

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

КУРДЮКОВ ЕВГЕНИЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

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

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Семенова Елена Федоровна

ПЕНЗА - 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

- БАС – биологически активные соединения
БС - бактериостатический эффект
БЦ - бактерицидный эффект
ГОСТ – государственный стандарт
ГСО – Государственный стандартный образец
ГФ – Государственная фармакопея
ДЗП – диагностически значимые признаки
ЗОР - зона отсутствия роста
ЛРП – лекарственный растительный препарат
ЛР – лекарственное растение
ЛРС – лекарственное растительное сырье
НД – нормативная документация
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
ПС - полисахариды
Рк - рост культуры
РСО – рабочий стандартный образец
СТА - стафилококкагар
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр
ФС – фармакопейная статья

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| ГЛАВА 1. БОТАНИКО-ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЫРЬЯ ЛЬНА И СТЕВИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 17 |
| 1.1. Ботаническое описание..... | 17 |
| 1.1.1. Лен посевной (обыкновенный)..... | 17 |
| 1.1.2. Стевия Ребо..... | 17 |
| 1.2. Морфолого-анатомическая характеристика..... | 19 |
| 1.2.1. Льна посевного семена..... | 19 |
| 1.2.2. Стевии листья..... | 20 |
| 1.3. Химический состав | 21 |
| 1.3.1. Льна посевного семена | 21 |
| 1.3.2. Стевии листья | 24 |
| 1.4. Использование в медицине и фармации сырья производящих растений..... | 28 |
| 1.4.1. Лен посевной (обыкновенный) | 28 |
| 1.4.2. Стевия Ребо | 30 |
| ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1..... | 33 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 34 |
| 2.1. Объекты исследования..... | 34 |
| 2.2. Методы исследования..... | 36 |
| 2.2.1. Методы стандартизации сырья..... | 36 |
| 2.2.1.1. Морфолого-анатомическое исследование..... | 36 |
| 2.2.1.2. Определение проявляемости диагностически значимых признаков..... | 36 |
| 2.2.1.3. Методика количественного определения компонентов в сборе..... | 37 |
| 2.2.1.4. Определение сухого остатка жидких экстрактов | 37 |
| 2.2.2. Химические методы анализа..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3. Хроматографические методы..... | 39 |
| 2.2.4. Физико-химические методы анализа..... | 40 |
| 2.2.5. Гравиметрические методы..... | 45 |
| 2.2.6. Капиллярный электрофорез..... | 46 |
| 2.2.7. Титриметрические методы..... | 47 |
| 2.2.8. Определение физико-химических констант жирного масла..... | 48 |
| 2.2.9. Микробиологические методы анализа..... | 48 |
| 2.2.10. Фармакологические методы анализа..... | 49 |
| 2.2.10.1. Исследование влияния настоя из сбора «Стелинол» на выживаемость и уровень глюкозы крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом | 49 |
| 2.2.10.2. Исследование психоэмоциональной активности настоя из сбора «Стелинол»..... | 50 |
| 2.2.10.3. Изучение острой токсичности настоя из сбора «Стелинол»..... | 50 |
| 2.2.11. Статистические методы обработки результатов исследования.... | 51 |
| ГЛАВА 3. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЬНА ПОСЕВНОГО СЕМЯН..... | 52 |
| 3.1. Внешние признаки | 52 |
| 3.2. Микроскопический анализ..... | 54 |
| 3.3. Слизеобразующие свойства..... | 56 |
| 3.4. Химический состав..... | 61 |
| 3.4.1. Основной компонентный состав..... | 61 |
| 3.4.2. Аминокислотный состав..... | 63 |
| 3.4.3. Жирнокислотный состав..... | 65 |
| 3.4.4. Физико-химические константы жирного масла..... | 71 |
| 3.4.5. Слизеобразующие полисахариды | 75 |
| ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3..... | 76 |
| ГЛАВА 4. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТЕВИИ ЛИСТЬЕВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ | 78 |

