

КУРДЮКОВ Евгений Евгеньевич

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕМЯН ЛЬНА И
ЛИСТЬЕВ СТЕВИИ КАК КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА
«СТЕЛИНОЛЬ»**

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Самара - 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пензенский государственный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник *Семенова Елена Федоровна*

Официальные оппоненты:

Бубенчикова Валентина Николаевна - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии и ботаники, заведующая кафедрой;

Дайронас Жанна Владимировна – доктор фармацевтических наук, Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов, профессор кафедры

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», г. Воронеж

Защита состоится «__» апреля 2019 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2019/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 208.085.06,
кандидат фармацевтических наук

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Целями государственной политики в области здорового образа жизни являются сохранение и укрепление здоровья населения, профилактика заболеваний, связанных в первую очередь с неправильным питанием: ожирения, сахарного диабета, атеросклероза, метаболического синдрома, ишемической болезни сердца и др.

Сахарный диабет является острой медико-социальной проблемой практически всех стран мира, катастрофический рост числа заболевших принимает характер неинфекционной эпидемии. Трудно переоценить значимость поиска обоснованных подходов к профилактике сахарного диабета, несмотря на довольно обширный арсенал противодиабетических препаратов и большой опыт их применения, то есть проблема профилактики и лечения заболевания не решена. Одним из направлений в области профилактики алиментарно-зависимых заболеваний является создание новых лекарственных растительных препаратов (ЛРП). Большой интерес в теоретическом и практическом плане представляет изучение возможностей применения растительных сборов, способствующих нормализации липидного и углеводного обменов, нарушенных при сердечно-сосудистых заболеваниях, сахарном диабете, метаболическом синдроме, ожирении (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2009; 2016; Самылина И.А. и др., 2003; 2010).

В этом отношении большой интерес представляют льна посевного семена и стевии листья, обладающие необходимыми фармакологическими свойствами для профилактики указанных алиментарно-зависимых заболеваний. Применение сборов на основе данных видов лекарственного растительного сырья позволит проводить эффективную профилактику многих заболеваний обмена веществ у человека.

Лекарственное растение лен посевной (обыкновенный) [*Linum usitatissimum* L. сем. Льновые – *Linaceae*] является ценной культурой, содержащей ряд биологически активных соединений, в частности, жирные кислоты, оказывающие комплексное воздействие на сердечно-сосудистую, нервную и другие системы организма (Живетин В.В. и др., 2002; Зубцов В.А. и др., 2002).

Стевия Ребо [*Stevia rebaudiana* Bertoni сем. Астровые – *Asteraceae*] является источником получения биологически активных соединений, применяемых в составе комплексной терапии для профилактики и лечения заболеваний эндокринной системы, также используется при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, центральной нервной системы, ротовой полости, патологий суставов. Благодаря уникальному свойству не повышать уровень глюкозы в крови ее применяют лица, больные сахарным диабетом (Верзилина Н.Д. и др., 2005; Семенова Н.А., 2005).

Комплексное воздействие биологически активных соединений льна посевного семян и стевии листьев позволит использовать растительный сбор «Стелинол» для профилактики сахарного диабета, ожирения, гипертонии, а также в качестве антиоксидантного, иммуномодулирующего и противовоспалительного средства.

Степень разработанности темы. В настоящее время опубликовано большое количество работ, посвященных фармакогностическому исследованию новых видов лекарственного растительного сырья (ЛРС). Вопросам использования лекарственных растений и лекарственных растительных препаратов на их основе при заболеваниях эндокринной системы посвящены работы отечественных и зарубежных ученых. Разработка методов стандартизации ЛРС и ЛРП отражена в работах известных отечественных и зарубежных авторов (Самылина И.А., 2003, 2010; Жужжалова Т.П., 2006; Куркин В.А., 2007, 2016; Бондарев Н.И., 2010; Бубенчикова В.Н., 2012; Кузьмичева Н.А., 2017; Brandle J. E., 2007; Virendra V. 2008).

Не изучено сортовое разнообразие льна посевного. Недостаточно исследованы биологически активные соединения (жирные кислоты, аминокислоты) льна семян современных сортов. Имеются отдельные работы, касающиеся изучения химического состава сырья льна. В связи с этим представляется актуальным исследование аминокислотного и жирно-кислотного состава льна посевного семян.

Стевия Ребо (*Stevia rebaudiana* Bertoni) является малоизученным растением. В научной литературе имеются противоречивые данные по химическому составу стевии листьев, не представлены нормативные документы. Также в литературе недостаточно данных о фармакологической активности разных групп биологически активных соединений стевии. В настоящее время сырье стевии используется как пищевое, а не лекарственное растительное сырье. Сведений о его морфолого-анатомических особенностях, химическом составе, биологической активности недостаточно для введения стевии в практическую медицину. В связи с этим представляется актуальным фармакогностическое исследование и стандартизация сырья стевии.

Таким образом, недостаточная степень научной разработанности темы, практическая значимость для отечественной фармации и медицины обусловили выбор темы исследования и определили его цель.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка и стандартизация сбора «Стелинол», содержащего льна посевного семена и стевии листья.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Провести морфолого-анатомическое изучение стевии листьев.
2. Провести сравнительное морфолого-анатомическое изучение льна посевного семян современных сортов.
3. Провести изучение химического состава стевии листьев.
4. Провести сравнительное изучение химического состава льна посевного семян современных сортов.
5. Предложить методы стандартизации стевии листьев и разработать проект фармакопейной статьи «Стевии листья».
6. Разработать методику количественного определения полисахаридов (слизей) в сырье «Льна посевного семени».
7. Обосновать состав сбора «Стелинол» для профилактики и комплексной терапии сахарного диабета.

8. Разработать методики количественного определения биологически активных соединений сбора «Стелинол», установить критерии подлинности и показатели качества для стандартизации сбора.

9. Разработать проект нормативной документации на растительный сбор «Стелинол».

Научная новизна. Впервые в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) для разработки нового сбора использовано сочетание из стевии листьев и льна посевного семян в порошковом, измельченном и цельном виде.

В сравнительном аспекте изучен жирнокислотный состав льна посевного семян 21 современного сорта как источника жирномасличного сырья, что позволит использовать их в медицинской практике. С применением современных методов анализа установлен качественный и количественный состав аминокислот, каротиноидов, токоферолов, фитостероидов.

Выявлена совокупность морфолого-анатомических диагностических признаков стевии листьев. Показано, что условия выращивания оказали влияние на морфометрические показатели клеток эпидермиса: при выращивании на серых лесных почвах размеры клеток увеличены по сравнению с выращиванием на выщелоченных чернозёмах. Установлен качественный и количественный состав аминокислот, флавоноидов, фенилпропаноидов, органических кислот, каротиноидов, сапонинов.

Обоснованы методики анализа стевии листьев, основанные на определении действующих веществ (фенилпропаноидов и флавоноидов) методами УФ-спектроскопии и тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Изучение химического состава стевии листьев позволило определить, что среди фенольных соединений преобладают флавоноиды и фенилпропаноиды; это свидетельствует о перспективности комплексного использования данного вида сырья.

Разработаны состав и способ получения лекарственного растительного сбора на основе льна посевного семян и стевии листьев - «Стелинол», а также подходы к его стандартизации. Предложен вариант методики анализа, основанный на определении действующих веществ (фенилпропаноидов и полисахаридов).

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании результатов исследований дана характеристика жирнокислотного, аминокислотного, витаминного состава льна посевного семян и стевии листьев различных сортов.

Диагностически значимые анатомо-морфологические признаки сырья стевии могут быть использованы при его стандартизации и контроле качества фитопрепаратов на его основе.

