухого сырья (травы, цветков, стеблей, семян, плодов) рыжика озимого;
4. Жирное масло семян рыжика озимого;
5. Промышленный образец жирного масла рыжика озимого «Сарепта» (ТУ 9141-003-10513491-03), «Кронос-оил» (ТУ У 15.4-32448339-001:2007);
6. Настойка семян рыжика озимого;
7. Государственный стандартный образец (ГСО) рутина (ФС 42-2508-87);
8. Нарциссин, никотифлорин, изорамнетин, кемпферол, впервые выделенные из травы рыжика озимого.

В ходе выполнения диссертационных исследований использовались современные методы анализа. Микроскопическое исследование плодов и семян рыжика выполнялось при использовании цифровых микроскопов Motic DM-39C-N9GO-A и Motic DM111 (возможности увеличения 20, 40 и 40, 100, 400, 1000 соответственно). В ходе фитохимических исследований использовались спектральные (УФ-, ^1H -ЯМР-спектроскопия (спектрометр «Bruker AM 300»

(300 МГц), масс-спектрометрия (масс-спектрометр «Kratos MS-30»)) методы, метод тонкослойной хроматографии (на пластинках «Сорбфил ПТСХ-ПА-А-УФ» ТУ 26-11-17-89, зернение 5-17 мкм, тип сорбента – силикагель СТХ-1А, Россия) и колоночной хроматографии. Жирно-кислотный состав жирного масла изучали с помощью метода газовой хроматографии на газовом хроматографе «Кристалл 5000. В ходе исследования использовали капиллярную кварцевую колонку HP-FFAP длиной 50 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной фазы 0,32 мкм. Подготовленную согласно ГОСТ 51486-99 анализируемую пробу в объеме 1 мкл вводили в испаритель газового хроматографа. Газом-носителем являлся азот, скорость потока – 1 мл/мин. Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных. Статистическая обработка экспериментальных данных исследований (P=95%) проведена с помощью программ StatSoft Statistica 6.0, Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения в соответствии с ГФ СССР XI издания.

2. Анатомо-морфологическое исследование плодов, семян и порошка семян рыжика озимого

В рамках диссертационных исследований нами проведены анатомо-морфологические исследования плодов, семян и порошка семян рыжика озимого. Впервые изучены диагностические признаки семян данного растения, культивируемого в Самарской области и используемых для получения жирного масла. В качестве диагностических признаков для семян рыжика озимого предложены: наличие мелких щелевидных тонкостенных клеток со щелевидными полостями, в которых накапливаются крахмальные зерна; локализация слизи в клетках эпидермиса семян; наличие жирного масла в виде капель в семядолях; а также особый характер утолщения оснований ослизняющихся клеток поверхности, представляющий собой окружность (рис. 1). Результаты проведенных исследований включены в раздел «Микроскопия» разработанной фармакопейной статьи на новый вид сырья «Рыжика озимого семена».