| | |
|---|-----|
| 4.1. Внешние признаки и органолептические свойства..... | 78 |
| 4.2. Микроскопический анализ..... | 79 |
| 4.3. Химический состав..... | 82 |
| 4.3.1. Основной компонентный состав..... | 82 |
| 4.3.2. Экстрактивные вещества..... | 83 |
| 4.3.3. Аминокислотный состав..... | 84 |
| 4.3.4. Сумма дитерпеновых гликозидов..... | 87 |
| 4.3.5. Качественный анализ фенольных веществ в стевии листьях..... | 92 |
| 4.3.6. Количественное определение содержания фенольных веществ в стевии листьях | 94 |
| 4.3.6.1. Исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья стевии..... | 94 |
| 4.3.6.2. Сумма флавоноидов | 95 |
| 4.3.6.3. Сумма фенилпропаноидов..... | 100 |
| 4.3.7. Сумма тритерпеновых сапонинов..... | 104 |
| 4.3.8. Сумма органических кислот..... | 105 |
| 4.3.9. Сумма каротиноидов..... | 106 |
| 4.3.9.1. Качественный анализ..... | 106 |
| 4.3.9.2. Количественное определение каротиноидов..... | 107 |
| 4.4. Определение антимикробной активности сырья..... | 108 |
| 4.4.1. Приготовление и стандартизация извлечений..... | 108 |
| 4.4.2. Определение сухого остатка | 108 |
| 4.4.3. Антибактериальные свойства..... | 108 |
| 4.5. Разработка фармакопейной статьи «Стевии листья»..... | 112 |
| 4.5.1. Качественный анализ сырья изучаемого растения..... | 112 |
| 4.5.2. Количественный анализ сырья | 113 |
| 4.5.3. Числовые показатели..... | 114 |
| ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4..... | 116 |

| | |
|---|------------|
| ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СБОРА «СТЕЛИНОЛ»... | 118 |
| 5.1. Теоретическое обоснование компонентного состава сбора и его оптимизация..... | 118 |
| 5.2. Исследование проявляемости диагностически значимых признаков лекарственного растительного сырья в сборе..... | 121 |
| 5.3. Расчет индекса участия компонентов сырья в сборе..... | 121 |
| 5.4. Определение числовых показателей | 122 |
| 5.5. Изучение химического состава..... | 123 |
| 5.5.1. Качественный анализ изучаемого сбора..... | 123 |
| 5.5.2. Количественный анализ изучаемого сбора..... | 124 |
| 5.6. Определение острой токсичности настоя из сбора «Стелинол»..... | 127 |
| 5.7. Исследование анксиолитической активности настоя из сбора «Стелинол»..... | 128 |
| 5.8. Оценка влияния настоя из сбора «Стелинол» на выживаемость и психоэмоциональный фон крыс с экспериментальным сахарным диабетом..... | 129 |
| 5.9. Оценка влияния настоя из сбора «Стелинол» на уровень гликемии крыс с экспериментальным сахарным диабетом | 132 |
| ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5..... | 133 |
| ОБЩИЕ ВЫВОДЫ..... | 134 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 136 |
| БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК | 137 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ..... | 160 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А. Проект фармакопейной статьи «Стевии листья»..... | 161 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Проект фармакопейной статьи сбора «Стелинол»..... | 171 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты о внедрении результатов диссертационной работы | 178 |

ВВЕДЕНИЕ

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 жирнокислотного 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 семена».

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 разработок 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).

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».

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.

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, состоящий 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.

ГЛАВА 1. БОТАНИКО-ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЫРЬЯ ЛЬНА И СТЕВИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 . Ботаническое описание

1.1 .1. Лен посевной (обыкновенный)

Лен культурный (обыкновенный или посевной) - *Linum usitatissimum* L. - однолетнее растение из семейства льновых (*Linaceae*) с прямостоячими тонкими стеблями высотой 50-120 (до 160) см, со слабым восковым налетом. Относится к порядку - льновые (*Linales*), семейству - льновые (*Linaceae*), роду - лен (*Linum*), виду - лен обыкновенный (*Linum usitatissimum* L.) [43, 44].

Различают разновидности лен-долгунец и лен масличный, к которому относятся лен-межеумок и лен-кудряш [53].

Характерной особенностью стеблей льна является сильное развитие в них механической ткани. Стебли и ветви у всех сортов льна хорошо облиственные. Листья сидячие, очередные, ланцетные или линейно-ланцетные, мелкие, часто покрыты восковым налетом. Цветки 1,0 - 2,5 см в диаметре. В каждом цветке пять чашелистиков, пять голубых, фиолетовых лепестков, пять нормальных тычинок с голубыми или желтыми пыльниками, чередующихся с пятью недоразвитыми тычинками, пестик с верхней 5-гнездной завязью и пятью столбиками, заканчивающимися булавовидными синими рыльцами. Плод - яйцевидная или шаровидная коробочка. В каждой коробочке по десять плоских блестящих семян от желтой до темно-коричневой окраски длиной 2-6 мм. Цветет в июне-июле, плоды созревают в августе-сентябре [43, 51, 86].

1.1.2. Стевия Ребо

Стевия Ребо, или стевия медовая - *Stevia rebaudiana* Bertoni — многолетнее травянистое растение, которое относится к отделу высших растений — *Kormobionta*, типу покрытосеменных — *Angiospermae*, классу

двудольных — *Dicotyledoneae*, порядку сложноцветных — *Compositales*, семейству астровых — *Asteraceae*, роду стевия — *Stevia*, виду — стевия Ребо *Stevia rebaudiana* Bertoni [23, 73, 114, 182].