Разработана методика качественного анализа методом тонкослойной хроматографии и количественного определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов методом спектрофотометрии в стевии листьях.

Исследование химического состава, анатомического строения, фармакологической активности позволило расширить сведения о стевии листьях.

Разработаны показатели доброкачественности сырья стевии, которые включены в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Стевии листья - *Steviae folia*».

Предложена методика количественного определения полисахаридов (слизей) в сырье льна посевного.

Определены критерии подлинности и показатели качества сбора, необходимые для стандартизации и включения в разработанный проект нормативной документации на сбор «Стелинол».

Материалы диссертации внедрены в учебный процесс на кафедрах общей и клинической фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пензенский государственный университет», фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». Результаты, полученные в ходе диссертационной работы, включены в научное издание «Разработка фитокомпозиций лечебно-профилактического действия».

Методология и методы исследования. Методология построена на изучении и систематизации литературных данных по теме исследования, на оценке степени разработанности и актуальности темы, на постановке цели и задач исследования по фармакогностическому анализу и разработке методов стандартизации предложенного сбора и его компонентов, формулировании выводов, определяющих теоретические и практические рекомендации материалов работы.

В качестве основных методов химического, физического и физико-химического анализа использовались методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), газожидкостной хроматографии (ГЖХ), УФ-спектроскопии, капиллярного электрофореза, гравиметрии, титриметрии, фотоэлектроколориметрии, макроскопии и микроскопии, а также фармакологические экспериментальные методы. Также в работе были применены различные качественные и гистохимические реакции на отдельные группы биологически активных соединений. Математическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ по методике, описанной в ГФ РФ XIV издания.

Связь темы диссертации с планами научно-исследовательских работ. Диссертационное исследование выполнено согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»: «Фармакогностические и технологические аспекты изучения новых источников лекарственного сырья растительного и микробного происхождения, лекарственных форм и препаратов на его основе» (№ государственной регистрации 01201062254).

Выполнение некоторых этапов диссертационного исследования осуществлялось также по программе «Участник Молодежного Научно-Инновационного Конкурса - 2014» (У.М.Н.И.К.), договор №2953 ГУ1/2014 от 28.07.2014 (Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты сравнительного морфолого-анатомического исследования льна посевного семян.

2. Результаты сравнительного фитохимического анализа сырья льна посевного современных сортов (жирные масла, полисахариды, аминокислоты).

3. Результаты разработки методики количественного определения полисахаридов (слизей) в сырье «Льна посевного семена».

4. Результаты сравнительного морфолого-анатомического, фитохимического исследования стевии листьев.

5. Результаты разработки методик количественного определения содержания суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в стевии листьях, а также суммы фенилпропаноидов в растительном сборе «Стелинол».

6. Данные по изучению показателей качества сырья стевии, включенные в проект ФС на новый вид ЛРС «Стевии листья - *Steviae folia*».

7. Результаты разработки и стандартизации сбора «Стелинол»;

Степень достоверности. Достоверность проведенных исследований подтверждена экспериментальными данными, полученными с помощью современных методов исследования: химических, физико-химических и спектральных. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации.

Апробация результатов. Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на: V Международной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (Пенза, 2015), VI Международной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (Пенза, 2017), II International Symposium «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine» (Москва, 2017), III Международной научно-практической конференций молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2018), II Всероссийском межвузовском GxP-саммите с международным участием «Выбор лучших. Время вперед» (Сочи, 2018).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертационного исследования опубликовано 24 научные работы, из них 4 статьи в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в Перечень рецензируемых научных изданий.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах общей и клинической фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пензенский государственный университет», фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва».

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты, приведённые в диссертационной работе, получены самим автором или с его непосредственным участием. Персональное участие автора заключается в выполнении исследований по изучению морфологических и анатомо-гистологических особенностей строения стевии листьев. Изучен химический состав сырья различных сортов льна и стевии.

Разработаны методики определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в стевии листьях. Предложена методика количественного определения полисахаридов (слизей) в сырье льна посевного. Разработаны состав и технология получения сбора «Стелинол». Автором предложен проект ФС «Стевии листья - *Steviae folia*», проект ФС сбора «Стелинол».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2 - «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 - «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 - «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и 6 - «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и извлечений на его основе».

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста, полученные данные иллюстрированы 37 рисунками и представлены в форме 52 таблиц. Работа состоит из введения, литературного обзора, объектов и методов исследования, 4 глав, в которых указаны результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы, состоящего из 189 источников, в том числе 132 отечественных и 57 иностранных.

Во введении указана актуальность темы исследования, представлены цель и задачи, сформулированы научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования, описаны основные положения, выносимые на защиту, а также сведения о публикациях и апробации работы.

В главе 1 проанализированы литературные сведения о состоянии исследований отечественных и зарубежных авторов в области изучения сырья льна и стевии. В представленной главе приведены существующие данные о ботаническом описании производящих растений льна посевного и стевии Ребо, о химическом составе сырья льна и стевии, по использованию в медицине.

Глава 2 посвящена объектам и методам исследования. Описаны методики установления подлинности и количественной оценки содержания биологически активных соединений в сырье льна и стевии.

В главе 3 уделено внимание морфологическому и анатомическому изучению, фитохимическому исследованию льна посевного семян современных сортов.

В главе 4 приводятся результаты морфологического, анатомического изучения, фитохимического исследования и стандартизации стевии листьев различного происхождения.

В главе 5 изложены обоснование состава, стандартизация и результаты изучения химического состава, исследования по установлению анксиолитической активности сбора «Стелинол».

Диссертационная работа завершается общими выводами, практическими рекомендациями, заключением, списком литературы и приложениями, на которые ссылается автор.

В приложениях диссертации представлены проект фармакопейной статьи «Стевии листья - *Steviae folia*», проект фармакопейной статьи на сбор «Стелинол», акты внедрения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В качестве лекарственного растительного сырья для разработки растительного сбора использовали высушенные листья стевии и семена льна в порошковом, измельченном и цельном виде. Сырье льна заготавливали на территории Пензенской области (Лунинский район, с.Лунино), сортов ВНИИМК 620, Арктический 7, Кентавр, Исилькульский, ВНИИМК 630, Небесный, Белочка, Кустанайский янтарь, Белинка, ВНИИМК 622, Карабалыкский 7, Исток, Алексим, Сокол, Бахмальский-1056, Санлин, Кинельский 2000, Ручеек, Линола+, Брестский, Северный. Образцы сырья стевии были получены в условиях Пензенской области (сорта Рамонская сладстена, Услава, София), Тверской области, Краснодарского края, Республики Крым (сорта Рамонская сладстена), Индии и Парагвая. Подбор компонентов, оптимизацию состава проводили с учетом правил составления фитокомпозиции лечебного и профилактического действия (Куркин В.А., 2009).

Макроморфологию изучали визуально и при помощи стереоскопической лупы. Микроскопию микропрепаратов проводили с использованием микроскопов МИКМЕД-1, БИОМЕД-6 (кратность увеличения 10× 40×, 100×). Фотографирование микро- и макрообъектов проводили цифровыми фотокамерами Nikon Coolpix 2500, Nikon Coolpix 6300, Panasonic DMC-FX100.

Проявляемость диагностически значимых признаков оценивали в лекарственном растительном сырье в соответствии с известной методикой (Самылина И.А., 2010)

Настой 1:10 готовили массообъемным способом в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. Спиртовый экстракт (1:10) был получен методом дробной мацерации. Сок готовили путем отжима из измельченных свежих листьев стевии.

Изучение жирно-кислотного состава масла семян льна проводили методом газожидкостной хроматографии после предварительного перевода жирных кислот в метиловые эфиры по методике ГОСТ 31665 – 2012.