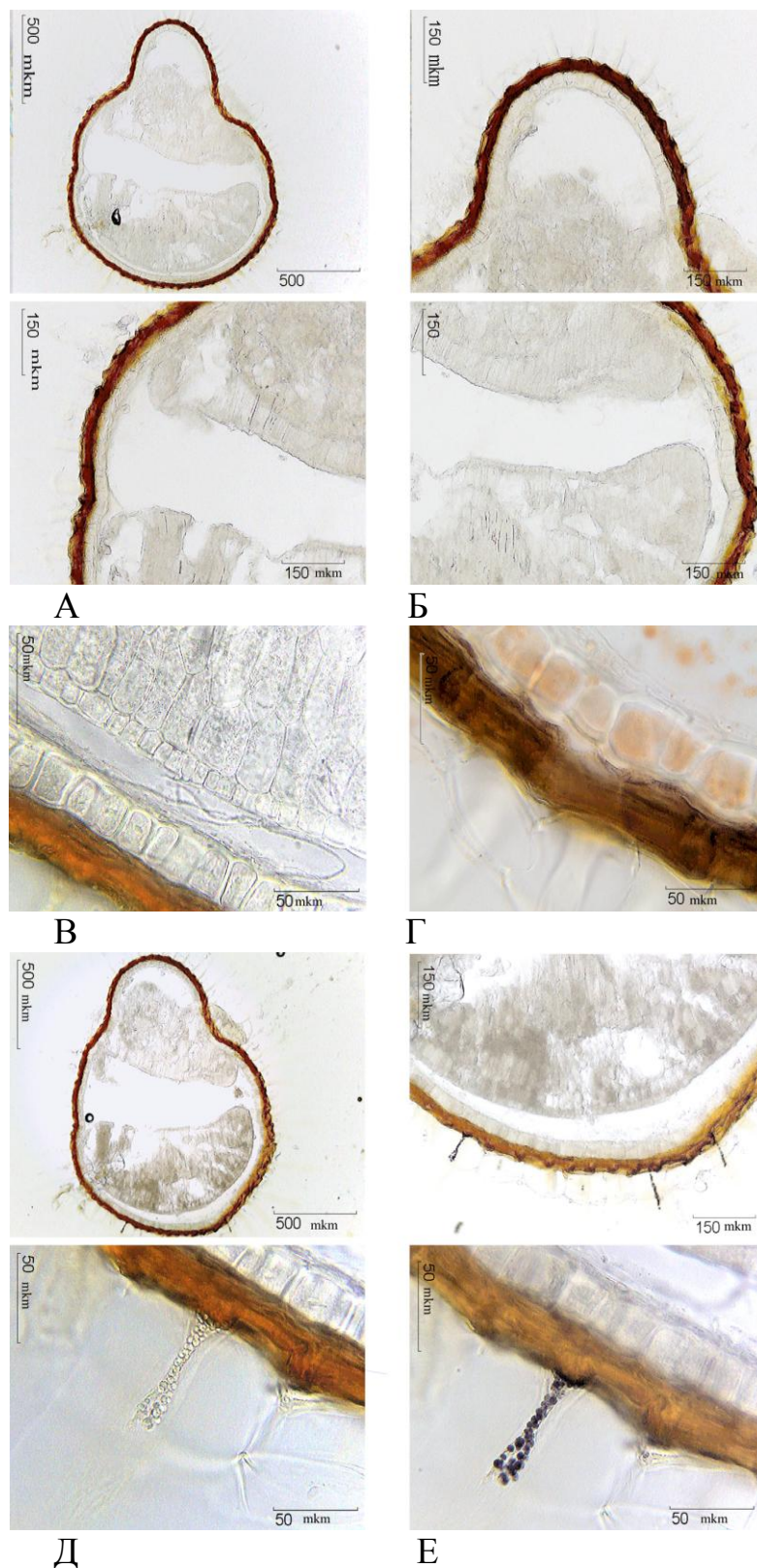


Рис. 1. Диагностические признаки семян ржи озимого

Обозначения: А, Б - Семя ржи. Поперечное сечение. Общий вид (x40). Фрагмент зародыша (x100); В, Г - Фрагмент эндосперма семени и прилегающих тканей. Поперечное сечение (x400); Фрагмент эндосперма, окраска раствором Судана III; Д, Е - Локализация крахмальных зерен в семенах ржи. Поперечное сечение. Окраска раствором Люголя

3. Фитохимическое исследование сырья рыжика озимого

В настоящем разделе приводятся данные сравнительного анализа компонентного состава надземной части рыжика озимого, проведенного методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии, ЯМР- и масс-спектрометрии.

3.1. Сравнительное исследование различных органов рыжика озимого

В ходе исследования анализировались извлечения из стеблей, листьев, цветков, плодов, семян рыжика, полученные экстрагированием 50% этиловым спиртом. Методом ТСХ проведен их фитохимический анализ. Хроматографическое исследование полученных извлечений показало, что наилучшее разделение комплекса соединений на используемых хроматографических пластинках достигается в системе хлороформ: этанол: вода 26:16:3 (рис. 2).

Для обнаружения веществ хроматограмму просматривали в видимом свете, УФ-свете (254 и 366 нм) и после проявления с раствором диазобензолсульфокислоты. При обработке реактивом хроматографические пластинки нагревали при температуре 110 С° в течение 5 минут в сушильном шкафу. Результаты качественного анализа методом ТСХ показали: на хроматограмме во всех образцах сырья обнаруживается нарциссин в виде доминирующего пятна желто-оранжевого цвета с величиной R_f около 0,4 (пятно D). При просмотре хроматограммы в УФ-спектре при длине 254 нм 3-О-рутинозид изорамнетина обнаруживается в виде доминирующего пятна с ярко-фиолетовой флуоресценцией. Менее заметны и вместе с этим значимыми были другие пятна. Предположительно, с учетом данных научной литературы, пятно С соответствует никотифлорину, А – кемпферолу, В – изорамнетину (рис. 2).