Растения стевии очень отличаются между собой по форме стеблей и побегов. В зависимости от длины и количества боковых побегов, угла крепления их к стеблю и наличия листьев, выделяют больше десяти форм растений стевии [91, 114].

В климатических условиях Средневолжского региона встречаются формы куста: цилиндрическая или удлинённая, коническая форма, овальная, обратно-трапециевидная, шаровидная, развесистая, обратно-конусообразная или пирамидальная, пирамидальная, веретенообразная форма [16, 17, 46, 115].

Высота кустов, в зависимости от климатических условий года и влажности почвы, составляет от 40 до 100 см. Растения первого года развития имеют один главный стебель с боковыми стеблями. На 2-3-й год стеблей отрастает столько, сколько было заложено почек на корневище. В тех странах, где стевия растёт как многолетняя культура, количество стеблей достигает 80 и больше. В наших условиях стевия растёт как однолетняя культура и количество почек, которые закладываются в конце вегетации на корневищах, колеблется от 1-2 до 18-19 [59, 131].

Корневая система мочковатая, состоит из придаточных корней, расположенных ярусами. В зависимости от влажности почвы она проникает на глубину 25 - 30 см [114, 115].

Цветки у стевии очень маленькие двуполые, пятичленные. Венчик белого цвета с фиолетовым оттенком у основания, трубчатый. Цветки собраны в корзинки (по пять цветков), которые формируют сложное соцветие – щиток. Пять тычинок прикреплены к трубке венчика. [114, 131].

Плод семянка, длиной 3-4 мм и шириной до 1 мм. Масса 1000 штук семян 0,6 г. Зрелые семена обладают высокой полевой всхожестью - до 96% и

прорастают на 3-й день. Всхожесть семян на 2-й год остается на уровне 80%. Цветет в сентябре, продолжительность цветения - 2-3 месяца [132].

Интродуцированное из горного пояса тропиков растение не переносит отрицательных температур, угнетения растений не наблюдается при среднесуточных температурах 13 - 19 °С. Объясняется это тем, что в ареале стевии температура воздуха колеблется от +6 до +43 °С и, в среднем, составляет 23 °С [45, 91].

Основной лимитирующий фактор для стевии - влага. В почве её должно быть 70 - 85 %, но не выше. В естественных условиях ареала происхождения стевия не произрастает в низинах с повышенной влажностью и на сухих вершинах холмов [182]. Тропическое происхождение обусловило реакцию растения на длину светового дня, но не на интенсивность света. В условиях тропиков отмечается нормальное развитие растения в зимний период, когда продолжительность прямого солнечного освещения находится в пределах 0,5 - 3,0 часа в день. Цветение в это время наблюдается такое же многоразовое, как и в летнем, светлом сезоне [167].

Для получения высоких урожаев стевии пригодны почвы различных типов с нейтральной реакцией, глубоким пахотным слоем, богатые органическими и минеральными веществами, хорошо аэрируемые [45, 46, 91].

1.2 . Морфолого-анатомические особенности

1.2.1. Льна посевного семена

Льна семена, яйцевидной формы, неравнобокие, заостренные с одного конца и округленные с другого, длиной до 6,5 мм, толщиной до 3,5 мм. Поверхность гладкая, блестящая, со светло желтым семенным рубчиком. Цвет семян варьируется от светло-желтого до темно-коричневого [34, 36].

При рассмотрении поперечного среза семени хорошо видны: кожура в виде темно-бурой полосы, эндосперм и зародыш. При большом увеличении ясно различаются слои семенной кожуры. Эпидермис состоит из крупных

четырёхугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, содержащих слизь. Под эпидермисом лежат один или два ряда паренхимных клеток. Третий слой представлен механической тканью, состоящей из одного ряда утолщенных, одревесневших желтых клеток. Эндосперм состоит из многоугольных клеток и содержит алейроновые зерна и капли жирного масла [34, 36].

1.2.2. Стевии листья

Облиственность растений стевии определяется количеством листьев на кусте, их формой, размером, углом отклонения от стебля, размером и длиной междоузлий. Размещение листьев на стебле супротивное. Листья сидячие, с очень короткими черенками. В пазухе каждого листочка находится почка, которая дает начало боковому побегу. Стевии листья мелкие, многочисленные. Их количество на одном кусте колеблется от 350 до 1200. Большие листья размещаются на основном стебле в нижней его части, а в верхней более мелкие. Величина стевии листьев зависит от разновидности растения и от условий выращивания. Листья опушены с обеих сторон, однако менее интенсивно, чем стебель. Края листовой пластинки с острыми зубчиками, цвет зеленый или темно-зеленый. Форма листовой пластинки овальная. Насчитывают до девяти групп листьев разной формы: эллипсовидные, удлинённые, клиновидные, ромбовидные, ланцетовидные, яйцевидные и др. [13, 62, 110].