Аминокислотный состав листьев стевии и семян льна изучали методом капиллярного электрофореза (Комарова Н.В., Каменцев Я.С., 2009).

Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах «СФ-104» и «Specord (Analytik Jena)» в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. Для количественного определения флавоноидов в извлечениях из листьев стевии использовали метод дифференциальной спектрофотометрии, для количественного определения фенилпропаноидов, дитерпеновых гликозидов, тритерпеновых сапонинов и каротиноидов использовали метод прямой спектрофотометрии. Количественный анализ токоферолов проводили по Эммери – Эпгелю. Содержание органических кислот определяли титриметрически по методике ГФ РФ XIV издания. Содержание фитостероидов определяли методом ТСХ.

Для анализа извлечений из сырья методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Силуфол УФ-254».

Для количественного определения суммы полисахаридов в семенах льна использовали методику ГФ РФ XIV. Количественное определение гидратированных полисахаридов (слизей) осуществляли методом гравиметрии.

Индикацию антимикробных эффектов сока, настоя и спиртового экстракта из лекарственного сырья стевии проводили путем диффузии в агар на питательной среде для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (Семенова Е.Ф., Веденева А.С., Жужжалова Т.П., 2008).

Влажность лекарственного растительного сырья определяли по методике ГФ РФ XIV.

Для оценки влияния настоя на основе фитокомпозиции "Стелинол" на состояние углеводного обмена у животных с сахарным диабетом использовали пероральный глюкозотолерантный тест с последующим определением в крови уровня глюкозы. Исследование двигательной и психоэмоциональной активности крыс проводили в тесте «Открытое поле».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Фармакогностический анализ различных образцов льна посевного семян

Морфолого-анатомическому анализу подвергали льна посевного семени. Различные сорта имеют сходное анатомическое строение семени, однако наблюдаются различия в строении клеточной стенки и размерах клеток эпидермального слоя семенной кожуры, особенностях расположения слоев слизи. У сортов Северный, Арктический, Бахмальский, Санлин клетки вытянуты, наружная клеточная стенка по краям имеет небольшие выросты. У сорта Алексим наружные клетки не имеют выростов, форма клеток округлая и слабо выражены слизистые слои. Сорт Белинка также не имеет четко выраженных выростов, но отмечаются слои расположения слизи (рис.1).

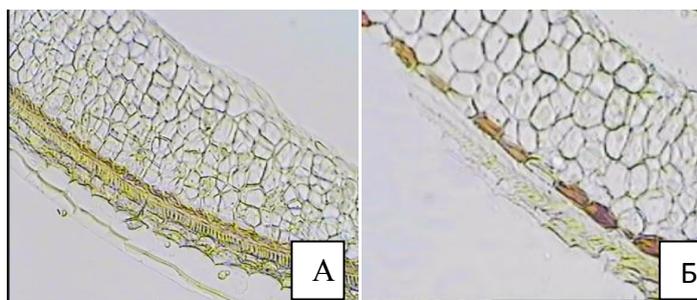


Рисунок 1 - Структура семенной кожуры льна: А - сорта Исток (x 100), Б - сорт Северный (x 100)

Под оболочкой семени располагается эндосперм, клетки которого более мелкие и имеют многоугольную форму. Клетки этого слоя богаты белком (алеироновые зерна) и жиром. На препаратах при окрашивании Суданом III капли жирного масла окрасились в оранжевый цвет (рис. 2).

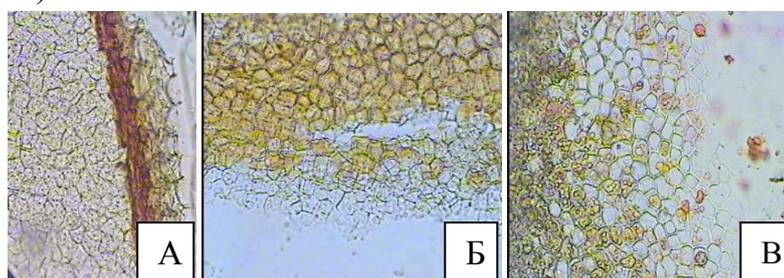


Рисунок 2 - Клетки эндосперма льна семени (x 100): А - Белочка, Б- ВНИИМК 622 (окраска раствором Люголя), В – Исток (окраска раствором Судана III)

Разработана методика, основанная на определении физико-химических показателей семян, которая может использоваться для экспресс-анализа растительных образцов в течение двух часов и их дифференцирования по направлениям использования: в качестве жирномасличного или слизесодержащего лекарственного сырья. По степени слизеобразования исследуемые сорта можно разделить на три группы: с низким уровнем (Санлин, Белинка, Кустанайский янтарь, ВНИИМК 622, ВНИИМК 630, ВНИИМК 620 и Кентавр), средним уровнем (Карабалыкский 7, Сокол, Белочка, Алексим, Небесный, Арктикский 7, Исток) и высоким уровнем (Северный, Исилькульский, Бахмальский, Кинельский 2000) (рис. 3).

Выявлена положительная взаимосвязь между содержанием суммы полисахаридов и уровнем слизиобразующей способности. В частности, сорт Северный, содержащий 26,4 % полисахаридов, имеет высокую слизиобразующую способность, а сорта Белинка и Санлин, содержащие 11,4 % и 10,8 % полисахаридов, характеризовались низким уровнем слизиобразующей способности. При этом сорта, обладающие высокой слизиобразующей способностью, как правило, имеют пониженное содержание жирного масла в семенах.

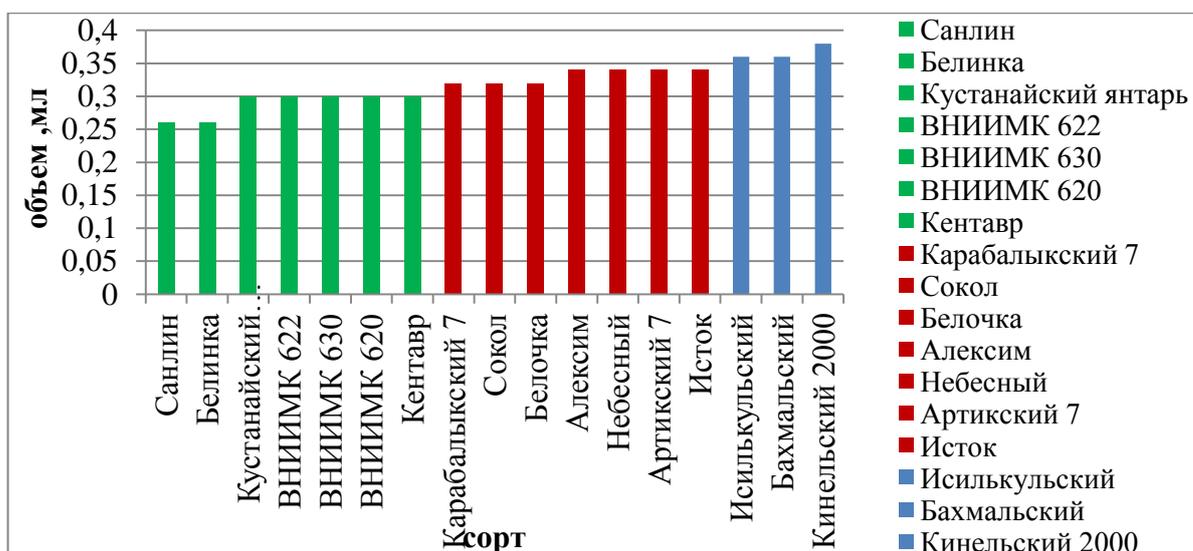


Рисунок 3 - Ранжирование степени слизеобразования (увеличения объема при гидратации) цельных семян современных сортов льна посевного

В результате проведенного сравнительного количественного определения полисахаридов в семенах современных сортов льна установлено, что их содержание варьирует от 9,8 до 16,04 % (рис. 4).