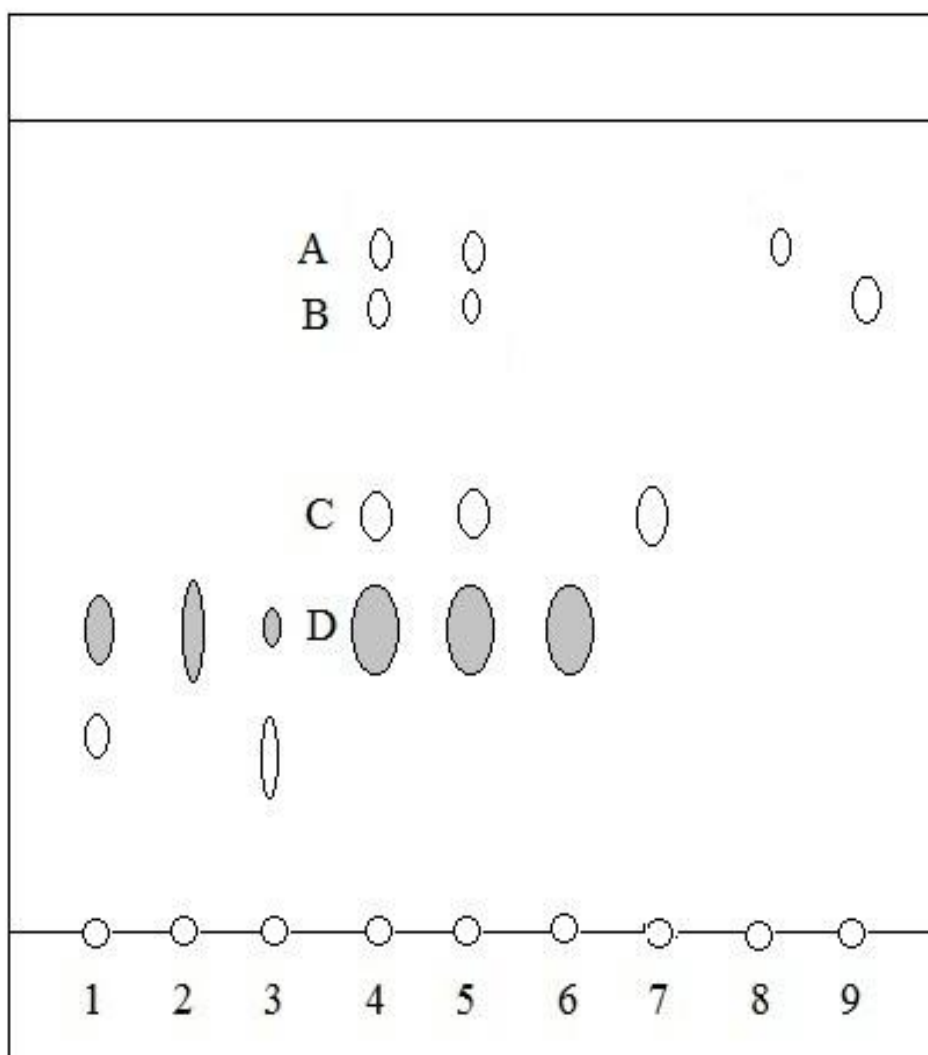


Рис. 2. Схема хроматограммы различных органов рыжика озимого (в системе хлороформ: спирт этиловый: вода 26:16:3)

Обозначения: 1 – извлечение из стеблей рыжика озимого; 2 – извлечение из листьев; 3 – извлечение из цветков; 4 – извлечение из плодов; 5 – извлечение из семян; 6 – раствор нарциссина; 7 – раствор никотифлорина (3-О-рутинозида кемпферола); 8 – раствор кемпферола; 9 – раствор изорамнетина.

На основе результатов хроматографического исследования органов надземной части растения (стебли, листья, цветки, плоды, семена) выявлено присутствие флавоноидов, в частности, нарциссина, как доминирующего компонента, во всех сравниваемых органах, а также еще трех веществ флавоноидной природы. Принимая во внимание высокое содержание флавоноидов в семенах рыжика, а также тот факт, что семена в настоящее время являются сырьем для получения жирного масла, нами были проведены исследования по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в семенах изучаемого растения.

3.2. Изучение флавоноидного состава семян рыжика озимого

3.2.1. Выделение и идентификация доминирующих компонентов из надземной части рыжика озимого

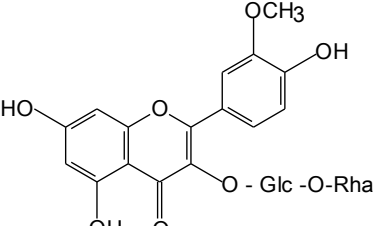
Измельченные (0,3 мм) семена рыжика озимого (150 г) экстрагировали десятикратным объемом 50% этилового спирта, сочетая при этом способ мацерации (24 ч) с последующей термической экстракцией при температуре кипения растворителя. Полученный продукт упаривали на ротаторном испарителе под вакуумом при температуре 40-60 °С. Сгущенный экстракт выдерживали при температуре 8 °С течение 2 суток, затем высушивали на силикагеле L 40/100 (30 г). Препаративное разделение экстрактивных веществ осуществляли методом адсорбционной колоночной хроматографии с использованием силикагеля L 40/100 и полиамида «Woelm». Контроль за разделением осуществляли с помощью ТСХ-анализа.