Эпидермис стевии листьев состоит из изодиаметрических клеток, покрытых тонким слоем кутикулы. Устьица аномоцитного типа формируются на верхней и нижней сторонах листа. Волоски имеют коническую форму, прямые или изогнутые, состоят из 6-9 клеток [62, 131].

1.3 . Химический состав

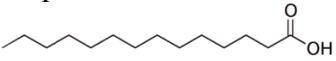
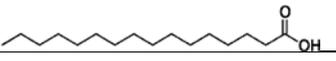
1.3.1. Льна посевного семени

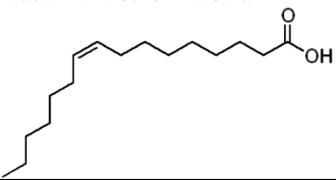
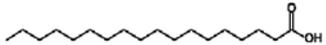
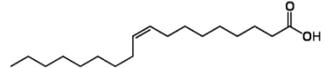
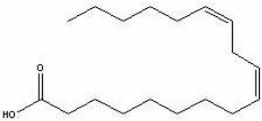
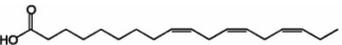
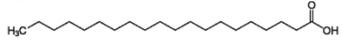
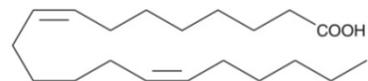
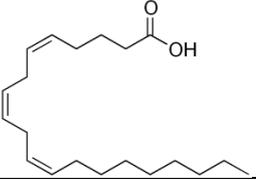
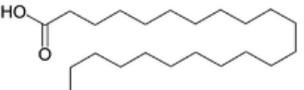
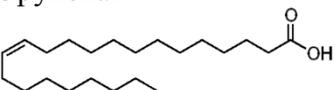
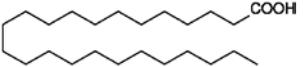
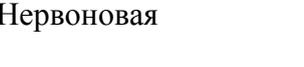
Протеинами в льняном семени являются альбумин и глобулин. Льняной белок характеризуется высоким содержанием разветвленных аминокислот (валин + лейцин + изолейцин), которое определяет значение отношения Фишера. Соотношение разветвленных аминокислот (РАК) к содержанию ароматических кислот (ААК) является показателем, который учитывают при использовании белковых препаратов в качестве функционального питания ослабленных и истощенных больных при таких заболеваниях как рак, ожоги, травмы и поражения кишечника, а также для усиленного питания детей при хронической или острой диарее или аллергиях на протеины молока [48, 67].

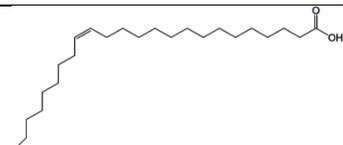
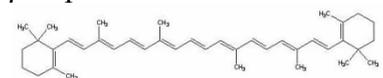
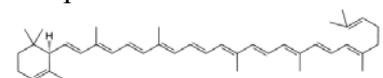
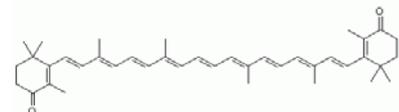
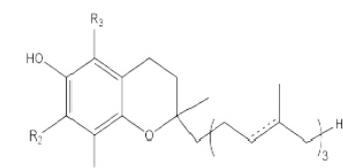
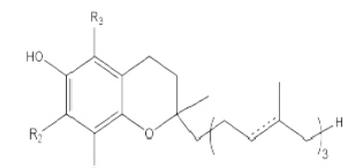
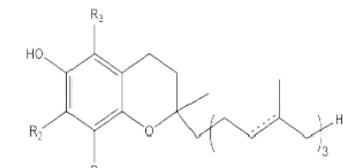
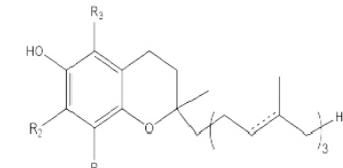
Льна семена, содержат жирного масла от 25 до 49%, слизи до 15%, стерины: кампестерол, β -ситостерин, циклоартенол; цинк, железо, фосфолипиды: фосфатидилхолин, фитогликолипид, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол; белки 15–35%, углеводы 10-27 %, полисахариды 7-30%; стерины, магний, марганец, органические кислоты, лигнаны (секоизоларицирезинол), флавоноиды (изориентин, луценин, виценин), фенолокислоты (*n*-кумаровая, кофейная, феруловая, синаповая). Семена концентрируют селен [9, 72, 88, 125].