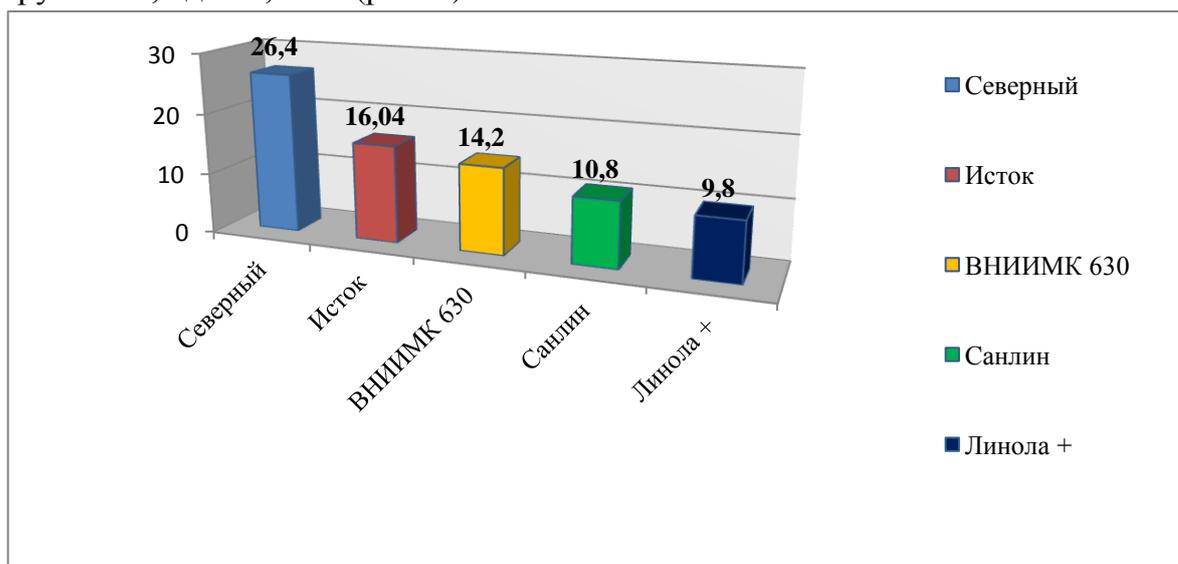


Рисунок 4 - Сумма полисахаридов льна семян

С помощью метода капиллярного электрофореза определен аминокислотный состав семян современных сортов льна. Идентифицированы 13 аминокислот (рис. 5), установлено их содержание в сырье: аргинин (1,02 – 3,62%), лизин (0,38 – 1,27%), тирозин (0,34 – 0,64%), фенилаланин (0,72 – 1,51%), гистидин (0,04 – 0,58%), лейцин + изолейцин (0,77 – 3,02%), метионин (0,12 – 0,41%), валин (0,59 – 1,77%), пролин (0,49 – 1,23%), треонин (0,32 – 0,86%), серин (0,52 – 0,97%), аланин (0,73 – 1,46%), глицин (0,82 – 1,81%).

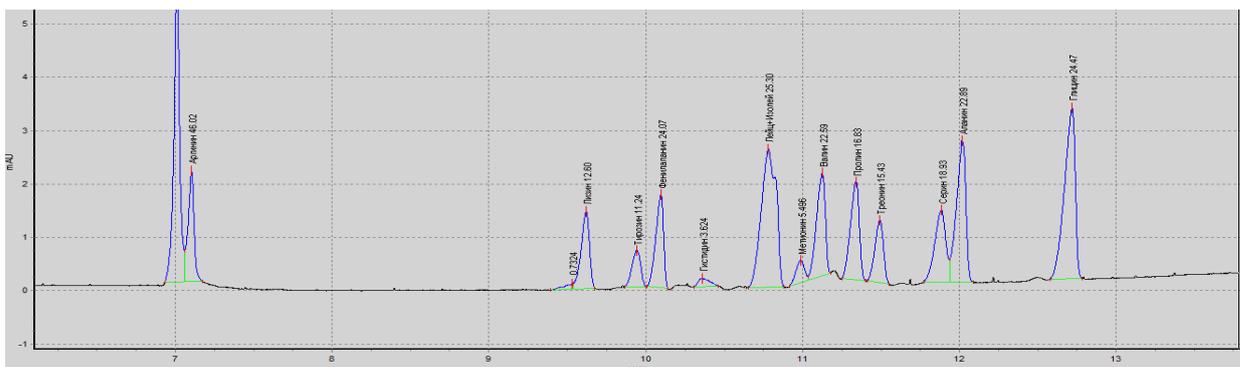


Рисунок 5 - Электрофореграмма аминокислот льна посевного семян

Доля незаменимых аминокислот составила: Карабалыкский – 7,75 %, Алексим – 7,52 %, Небесный – 7,15 %, Кентавр – 6,02 %, Сокол – 4,25 %, Санлин – 5,60 %, Бахмальский – 6,40 %, Кинельский 2000 – 7,20 %, Исток – 5,95 %, Северный – 6,51 %, Исилькульский – 9,96 %, Белинка – 13,11 %, от суммы аминокислот.

С помощью газожидкостной хроматографии определен жирнокислотный состав семян современных сортов льна. Идентифицированы 17 жирных кислот, установлено, что содержание пальмитиновой кислоты находилось в пределах от 4,928 % (Брестский) до 6,548 % (Исток), стеариновой кислоты - от 3,440 % (Кинельский 2000) до 5,862 % (Брестский), олеиновой кислоты - от 14,877 % (Исток) до 30,529 % (Небесный), линолевой кислоты - от 14,777 % (Брестский) до 69,161 % (Исток). Жирнокислотный состав масел низколиноленовых сортов имеет оптимальное соотношение ω -6 и ω -3 жирных кислот, что соответствует рекомендациям Института питания РАМН и для здорового питания составляет (5-10):1, а при некоторых заболеваниях для лечебного питания (3-5):1.

Методом фотоэлектроколориметрии установлено содержание каротиноидов от 0,0010 % до 0,0054 %. По Эммери-Эпгелю токоферолов от 65,37 мг% до 76,9 мг%. Содержание фитостероидов, оцененное методом ТСХ, составляет для семян льна обыкновенного от 0,123 мг% до 0,452 мг%. Методом гравиметрии определено содержание слизиобразующих полисахаридов в семенах льна от 9,8 до 26,4%. Таким образом, содержание каротиноидов у изучаемых сортов различается в 5 раз, хлорофилла в 15 раз, токоферолов в 2 раза, фитостероидов более чем в 1,5 раза.

2. Фармакогностический анализ стевии листьев различного происхождения

Морфолого-анатомическому анализу подвергали свежее и высушенное сырье – стевии листья. Основными диагностическими признаками для использования в подтверждении подлинности нового ЛРС «Стевии листья» являются: лист простой, ланцетный или обратно-яйцевидный, верхушка листа притуплённая, основание клиновидное, края городчатые, пильчатые или волнистые, поверхность листа гладкая с сетчатым жилкованием, опушённая, в основном, с нижней стороны (рис. 6).