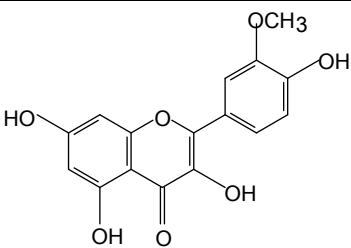
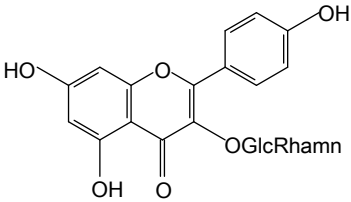
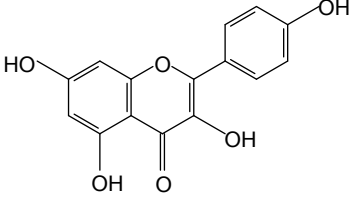
В результате хроматографического разделения веществ и последующей очистки рехроматографией и перекристаллизацией выделены вещества флавоноидной природы. Для изучения выделенных флавоноидов были использованы спектральные методы анализа (УФ-, ¹H-ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия), метод тонкослойной хроматографии, а также результаты химических превращений. Полученные в результате исследования данные позволяют идентифицировать вещества, как нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), никотифлорин (3-О-рутинозид кемпферола), изорамнетин, кемпферол (табл. 1).

Установлено, что доминирующим флавоноидом семян рыжика озимого является нарциссин, впервые описанный для данного растения, культивируемого в Самарской области.

Таблица 1

Флавоноиды семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области

№ п/п	Название	Химическая формула	Физико-химические характеристики
1	Нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина)		$\lambda_{\max}$ EtOH: 257, 268 пл., 358 нм; $\lambda_{\max}$ EtOH+AlCl ₃ : 268, 276 пл., 403 нм

2	Изорамнетин		$\lambda_{\max}$ EtOH: 256, 271 пл., 373 нм; $\lambda_{\max}$ EtOH+AlCl ₃ : 262, плечо 273 пл., 360, 429 нм
3	Никотифлорин (3-О- рутинозид кемпферол)		$\lambda_{\max}$ EtOH: 266, 355 нм; $\lambda_{\max}$ EtOH+AlCl ₃ : 274, 304, 345, 394 нм
4	Кемпферол		$\lambda_{\max}$ EtOH: 267, 369 нм; $\lambda_{\max}$ EtOH+AlCl ₃ : 229, 269, 370, 426 нм

3.2.2. Количественное определение суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого

В ходе исследований была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого. В основу методики положено дифференциальное спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Так как основной компонент извлечений – нарциссин и государственный стандартный образец рутина имеют сходное химическое строение и спектральные характеристики, предложено осуществлять пересчет содержания суммы флавоноидов на рутин. Принимая во внимание спектр данного флавоноида, нами в качестве аналитической длины волны рекомендовано значение 412 нм (дифференциальная спектрофотометрия) (рис. 3).