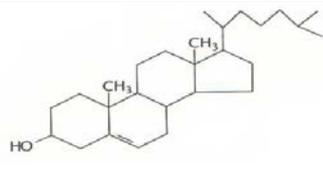
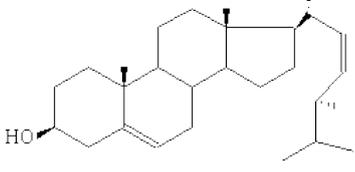
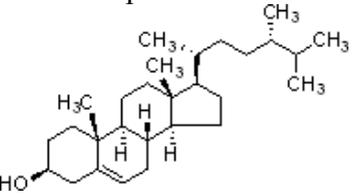
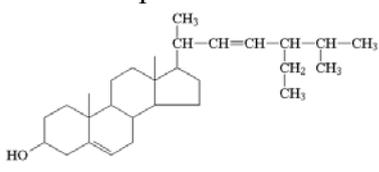
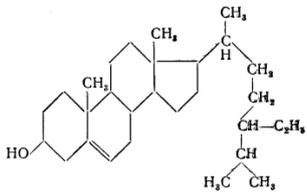
В состав жирного масла входят глицериды линолевой (до 35%), линоленовой (до 45%), олеиновой (до 20%), стеариновой и пальмитиновой кислот. Кроме того, в льна семенах содержатся каротиноиды, витамины группы В, Е, D и минеральные соли (табл.1) [11, 37, 38, 122].

Таблица 1 - Химический состав льна посевного семян

| № п/п | Соединение / Структурная формула | Брутто-формула, Систематическое название (IUPAC), молекулярная масса, г/моль |
|----------------|--|--|
| Жирные кислоты | | |
| 1. | Миристиновая  | $C_{14}H_{28}O_2$ тетрадекановая кислота 228,37 |
| 2. | Пальмитиновая  | $C_{16}H_{32}O_2$ гексадекановая кислота |

| | | |
|-----|---|---|
| | | 256,40 |
| 3. | Пальмитолеи-новая  | $C_{16}H_{30}O_2$ цис-9-гексадекановая кислота 254,45 |
| 4. | Стеариновая  | $C_{18}H_{38}O_2$ октадекановая кислота 284,48 |
| 5. | Олеиновая  | $C_{18}H_{34}O_2$ цис-9-октадекановая 282,46 |
| 6. | Линолевая  | $C_{18}H_{32}O_2$ цис-9; цис-12-октадекаденовая кислота 294,48 |
| 7. | Линоленовая  | $C_{18}H_{30}O_2$ цис-9-12-15-октадекатриеновая кислота 292,46 |
| 8. | Арахидиновая  | $C_{20}H_{40}O_2$ эйкозановая кислота 312,53 |
| 9. | Гондоиновая  | $C_{20}H_{38}O_2$ цис-11-эйкозеновая кислота 310,59 |
| 10. | Эйкозодиеновая  | $C_{20}H_{36}O_2$ 5Z,14Z-эйкозодиеновая кислота 308,57 |
| 11. | Эйкозатриеновая  | $C_{20}H_{34}O_2$ цис-8,-11,-14 –эйкозатриеновая кислота 306,55 |
| 12. | Бегеновая  | $C_{22}H_{44}O_2$ докозановая кислота 340,67 |
| 13. | Эруковая  | $C_{22}H_{42}O_2$ цис-13-докозановая 338,65 |
| 14. | Лигноцерининовая  | $C_{24}H_{48}O_2$ тетракозановая кислота 368,71 |
| 15. | Нервоновая  | $C_{24}H_{46}O_2$ цис-15-тетракозановая 366,69 |

| | | |
|---------------------|--|--|
| |  | |
| Каротиноиды | | |
| 16. | α-каротин  | $C_{40}H_{56}$ - 536,87 |
| 17. | β-каротин  | $C_{40}H_{56}$ - 536,87 |
| 18. | δ-каротин  | $C_{40}H_{56}$ - 536,87 |
| 19. | Ксантофилл  | $C_{40}H_{56}O_2$ - 568,68 |
| Токоферолы | | |
| 20. | α-токоферол  $R_1=R_2=R_3=CH_3$ | $C_{29}H_{54}O_2$ 6-окси-2-метил-2-(4,8,12-триметилтридецил)-хроман 434,82 |
| 21. | β-токоферол  $R_1=R_3=CH_3, R_2=H$ | $C_{28}H_{52}O_2$ - 420,79 |
| 22. | γ-токоферол  $R_1=R_2=CH_3, R_3=H$ | $C_{28}H_{52}O_2$ - 420,79 |
| 23. | δ-токоферол  $R_1=R_2=R_3=H$ | $C_{25}H_{46}O_2$ - 378,70 |
| Фитостероиды | | |
| 24. | Холестерин | $C_{27}H_{46}O$ (10 <i>R</i> , 13 <i>R</i>)-10,13- |