Рисунок 6 - Изучаемые сорта стевии: А – Рамонская сладстена; Б – Услава; В – София

Характер кутикулы лучисто-морщинистый, устьица имеют круглую форму, устьичный аппарат аномоцитный, тип устьичных клеток чечевицевидный, волоски простые многоклеточные однорядные конусовидные и остроконусовидные, тонкостенные (характер утолщенности клеточных стенок волосков), покрывающая кутикула волосков имеет гладкую поверхность, особенностью мест присоединения волосков является многоклеточное основание. На поверхности листа, кроме волосков, находятся также сидячие желёзки округлой формы. Жилкование сетчатое, проводящая система листьев включает проводящий пучок (главная жилка), состоящий из сосудов, трахеид, волокон и ситовидных трубок, и отдельные трахеиды со спиральным утолщением оболочек (рис. 7).



Рисунок 7 - Микроморфология стевии листьев (x100): А – кутикула, эпидермис, основание волоска, Б – устьица с чечевицевидными клетками, В - округлые желёзки и чечевицевидные клетки устьиц

С помощью метода капиллярного электрофореза определен аминокислотный состав стевии листьев. Идентифицированы 13 аминокислот, массовая доля которых в пробе составляла: аргинина от 0,48 % до 0,67 %, лизина от 0,43 % до 0,60 %, тирозина от 0,21 % до 0,36 %, фенилаланина от 0,41 % до 0,68 %, гистидина от 0,01 % до 0,22 %, лейцина+изолейцина от 0,48 % до 0,85 %, метионина от 0,04 % до 0,49 %, валина от 0,44 % до 2,28 %, пролина от 0,28 % до 1,44 %, треонина от 0,085 % до 0,77 %, серина от 0,70 % до 2,77 %, аланина от 0,48 % до 0,83 %, глицина от 0,40 % до 0,68 %. Сумма незаменимых аминокислот в сырье стевии варьировала от 2,89 % до 4,99% (рис. 8), и составила: Рамонская сладстена (Пенза) – 4,99%, Рамонская сладстена (Краснодар) –

2,89%, Рамонская сладена (Крым) - 4,64% , София (Пенза) – 4,19%, Рамонская сладена (Тверь) - 3,87%.

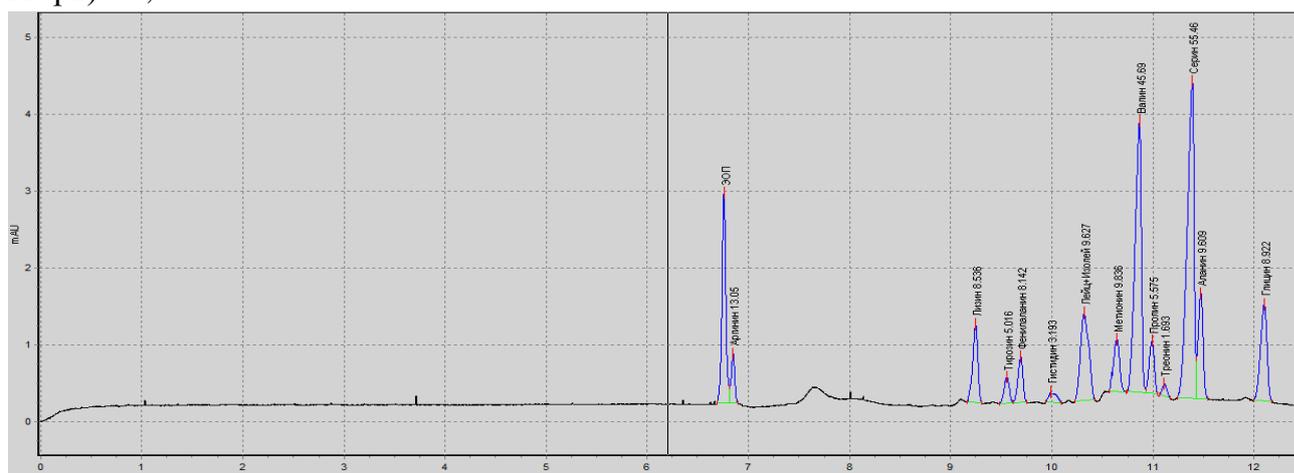


Рисунок 8 - Электрофореграмма аминокислот стевии листьев, метод капиллярного электрофореза.

Результаты фитохимического изучения стевии листьев использовались при разработке методик качественного и количественного анализа сырья данного растения. Проводилось исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья. Оптимальным подходом к анализу стевии листьев является экстракция в течение 45 мин на кипящей водяной бане, где в качестве экстрагента используется 70% этиловый спирт в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:100.

Для оценки подлинности стевии листьев рекомендовано применение двух методов – ТСХ и спектрофотометрии. Оптимальной системой растворителей для разделения веществ из водно-спиртовых извлечений стевии листьев в условиях ТСХ является хлороформ – этиловый спирт 70 % – вода (26:16:3) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ», с использованием стандартных образцов хлорогеновой кислоты, цинарозида. Детекцию проводили в УФ-свете при 254 нм и 366 нм.

На хроматограмме водно-спиртового извлечения из листьев стевии обнаруживается пятно оранжевого цвета R_f около 0,55 на уровне РСО хлорогеновой кислоты, а также пятно желтого цвета с R_f около 0,64 на уровне раствора ГСО цинарозида. Таким образом, рациональным подходом является использование для анализа стевии листьев и ее препаратов при проведении качественного анализа методом тонкослойной хроматографии применение в качестве веществ-стандартов хлорогеновой кислоты и цинарозида с последующим расчетом значений R_f .

Сравнительное изучение УФ-спектров водно-спиртового извлечения из стевии листьев свидетельствует о том, что основной вклад в кривую поглощения УФ-спектра водно-спиртового извлечения вносят фенолпропаноиды. Полученный УФ-спектр имеет максимум при 330 ± 2 нм, а также «плечо» при длине 290 ± 2 нм (рис. 9).

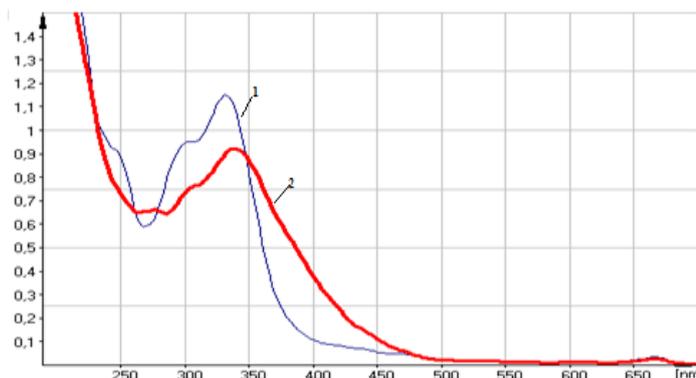


Рисунок 9 – УФ спектр водно-спиртового извлечения стевии листьев

Обозначения: 1 – исходный раствор (1:5000); 2 – раствор в присутствии $AlCl_3$

При добавлении к исследуемому извлечению из стевии листьев раствора алюминия (III) хлорида наблюдается bathochromic shift (рис. 10, 11). Максимум дифференциального спектра извлечения находится при 400 ± 2 нм, что свидетельствует о возможности использования данных спектрофотометрии для количественного определения суммы флавоноидов.

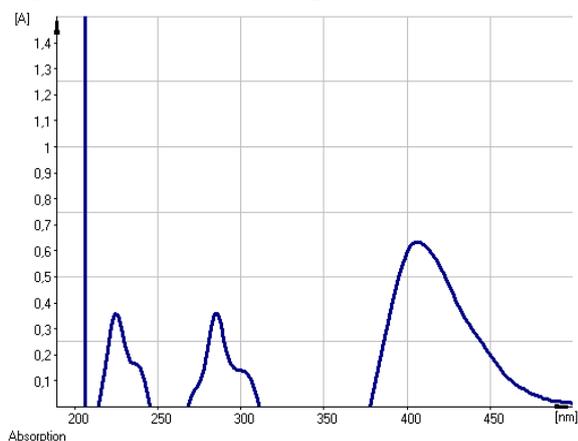


Рисунок 10 - УФ-спектр раствора цинарозида в присутствии $AlCl_3$.