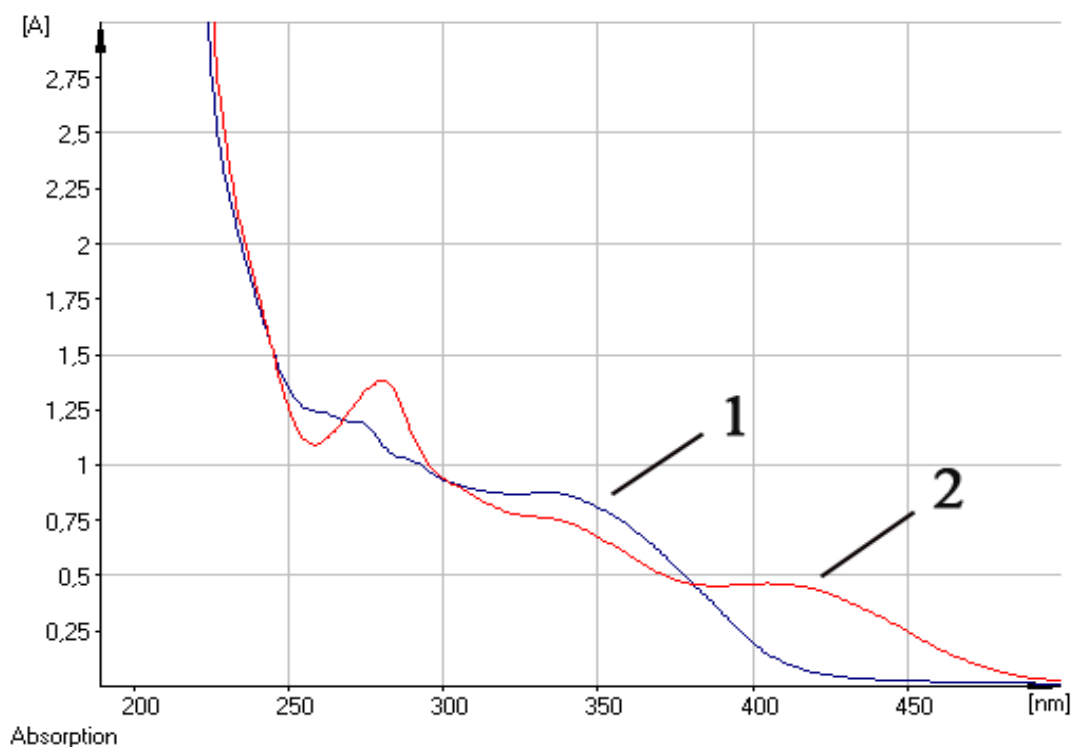


Рис. 3. УФ - спектры водно-спиртового раствора семян рыжика озимого (1), водно-спиртового раствора семян рыжика озимого в присутствии алюминия хлорида (2)

Методика количественного определения суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого. В колбу со шлифом вместимостью 50 мл помещают около 1 г (точная навеска) измельченного сырья (пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм), приливают 50 мл спирта 50% и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 50% до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

2 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% раствора хлорида алюминия в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты, доведенной до метки 95% этиловым спиртом в мерной колбе, вместимостью 25 мл (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 412 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО рутина при длине волны 412 нм, приготовленного по аналогии с испытуемым раствором.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 412 нм через 40 мин после приготовления всех растворов. Содержание суммы флавоноидов в

пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * m_0 * 50 * 1 * 25 * 100 * 100}{D_0 * m * 50 * 1 * 25 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса ГСО рутин, г.;

W – влажность сырья, %.

Таблица 2

Метрологические характеристики методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого, культивируемого в Самарской области

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	0,57	0,0121	95	2,23	0,027	$\pm 4,23$

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в образцах семян варьирует в пределах от 0,30 до 0,41 %. Ошибка метода составляет 4,23%.

Раздел, касающийся количественного определения суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого включен нами в Проект ФС «Рыжика озимого семена», направленный в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания.

4. Исследование жирно-кислотного состава жирного масла семян рыжика озимого

С целью расширения перспективы применения в медицине масла рыжика были проведены исследования по глубокому изучению его жирно-кислотного состава, а также физико-химических характеристик.

Определение жирно-кислотного состава масла осуществляли методом газовой хроматографии по времени выхода метиловых эфиров соответствующих жирных кислот (рис. 4). Общее время анализа составляло 2 часа с детектором по ионизации пламени. Полученные в ходе эксперимента значения сравнивали с результатами экспериментальных данных по времени удерживания, полученных при газохроматографическом анализе стандартов веществ, в качестве которых использовали смесь метиловых эфиров высших жирных кислот марки Supelco 37 Comp. FAME Mix 10 mg/ml in CH_2Cl_2 47885-U (США).