| | | |
|-----|---|---|
| |  | диметил-17-(6-метилгептан-2-ил)- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н-циклопента нфенантрен-3-ол 386,65 |
| 25. | Брассикастерин  | $C_{27}H_{44}O$ (10 <i>R</i> ,13 <i>R</i>)-10,13- диметил-17-(6-метилгептен-2-ил)- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н-циклопента нфенантрен-3-ол 384,53 |
| 26. | Кампестерин  | $C_{28}H_{49}O$ (10 <i>R</i> ,13 <i>R</i>)-10,13- диметил-17-(5,6-диметилгептан-2-ил)- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н-циклопента нфенантрен-3-ол 401,69 |
| 27. | Стигмастерин  | $C_{28}H_{47}O$ (10 <i>R</i> ,13 <i>R</i>)-10,13- диметил-17-(6-метил-5-диэтилгептен-3-ил-2)- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н-циклопента нфенантрен-3-ол 399,67 |
| 28. | Ситостерин  | $C_{29}H_{51}O$ (10 <i>R</i> ,13 <i>R</i>)-10,13- диметил-17-(6-метил-5-диэтилгептан-2-ил)- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н-циклопента [α]фенантрен-3-ол 415,79 |

При хроматографических анализах было установлено, что льна семена содержат цианогенные гликозиды: линустигин, лотаустралин, линамарин и неолинустигин, которые могут влиять на фармакологическое и токсикологическое действие препаратов, полученных из данного сырья [128, 160]. Однако сырье современных сортов льна изучено недостаточно.

1.3.2. Стевии листья

Химический состав разновидностей стевии еще малоизучен. В стевии листьях обнаружены дитерпеновые гликозиды: стевииозид, ребаудиозиды А, В, С, Д и Е, дулиобиозид, стевиины Е, F, G, H, стевииолбиозид (табл. 2, 3) [133,

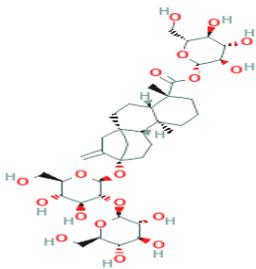
142, 155, 186]. Известно, что сладость высушенных стевии листьев не уменьшается при хранении более 60 лет. Суммарное содержание веществ гликозидного комплекса в листьях колеблется от 5,5 до 25,5 % от массы сухих листьев [12, 94, 101, 116, 119].

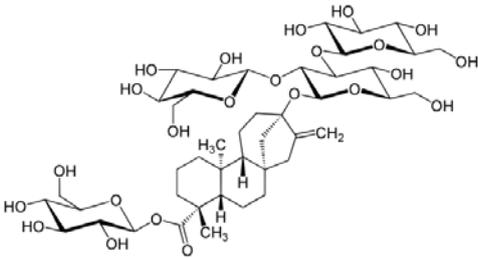
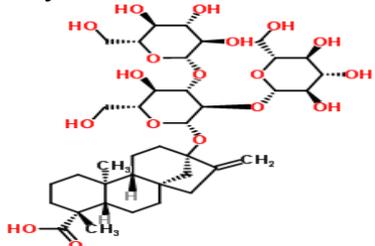
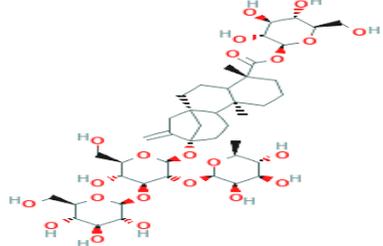
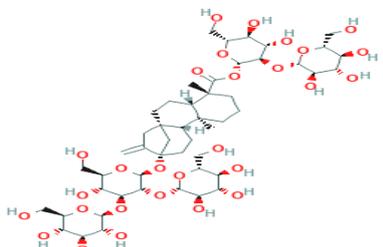
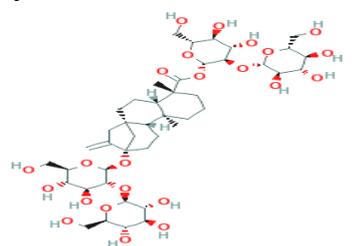
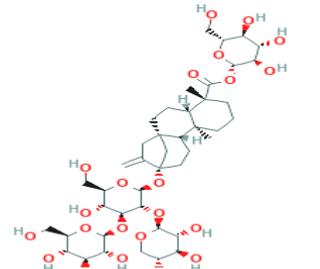
Таблица 2 - Основные сладкие компоненты в стевии листьях