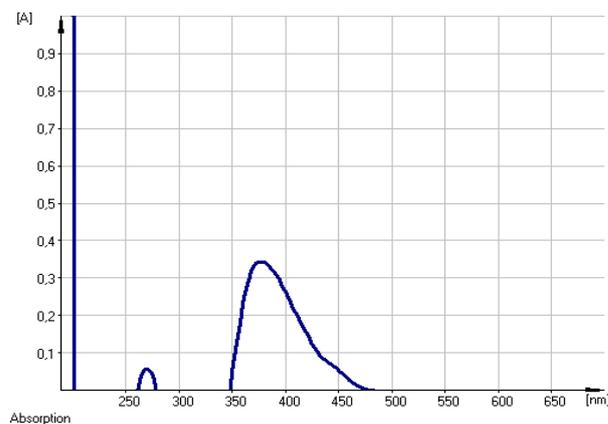


Рисунок 11 - УФ-спектр извлечения из стевии листьев (1:1250) в присутствии $AlCl_3$

Поскольку в стевии листьях среди фенольных веществ доминируют фенилпропаноиды и флавоноиды, целесообразна разработка методик количественного определения данных веществ. Определено, что характер кривой поглощения УФ-спектров водно-спиртового извлечения в основном определяется хлорогеновой кислотой. Это подтверждает целесообразность в качестве метода количественного определения использовать прямую спектрофотометрию, а пересчет содержания суммы фенилпропаноидов осуществлять на хлорогеновую кислоту.

Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 100 \times 100}{m \times 497 \times 0,5 \times (100 - w)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), %; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм.

Выявлено, что содержание фенолпропаноидов в стевии листьях различных сортов варьирует в интервале 6,73-10,73%.

Результаты статистической обработки полученных результатов количественного определения суммы фенолпропаноидов в стевии листьях свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 0,66\%$ - для методики определения методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту (**табл. 1**).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{350 \times a \times 2 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность раствора; 350 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминием хлоридом при длине волны 400 нм; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Таблица 1 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенолпропаноидов в стевии листьях

ЛРС	N	F	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta \bar{X}$	E, %
Рамонская сластена (Краснодар)	5	4	10,73	0,00237	0,048683	95	2,776	$\pm 0,042$	$\pm 0,56$
Рамонская сластена (Тверь)	5	4	10,06	0,00142	0,037683	95	2,776	$\pm 0,033$	$\pm 0,46$
Рамонская сластена (Пенза)	5	4	10,51	0,00137	0,037014	95	2,776	$\pm 0,032$	$\pm 0,44$
София (Пенза)	5	4	10,06	0,00283	0,053198	95	2,776	$\pm 0,047$	$\pm 0,66$
Стевия (Парагвай)	5	4	8,38	0,00093	0,030496	95	2,776	$\pm 0,027$	$\pm 0,45$
Стевия (Индия)	5	4	6,73	0,00092	0,030332	95	2,776	$\pm 0,027$	$\pm 0,56$
Рамонская сластена (Крым)	5	4	10,03	0,00157	0,039623	95	2,776	$\pm 0,035$	$\pm 0,49$

В качестве дополнительного параметра для оценки качества стевии листьев нами предложена методика дифференциальной спектрофотометрии для количественного определения содержания суммы флавоноидов. При модификации количественного определения флавоноидов в стевии листьях изучены УФ-спектры их комплексных соединений с хлоридом алюминия. Было установлено, что в присутствии алюминия хлорида максимум поглощения комплексного соединения флавоноидов стевии находится в области 400 ± 2 нм. В нашей работе в качестве стандарта был использован цинарозид, который с хлоридом алюминия имеет максимум при 400 ± 2 нм, близкие спектральные характеристики с флавоноидами, содержащимися в исследуемом сырье.

Результаты статистической обработки полученных результатов количественного определения суммы флавоноидов в стевии листьях свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 1,39\%$ - для методики определения методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид (**табл. 2**).

Таблица 2 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в стевии листьях

ЛРС	N	F	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta \bar{X}$	E, %
Рамонская сладстена (Краснодар)	5	4	1,74	0,00032	0,01788	95	2,776	±0,016	±0,50
Рамонская сладстена (Тверь)	5	4	1,38	0,00025	0,01581	95	2,776	±0,014	±0,51
Рамонская сладстена (Пенза)	5	4	1,59	0,00113	0,03361	95	2,776	±0,029	±1,01
София (Пенза)	5	4	1,47	0,00092	0,03033	95	2,776	±0,027	±1,03
Стевия (Парагвай)	5	4	1,42	0,00053	0,02302	95	2,776	±0,020	±0,80
Стевия (Индия)	5	4	1,13	0,00097	0,03114	95	2,776	±0,027	±1,39
Рамонская сладстена (Крым)	5	4	1,52	0,00157	0,03962	95	2,776	±0,034	±1,37

Использование модифицированной методики определения флавоноидов позволило проанализировать образцы стевии различных регионов выращивания, и было установлено, что содержание флавоноидов в стевии листьях варьирует от 1,13 до 1,74 %.

Также было определено количественное содержание органических кислот от 3,81 до 5,38%, тритерпеновых сапонинов от 2,51 % до 4,64%, каротиноидов от 4,33 мг% до 13,15 мг%, дитерпеновых гликозидов от 14,8 % до 21,4 %.

Обоснование состава и стандартизация сбора «Стелинол»

В результате проведенных исследований обоснован состав и проведена оптимизация сбора «Стелинол». Определены морфолого-анатомические признаки нового сбора «Стелинол», выделены анатомические диагностически значимые признаки для стандартизации сбора: строение клеточной стенки и размеры клеток эпидермального слоя семенной кожуры; особенности расположения слоев слизи в клетках; наличие жирного масла в виде капель в семядолях; характер кутикулы; тип устьичных клеток; наличие простых многоклеточных волосков; наличие сидячих железок округлой формы.

Установлены критерии подлинности и показатели качества сбора «Стелинол». Исследована проявляемость диагностически значимых признаков ЛРС в сборе: для стевии листьев 66,7 %, для льна семян 54,5 %; рассчитаны индексы участия каждого компонента в сборе: для стевии листьев 36,1 %, для льна семян 63,9 %.

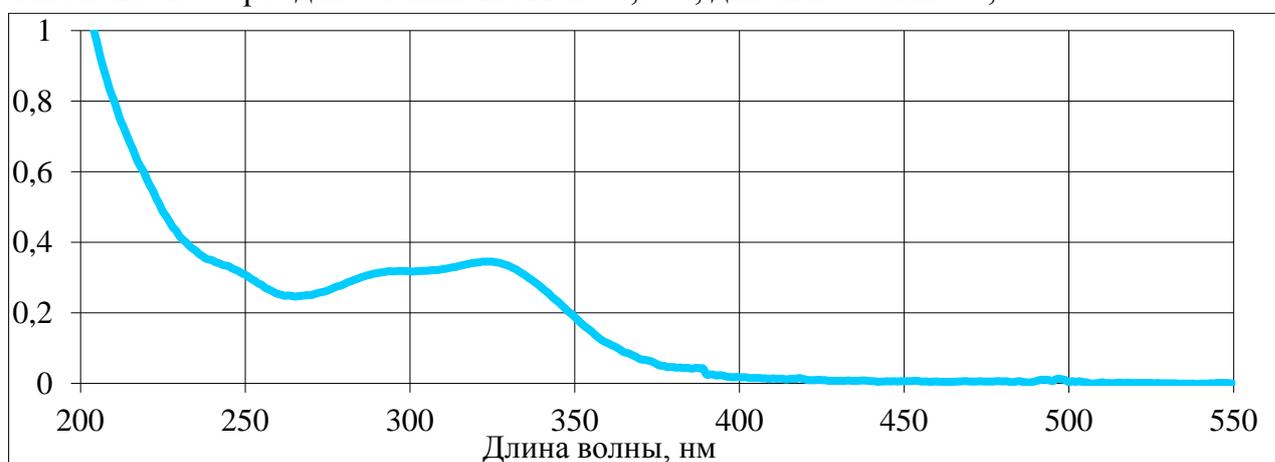


Рисунок 12 - УФ-спектр извлечения из сбора «Стелинол» (1:1250)

В проект фармакопейной статьи предлагаем включить спектр поглощения раствора Б, полученного по стандартной методике определения фенилпропаноидов. УФ-спектр раствора Б в области от 250 до 550 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 330 нм и плечо при длине волны 290 нм (рис.12). Выявлено, что характер кривой поглощения УФ-спектров извлечения в основном определяется хлорогеновой кислотой.