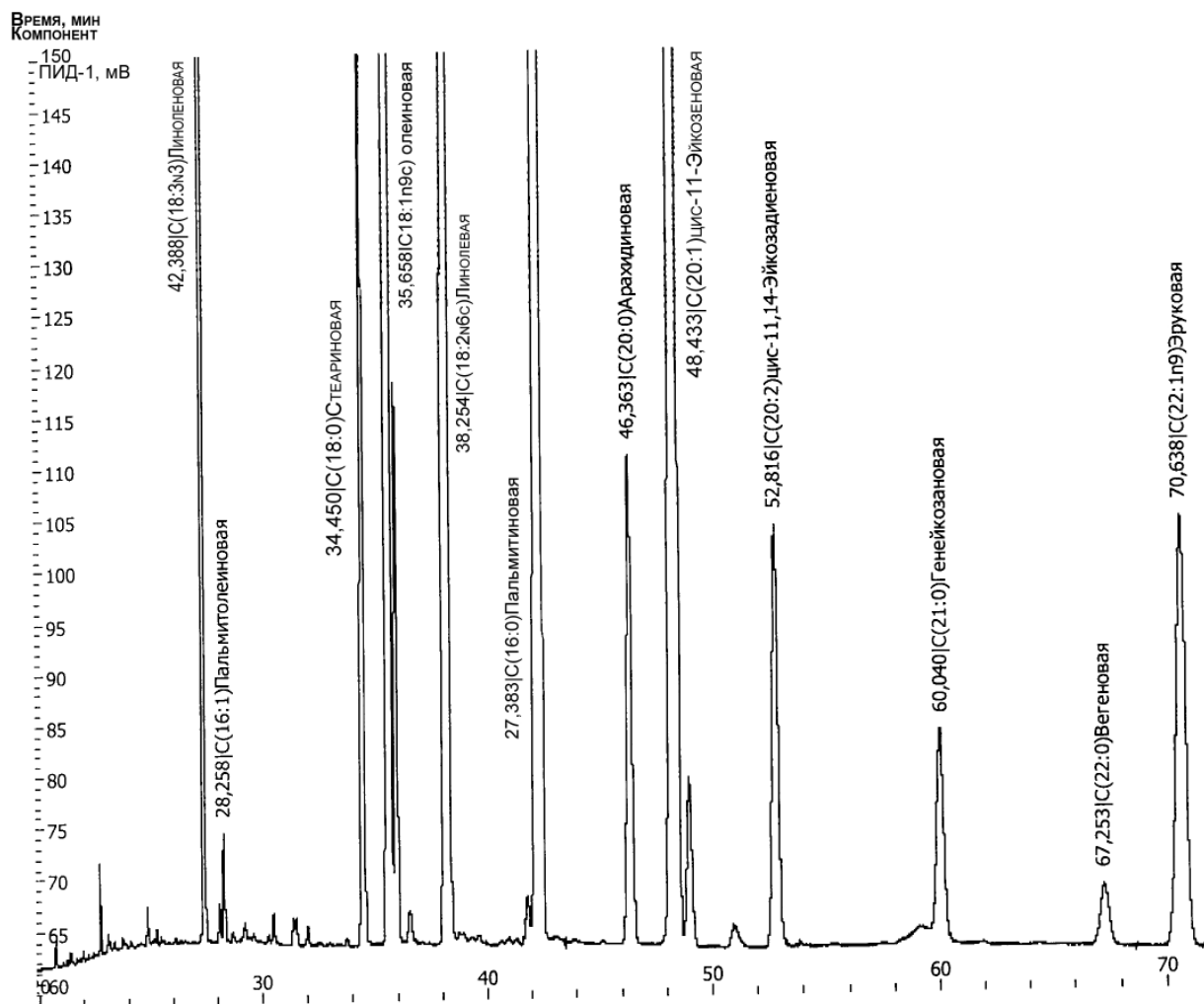


Рис. 4. Хроматографический профиль гексановых экстрактов метиловых эфиров жирного масла семян рыжика озимого

С помощью метода газовой хроматографии в масле рыжика озимого идентифицированы 13 кислот. Доминирующими являются линоленовая (30,7%), линолевая (20,6%), олеиновая (17,6%) кислоты. Впервые в жирном масле рыжика озимого определены эйкозодиеновая, докозодиеновая и селакоевая кислоты.

В ходе исследований определены физико-химические характеристики (йодное число, эфирное число, перекисное число, число омыления, индекс окисленности) жирного масла семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области и проведен сравнительный анализ со значениями аналогичных характеристик промышленного образца ООО "Кронос-МК", г. Чернигов, Украина (ТУ У 15.4-32448339-001:2007). Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Значения рекомендованных

нами физико-химических констант масла семян рыжика включены в Проект ФС «Рыжика семян жирное масло».

5. Разработка методов стандартизации лекарственных препаратов на основе сырья рыжика озимого

Повышенный интерес к отечественным препаратам на основе лекарственного растительного сырья указывает на необходимость расширения номенклатуры официальных лекарственных растений, а также создания препаратов на их основе.

В результате проведенных исследований предложен флавоноидный препарат «Рыжика озимого семян настойка», а также разработаны методики его стандартизации, основанные на определении суммы флавоноидов, методами ТСХ-анализа и спектрофотометрии.

Основным методом качественного анализа настойки рыжика нами предложено использовать метод тонкослойной хроматографии. Данные ТСХ-анализа свидетельствуют о сопоставимости качественного состава исходного сырья и готового продукта, а также о пригодности разработанной методики для целей идентификации.

С целью унификации подходов к стандартизации данного препарата использованы подходы к анализу, разработанные для семян рыжика озимого. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в препарате «Рыжика озимого семян настойка» методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 412 нм в пересчете на рутин.

Таблица 3

Метрологические характеристики спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в препарате «Рыжика озимого семян настойка»

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	0,08	0,0013	95	2,23	0,0030	$\pm 3,78$

Содержание суммы флавоноидов в настойке варьирует от 0,05 % до 0,08% в зависимости от места культивирования рыжика озимого и года сбора сырья.