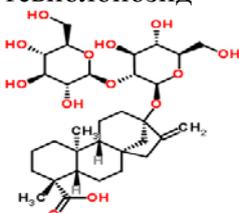
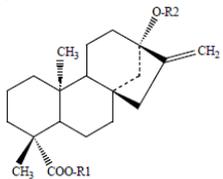
| Компоненты | Содержание, % от сухой массы | Температура плавления, °С | Брутто-формула |
|---------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Стевиозид | 2,0 – 15,5 | 197 – 198 | $C_{38}H_{60}O_{18}$ |
| Ребаудиозид А | 0,3 – 3,8 | 235 – 238 | $C_{44}H_{70}O_{23} \cdot 3H_2O$ |
| Ребаудиозид В | 0,03 – 0,07 | 193 – 195 | $C_{38}H_{60}O_{18} \cdot 2H_2O$ |
| Ребаудиозид С | 0,1 – 1,4 | 216 – 218 | $C_{40}H_{64}O_{20} \cdot 2H_2O$ |

Кроме комплекса дитерпеновых гликозидов в стевии листьях обнаружены биологически активные вещества других классов химических соединений. В стевии листьях содержится эфирное масло, которое представляет собой густую прозрачную жидкость, желтого цвета со специфическим запахом. Его концентрация составляет 0,025 – 0,160 % в листьях и 0,420 % в соцветиях. Эфирное масло содержит более 310 компонентов, 48 из которых к настоящему времени идентифицированы. Основными компонентами терпеноидного комплекса являются: кариофиллен-оксид (17,31 %), спатунелол (8,05 %), β -кариофиллен (7,51 %), β -неролидол (6,42 %), фарнезол (5,30 %), β -элимен (2,90 %), метилхавикол (2,27 %), тимол (1,38 %), ундекановая кислота (1,24 %) [68, 95, 108, 135, 171, 183].

Таблица 3 - Характеристика основных биологически активных соединений листьев стевии.

| № п/п | Соединение / Структурная формула | Брутто-формула Температура плавления (°С) Mr, г/моль |
|-------|--|--|
| 1. | Стевиозид  | $C_{38}H_{60}O_{18}$ 196-198 804,88 |

| | | |
|----|--|---|
| 2. | <p>Ребаудиозид А</p>  | <p>$C_{44}H_{70}O_{23}$ 242-244 967,01</p> |
| 3. | <p>Ребаудиозид В</p>  | <p>$C_{38}H_{60}O_{18}$ 193-195 804,37</p> |
| 4. | <p>Ребаудиозид С</p>  | <p>$C_{44}H_{70}O_{22}$ 215-217 951,022</p> |
| 5. | <p>Ребаудиозид D</p>  | <p>$C_{50}H_{80}O_{28}$ 283-286 1129,162</p> |
| 6. | <p>Ребаудиозид Е</p>  | <p>$C_{44}H_{70}O_{23}$ 205-207 967,021</p> |
| 7. | <p>Ребаудиозид F</p>  | <p>$C_{43}H_{68}O_{22}$ 202-204 936,995</p> |

| | | |
|----|--|---|
| 8. | Стевиолбиозид  | $C_{32}H_{50}O_{13}$ 188-192 642,32 |
| 9. | Дулкозид А  $R_1 - \beta\text{-Glc}$ $R_2 - \beta\text{-Glc-}\alpha\text{-Rha}(2 \rightarrow 1)$ | $C_nH_nO_n$ 193-195 788,0 |

Кроме того, стевии листья содержат растительные липиды, клетчатку (целлюлозу), полисахариды, витамины: аскорбиновую кислоту, тиамин, бета-каротин, рибофлавин, микроэлементы: магний, кальций, железо, натрий; антиоксиданты: оксикоричные кислоты, флавоноиды, кумарины (табл. 4); дубильные вещества, сапонины, свободные сахара, 17 аминокислот, в том числе незаменимые и другие соединения [45, 93, 167, 174].

Таблица 4 – Фенольные соединения в стевии листьях

| Название | Брутто-формула | Температура плавления, °С |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Флавоноиды | | |
| Кверцетин | $C_{15}H_{10}O_7$ | 309 – 311 |
| Гваяверин | $C_{20}H_{18}O_{11}$ | 254 – 258 |
| Рутин | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | 180 – 190 |
| Кверцитрин | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 184 – 187 |
| Производные коричной кислоты | | |
| Кофейная кислота | $C_9H_6O_4$ | 206 – 209 |
| Хлорогеновая кислота | $C_{16}H_{16}O_9$ | 205 – 207 |
| Производные кумарина | | |
| Скополетин | $C_{10}H_8O_4$ | 203 – 205 |
| Умбеллиферон | $C_9H_6O_3$ | 232 – 234 |

В стевии листьях были обнаружены липиды. Анализ жирных кислот показал, что в стевии листьях содержатся жирные кислоты: пальмитиновая, линоленовая, линолевая, олеопальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты [95].