Количественное определение содержания фенилпропаноидов в растительном сборе «Стелинол» прямым спектрофотометрическим методом проводили в пересчете на хлорогеновую кислоту, исходя из спектров извлечения из сбора и хлорогеновой кислоты в процентах (X) по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 200 \times 100}{m \times 497 \times (100 - w)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), %; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм.

Определены характеристики собственного поглощения фенилпропаноидов настоя из сбора «Стелинол» - 290 нм (плечо) и 330 нм (максимум). Раствор РСО хлорогеновой кислоты имеет максимум поглощения при 330±2 нм и «плечо» при 290±2 нм. Ввиду близкого расположения максимумов поглощения исследуемого извлечения и вещества-стандарта хлорогеновой кислоты, одним из целесообразных вариантов стандартизации является прямая спектрофотометрия.

Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более ± 5,52 % при определении суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Таблица 3 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в настое из растительного сбора «Стелинол»

Извлечение	N	F	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta \bar{X}$	E, %
Настой	5	4	0,28	0,00013	0,011402	95	2.776	0,0099	±5,13
Настой (фильтр-пакет)	5	4	0,19	0,00015	0,012247	95	2.776	0,0107	±5,52

С использованием модифицированной методики определения фенилпропаноидов были проанализированы образцы сбора «Стелинол». Было установлено, что содержание фенилпропаноидов варьирует от 0,19 до 0,28 % (табл. 3).

Для количественного определения суммы полисахаридов в растительном сборе «Стелинол» использовали методику ГФ РФ XIV издания. В сборе «Стелинол» на основе льна семян сорта Северный выявлено, что их содержание варьирует от 20,1 до 23,5%.

В результате проведения экспериментов по исследованию острой токсичности настоя из сбора "Стелинол" на крысах было установлено, что исследуемый образец в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества). При анализе фармакологической активности было определено, что водное извлечение из сбора "Стелинол" обладает анксиолитической активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое фармакогностическое исследование льна посевного семян и стевии листьев позволяет обосновать целесообразность использования в медицинской практике нового вида лекарственного растительного сырья «Стевии листья» и сбора «Стелинол» и сделать следующие **общие выводы**:

1. Установлены морфолого-анатомические особенности нового вида лекарственного растительного сырья «Стевии листья», главными из которых являются однорядные конусовидные сидячие железки округлой формы на нижней стороне листа. Результаты данных исследований включены в раздел «Микроскопические признаки» проекта ФС на стевии листья.

2. Проведено сравнительное морфолого-анатомическое исследование льна посевного семян современных сортов. При этом выявлены различия, состоящие в особенностях расположения выростов и формы клеток эпидермиса, а также расположения слоев слизи.

3. Проведено фитохимическое изучение сырья стевии с использованием хроматографических, спектральных, химических методов и определением основных групп биологически активных соединений. Установлено количественное содержание в образцах стевии листьев флавоноидов 1,13 – 1,74%, фенилпропаноидов 6,73 – 10,73%, органических кислот 3,81 – 5,38%, тритерпеновых сапонинов 2,51 – 4,64%, каротиноидов 4,33 – 13,15 мг%. Определен аминокислотный состав стевии листьев. Идентифицировано 13 аминокислот, установлено их количественное содержание.

4. Проведено сравнительное фитохимическое изучение семян льна посевного современных сортов. Гравиметрически установлено, что содержание полисахаридов варьирует от 9,8 до 16,04 %. С помощью метода газовой хроматографии определен жирнокислотный состав льна семян. Идентифицировано 17 жирных кислот, установлено их содержание в жирном масле. С помощью метода капиллярного электрофореза определен аминокислотный состав. Идентифицировано 13 аминокислот, установлено их содержание в сырье.

5. Разработаны методики качественного анализа для нового вида лекарственного растительного сырья «Стевии листья», заключающиеся в проведении тонкослойной хроматографии в сочетании с УФ-спектроскопией. Предложены методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид методом дифференциальной спектрофотометрии и методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту методом прямой спектрофотометрии, которые включены в проект фармакопейной статьи «Стевии листья - *Steviae folia*». Предложено проводить оценку качества данного вида сырья по содержанию фенилпропаноидов и по содержанию флавоноидов.

6. Разработана методика количественного определения полисахаридов (слизей) в сырье «Льна посевного семена», основанная на определении физико-химических показателей семян, которая может использоваться для анализа растительных образцов и

их дифференцирования по направлениям использования: в качестве жирномасличного или слизесодержащего лекарственного сырья.

7. Обоснован состав сбора «Стелинол», включающего в себя льна посевного семена и стевии листья; показана возможность применения настоя данного сбора для профилактики и в комплексной терапии сахарного диабета.

8. Предложена и обоснована методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в сборе «Стелинол» методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту. Установлены критерии подлинности сбора «Стелинол». Рекомендуемое содержание биологически активных соединений в сборе: слизиобразующие полисахариды не менее 12,0 %, фенилпропаноиды не менее 0,15 %.

9. Разработаны проекты фармакопейных статей на новый вид ЛРС «Стевии листья - *Steviae folia*» и на сбор «Стелинол».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты диссертационной работы могут быть использованы при усовершенствовании подходов к стандартизации сырья, содержащего флавоноиды и фенилпропаноиды, а также в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия», «Фармацевтическая химия». Выявленная совокупность диагностических макро- и микроморфологических признаков и органолептических свойств сырья стевии необходима для стандартизации и контроля качества фитопрепаратов на его основе и включения в нормативную документацию. Полученные результаты также дают возможность уточнить ряд методических аспектов фармакогностического исследования лекарственных форм на основе сырья стевии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии, в том числе с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих фенилпропаноиды и флавоноиды, а также разработки актуальных методик анализа и подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Кроме того, перспективным является исследование стевии листьев как возможного нового вида лекарственного растительного сырья.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Курдюков, Е.Е. Макро- и микроморфологические особенности листьев стевии Ребо *Stevia rebaudiana* Bertoni при интродукции в Среднем Поволжье / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова // **Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер. Медицина и фармация.** – 2017. – № 26. – С 137-145.

2. Курдюков, Е.Е. Количественное определение суммы дитерпеновых глюкозидов в сырье стевии / Е.Е. Курдюков // **Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.** – 2018. – № 3 (47). – С. 43 – 49.

3. Курдюков, Е.Е. К вопросу стандартизации по содержанию флавоноидов листьев стевии как нового вида лекарственного растительного сырья / Е.Е. Курдюков, А.В. Кузнецова, Е.Ф. Семенова, И.Я. Моисеева // **Химия растительного сырья.** – 2019. – № 1 DOI: 10.14258/jcprtm.2019014067.