Результаты приведенных выше исследований являются обоснованием к использованию сырья рыжика озимого не только как пищевой культуры, но и в качестве источника получения препаратов на его основе. Использование на

практике предложенных подходов к стандартизации сырья позволит осуществлять безотходное производство при переработке рыжика.

6. Изучение диуретической активности лекарственного препарата

«Рыжика озимого семян настойка» и настоя рыжика

Для оценки влияния экстрагента лекарственной формы на степень фармакологического эффекта нами было принято решение подвергнуть исследованию препарат «Рыжика озимого семян настойка» на 40% спирте этиловом в сравнении с настоем семян рыжика в дозах 50 и 100 мг/кг – за 4 и 24 часа эксперимента. В работе изучалось действие указанных препаратов на выделительную функцию почек. В ходе исследований при однократном внутрижелудочном введении настойки рыжика в дозах 50 и 100 мг/кг за 4 и 24 часа эксперимента нами не отмечено диуретической активности препарата. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших исследований, направленных на поиск иных фармакологических эффектов лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка».

Введение настоя семян рыжика в дозе 50 мг/кг за 4 часа эксперимента привело к увеличению диуреза в опытной группе животных на 18% по сравнению с показателями у животных контрольной группы ($p < 0,05$). По истечении суток тот же препарат в аналогичной дозе привел к возрастанию почечной экскреции на 12%.

Настой семян рыжика в дозе 100 мг/кг проявил себя иначе: способствовал достоверному угнетению диуреза на 21% - за 4 часа эксперимента ($p < 0,05$). Эта же доза, спустя 24 часа от начала эксперимента, привела к снижению выведению почками воды на 29%.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют отнести настой семян рыжика к препаратам с быстрым развитием диуретического эффекта и короткой продолжительностью действия. В дозе 50 мг/кг препарат вызывал увеличение диуреза на 18% ($p < 0,05$). В дозе 100 мг/кг за счет более высокого содержания действующих веществ изучаемый препарат проявил антидиуретическое действие. Настойка рыжика 1:5 на 40% спирте этиловом не оказала искомого фармакологического эффекта. В этой связи, при использовании настоя рыжика в качестве диуретического средства представляется актуальной оптимизация дозировки. Кроме того, при внедрении диуретических препаратов на основе рыжика необходимо учитывать

еще и вид экстрагента, влияющий на компонентный состав лекарственного препарата.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате впервые проведенного анатомо-морфологического исследования плодов и семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области, выявлены морфолого-анатомические особенности строения исследуемых органов растения, а именно: наличие в семенной коже мелких щелевидных тонкостенных клеток со щелевидными полостями, в которых накапливаются крахмальные зерна; локализация слизи в клетках эпидермиса семян; наличие жирного масла в виде капель в семядолях; а также особый характер утолщения оснований ослизняющихся клеток поверхности, представляющий собой окружность. Использование результатов данных исследований на практике позволит эффективно проводить диагностику сырья (плоды, семена).
2. В ходе изучения химического состава рыжика озимого, культивируемого в Самарской области, впервые выделено четыре индивидуальных флавоноида: нарциссин, никотифлорин, изорамнетин, кемпферол, идентификация которых осуществлялась с помощью УФ-, ^1H -ЯМР-спектроскопии, результатов химических превращений.
3. Разработаны методики качественного анализа сырья «Рыжика озимого семена», а также методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на ГСО рутин методом дифференциальной спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого варьирует от $0,30 \pm 0,0037$ % до $0,41 \pm 0,0034$ % в зависимости от места культивирования и года сбора.
4. Изучена динамика накопления флавоноидов в надземной части рыжика озимого, при этом установлено, что наибольшее содержание данных биологически активных веществ накапливается в период массового цветения – начала плодоношения.
5. Впервые с помощью метода газовой хроматографии определен жирно-кислотный состав жирного масла семян рыжика озимого, культивируемого в Самарской области. Идентифицированы 13 жирных кислот, среди которых доминирующими оказались линоленовая (30,7%), линолевая (20,6%), олеиновая 17,6%) кислоты. Впервые в жирном масле

рыжика озимого определены эйкозодиеновая, докозодиеновая и селажовая кислоты.