4. Курдюков, Е.Е. Исследование влияния растительного сбора «Стелинол» на выживаемость и психоэмоциональный фон крыс в условиях экспериментального метаболического синдрома / Е.Е. Курдюков, И.Я. Моисеева, О.А. Водопьянова, Е.Ф. Семенова, Р.О. Кондратьев // **Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.** – 2018. - № 4 (48). – С. 81 – 87.

5. Semenova, E. Use of Physicochemical Method for Evaluation of Mucilage Producing Ability of the *Linum usitatissimum* L. Seeds / E. Semenova, E. Kurdyukov, N. Mezhennaya, V. Presnyakova, E. Presnyakova, D. Goncharov, I. Moiseeva, S. Kolesnikova, Y. Moiseev // The 2nd International Symposium on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine, KnE Energy & Physics, 2018. – Dubai, UAE Knowledge E. - P. 462–469. DOI 10.18502/ken.v3i2.1852

6. Presnyakova, E. Information and analytical aspects of *Linum usitatissimum* L. cultivation: biodiversity and directions of use in Russia / E. Presnyakova, E. Kurdyukov, E. Semenova// Abstracts of the conference “Information Technologies in the Research of Biodiversity” (BIT - 2018). Irkutsk: ISDCT SB RAS, 2018. – P. 78-80

7. Semenova, E. Quality control of diterpenoid glucosides as a main bioactive markers of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves / E. Semenova, E. Kurdyukov, N. Glebova, A. Kuznetsova, I. Moiseeva, N. Gavrilova, S. Kolesnikova // Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine. The 3rd International Symposium October 15-17, 2018: Book of Abstracts. Moscow MEPHI, 2018. - P. 208-209

8. Kurdyukov, E. Three steps for the determination of flavonoid contents as an approach to standardization of *stevia* leaves for biomedicine / E. Kurdyukov, E. Semenova, I. Moiseeva, S. Kolesnikova, O. Rodina, Ya. Moiseev, A. Kuznetsova // Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine. The 3rd International Symposium October 15-17, 2018: Book of Abstracts. Moscow MEPHI, 2018. - P. 147-148

9. Курдюков, Е.Е. Фармакогностическая характеристика сырья стевии (*steviae folia* – стевии листья) / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова, Т.П. Жужжалова, В.С. Преснякова, Е. В. Преснякова // Научные труды ВНИИСС. – Воронеж: ЦНТИ, 2018. – С. 152 -166

10. Курдюков, Е.Е. Химический состав стевии различного происхождения / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова, А.А. Горбунова, Ю.А. Шелудякова, А.А. Биктимирова, К.А. Ульянычева // «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» / Сб. ст. III Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов [Электронный ресурс]. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2018. – С.469 - 472

11. Курдюков, Е.Е. Химический состав растительного сбора «Стелинол» / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семёнова, А.А. Горбунова, К.А. Ульянычева, Т.А. Пономарёва, Ю.А. Шелудякова // Материалы научно-методической конференции с международным участием «Современные проблемы естествознания» (г. Пенза, 23-24 марта 2018) – Пенза: Изд-во ПГУАС, 2018. – С.36-40

12. Semenova, E. Use of physicochemical method for evaluation of mucilage producing ability of the *Linum usitatissimum* L. seeds / E. Semenova, E. Kurdyukov, N. Mezhennaya, V. Presnyakova, E. Presnyakova, D. Goncharov, I. Moiseeva, Y. Moiseev, S. Kolesnikova // Physics, Engineering and

Technologies for Biomedicine. The 2rd International Symposium October 10-14, 2017: Book of Abstracts. Moscow MERPИ, 2017. - P. 379-381

13. Курдюков, Е.Е. Определение микробиологической чистоты сырья льна и стевии / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова // Сб. ст. VI Междунар. науч. конф. «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» АПМНО-2017 (г. Пенза, 14-15 сентября 2017 г.) – Пенза: Изд-во ПГУ, 2017. – С.137-140

14. Семенова, Е.Ф. Антимикробная активность извлечений из сырья стевии / Е.Ф. Семенова, Е.Е. Курдюков, А.И. Шпичка // Сб. ст. VI Междунар. науч. конф. «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» АПМНО-2017 (г. Пенза, 14-15 сентября 2017 г.) – Пенза: Изд-во ПГУ, 2017. – С. 144-146

15. Разработка фитокомпозиций лечебно-профилактического действия / Е.Е. Курдюков, Е. Ф. Семенова, И. Я. Моисеева, А. В. Митишев, Е. В. Жученко. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2017. – 114 с.

16. Определение токсичности *in vitro* / Е. Ф. Семенова, А. В. Митишев, А. И. Шпичка, И. Я. Моисеева, Е.Е. Курдюков, Е. В. Жученко, П. С. Тимашев. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2017. – 52 с.

17. Семенова, Е.Ф. О методических подходах разработки инновационных фармацевтических продуктов на основе сырья *Stevia rebaudiana* Bertoni / Е.Ф. Семенова, Е.В. Преснякова, Т.М. Фадеева, А.И. Шпичка, Е.Е. Курдюков, Н.А. Меженная // Научные труды ВНИИСС. – Воронеж: ЦНТИ, 2014. – С. 191-196

18. Курдюков, Е.Е. Разработка биологически активной добавки к пище «Стелинол» / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова, И.Я. Моисеева, Т.М. Фадеева, А.Д. Изгарова // IX Международная научно-практическая конференция «Новые медицинские технологии в охране здоровья здоровых, в диагностике, лечении и реабилитации больных». – Пенза: Изд-во ПГУ, 2014. – С. 20-23

19. Семенова, Е.Ф. О разработке биологически активной добавки к пище «Стелинол» / Е.Ф. Семенова, Т.М. Фадеева, Е.Е. Курдюков, С.Ю. Герасимова, Д.А. Кузнецова // III Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области». Москва: ФГУП НТЦ «Информрегистр», Депозитарий электронных изданий, 2013. – С.74 – 79

20. Фадеева, Т.М. Липиды лекарственного сырья льна и определение липолитической активности / Т.М. Фадеева, Е.Е. Курдюков, О.В. Понкротова // Сборник научных статей V Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Гомель, 7-8 мая 2013 года). - ГомГМУ, 2013. - Том 4. – С. 110-112

21. Курдюков, Е.Е. Фармакологическое действие лекарственного растительного сырья и препаратов на основе льна / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова // Материалы II Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны», Пенза, 26 – 27 октября 2012 г. - Москва: ФГУП НТЦ «Информрегистр», Депозитарий электронных изданий, 2012. – С. 275-279

22. Курдюков, Е.Е. Фармакологически ценная форма льна культурного / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова, И.Я. Моисеева // Медицинские технологии в охране здоровья здоровых, в диагностике, лечении и реабилитации больных: сб. ст. VIII науч.-практ. конф. с междунар. участием [Электронный документ] / под ред. В. И. Струкова. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2012. – С. 110-112

23. Семенова, Е.Ф. Фармакологическая и пищевая ценность семян льна культурного *Linum usitatissimum* L. / Е.Ф. Семенова, Т.М. Фадеева, Е.В. Преснякова, Е.Е. Курдюков, О.А. Водопьянова // IV Международный студенческий научный форум 2012 (электронная конференция). – Москва: РАЕ, 2012. – www.rae.ru/forum2012. – С. 1-9.

24. Курдюков, Е.Е. Содержание омега-кислот в липидах семян льна / Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова // XVIII межрегиональная научная конференция памяти академика Н.Н. Бурденко «Актуальные вопросы медицины» / Сборник научных трудов. - Пенза: Издательство ПГУ, 2012. – С.135-136