6. Полученные результаты исследований жирно-кислотного состава методом ГЖХ, а также определений физико-химических характеристик жирного масла семян рыжика, культивируемого в Самарской области, включены в ФС «Рыжика семян жирное масло».
7. В ходе исследований разработана методика получения настойки семян рыжика озимого (1:5) на 40% этиловом спирте; а также методика качественного анализа и количественного определения лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» с использованием ТСХ-анализа и спектрофотометрии.
8. Разработана методика количественного анализа лекарственного препарата «Рыжика озимого семян настойка» по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на ГСО рутин методом дифференциальной спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в препарате «Рыжика озимого семян настойка» находится в диапазоне от $0,05 \pm 0,0010$ % до $0,08 \pm 0,0013$ %.
9. Изучены показатели качества нового вида лекарственного растительного сырья «Рыжика озимого семени», а также «Рыжика семян жирное масло», которые включены соответствующие проекты ФС.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Павленко, К.С. Перспективы комплексного использования рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) / К.С. Павленко // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2013. - №1-2. – С. 202-204.
2. Куркин, В.А. Жирно-кислотный состав масла семян рыжика озимого / В.А. Куркин, К.С. Павленко, И.А. Платонов, Л.В. Павлова, А.В. Милехин // **Фармация**. – 2013. - №6. – С. 30-32.
3. Павленко, К.С. Изучение динамики накопления флавоноидов в надземной части рыжика озимого / К.С. Павленко // **Фундаментальные исследования**. – 2013. - №10. – С. 572-574.
4. Куркин, В.А. Определение суммы флавоноидов в семенах рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) / В.А. Куркин, К.С. Павленко // **Традиционная медицина**. - 2012. - №5. С. 254-257.

5. Павленко, К.С. Определение показателей качества жирного масла семян рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) // К.С. Павленко // **Современные проблемы науки и образования**. – 2013. -№ 5; URL: <http://www.science-education.ru/111-10100> (дата обращения: 17.09.2013).
6. Павленко, К.С. Обоснование целесообразности комплексного использования рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) / К.С. Павленко, В.А. Куркин, А.В. Милехин // **Известия Самарского научного центра РАН**. – 2012. – Т. 14. С. 2273-2275.
7. Павленко, К.С. Фармакогностическое исследование рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.), культивируемого в Самарской области / К.С. Павленко // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2013. -№5. – С. 40.
8. Павленко, К.С. Исследование возможности использования ТСХ-анализа в изучении подлинности сырья рыжика озимого / К.С. Павленко // «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны»: сборник материалов II международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых: электронное научн. издание. – ФГУП НТЦ «Информрегистр», Депозитарий электронных изданий. – 2012. С. 295-298.
9. Павленко, К.С. Сравнительное исследование содержания суммы флавоноидов в различных органах рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) / К.С. Павленко // «Молодые ученые – медицине»: сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием. – 2012. - С. 217-219.
10. Павленко, К.С. Перспективы комплексной переработки рыжика озимого, культивируемого в Самарской области / К.С. Павленко, В.А. Куркин, А.В. Милехин, В.В. Зубков // «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции»: сборник научных трудов. – 2013. выпуск 68. – С. 74-76.
11. Павленко, К.С. Проблема поиска новых источников флавоноидов в растительном сырье / К.С. Павленко // «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям»: сборник материалов второй Международной научно-практической интернет-конференции. – 2013. - С. 129-130.

12. Павленко, К.С. Перспективы применения в медицинской практике рыжика озимого / К.С. Павленко // тезисы докладов Всероссийской молодежной научной школы «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности». – 2012. – С. 74.
13. Павленко, К.С. Жирное масло рыжика как потенциальный источник получения лекарственных средств / К.С. Павленко, В.А. Куркин, А.В. Милехин, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы»: сборник материалов II Международной научной Интернет-конференции. – 2013. Т.2 – С.81-84.
14. Павленко, К.С. Проблемы поиска новых источников биологически активных веществ: рыжик озимый (*Camelina silvestris* L.) / К.С. Павленко, В.А. Куркин // «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы»: сборник материалов XI Международной конференции. – 2013. – С. 77-78.
15. Павленко, К.С. Оценка возможности получения лекарственных препаратов из растительного сырья: рыжик озимый / К.С. Павленко // «Проблемы разработки новых лекарственных средств»: сборник тезисов первой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. – 2013. С. 90.
16. Павленко, К.С. Фармакогностическое изучение рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) / К.С. Павленко // «Молодые ученые – медицине»: сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием. – 2013. - С. 292-295.
17. Павленко, К.С. Перспективы промышленного возделывания рыжика озимого в условиях Самарской области / К.С. Павленко, В.А. Куркин, А.В. Милехин // Сборник трудов I Международной Интернет-конференции «Современные тенденции в сельском хозяйстве». – 2012. – С. 142-143.
18. Павленко, К.С. Определение физико-химических констант жирного масла семян рыжика озимого (*Camelina silvestris* L.) / К.С. Павленко, В.А. Куркин // «Научоемкие химические технологии – 2013»: тезисы докладов V Молодежной научно-технической конференции. – 2013. – С. 74.