1.4 . Использование в медицине и фармации сырья производящих растений

1.4.1. Лен посевной (обыкновенный)

Лекарственные растительные препараты на основе сырья льна, обладают отхаркивающим, смягчающим, обволакивающим, противовоспалительным и легким слабительным действиями [42, 63, 66, 138, 166].

Основную роль в формировании фармакологического эффекта играют полиненасыщенные жирные кислоты. Омега-3 жирные кислоты снижают концентрацию липопротеидов низкой плотности, улучшают приток кислорода к тканям, снижают воспалительные процессы в организме. Омега-6 жирные кислоты стабилизируют обменные процессы в организме, снижают психоэмоциональное напряжение. Омега-9 жирные кислоты стабилизируют уровень глюкозы в крови, повышают иммунный статус организма, повышают эластичность кровеносных сосудов, снижают уровень холестерина в крови. Токоферолы поддерживают репродуктивные процессы, препятствующие атеросклеротическим изменениям. Фитостерины оказывают адаптогенное действие [2, 5, 20, 22, 134].

Выраженное обволакивающее действие связано с большим содержанием гликозида линамарина и слизесодержащих полисахаридов. Обволакивающие вещества защищают от раздражения чувствительные нервные окончания слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и используются как противовоспалительные средства при энтероколитах и гастритах, особенно при повышенной секреторной активности желудка. Под их влиянием понижается всасывание из кишечника инфекционных токсинов, вызывающих интоксикацию организма [47, 60, 153, 154, 159]. Слизистые льна семян не перевариваются в кишечнике, создавая объем и придавая чувство насыщения. Образуют тонкий слой коллоидных растворов на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, который предохраняет от раздражения. Слой слизи удерживается довольно долго, проявляя защитное действие при воспалении. Слизесодержащие полисахариды являются естественными

адсорбентами, пригодными для профилактики многих заболеваний. Адсорбируют вредные вещества, в том числе экотоксиканты. Усиливают перистальтику. Не дают пище долго находиться в тонком кишечнике, где осуществляется всасывание, препятствуют всасыванию жиров и сахаров. Этим и обусловлено слабительное действие льна семян. Основной причиной нарушения обмена веществ является неправильное питание. Растительные сборы с семенами льна оказывают положительное действие при профилактике многих заболеваний, в том числе нарушения обмена веществ [63, 111, 113, 150, 173]

Льняное масло улучшает обмен веществ, нормализует артериальное давление, уменьшает вероятность образования тромбов, способствует выведению из организма холестерина. Масло льна семян снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний и уменьшает аллергические реакции [50, 113, 141, 172, 175].

Льна посевного семена и масло оказывают лечебное действие при атеросклерозе, раке груди, болезни Альцгеймера и очень полезно для женщин, особенно в период пред- и менопаузы, так как помогает регулировать естественный гормональный фон [42, 66, 92, 177, 178].

Компресс «Горчично-льняной» (ПФ "Сарепта", Украина) применяется в виде аппликаций при лечении вирусных и легочных заболеваний (грипп, ОРЗ, бронхит, воспаление легких и др.) [63, 100].

Согласно фармакологической классификации лекарственных растений Сыроежко Н.В., Блиновой К.Ф. и Лесиовской Е.Е., лен можно отнести к следующим группам лекарственных растений (табл. 5): Iг; IVв, з; XII в.

Таблица 5 - Фармакологическая классификация льна

| Заболевания | Группа лекарственных растений | Фармакологический эффект | Подгруппа лекарственных растений |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Сердечно-сосудистой системы | I | Антиатеросклеротический | г |
| Желудочно-кишечного тракта | IV | - Обволакивающий | в |
| | | - Гастропротекторный | з |
| Эндокринной системы | XII | - Антидиабетический | в |

Льна семена используют в диетическом питании у больных с нарушением жирового обмена, с атеросклерозом, ишемической болезнью сердца, а так же у больных при заболевании сахарным диабетом, циррозом печени, гепатитом, жировых гепатозах [63, 92, 111, 143, 165].

1.4.2. Стевия Ребо

Благодаря высокому содержанию биологически активных соединений, витаминов, макро- и микроэлементов стевию рекомендуют лицам, употребляющим недостаточное количество свежих фруктов и овощей, в частности, жителям Крайнего Севера [84, 96, 158, 169].

Стевии листья обладают фармакологическими эффектами для профилактики и лечения таких заболеваний, как сахарный диабет, заболевания печени, сердечно-сосудистые заболевания, ожирение и зубной кариес. Соединения, извлеченные из экстракта листьев, обладают противоопухолевым и цитостатическим свойством. Исследования показали эффекты экстрактов из листьев стевии и их элементов тормозящие действие на прогрессирование опухоли. Стевиозид, стевиол, изостевиол и их метаболиты, ингибируют промотирование опухоли путем блокирования индукции раннего антигена Эпштейна-Барра (EBV-EA), а также путем уменьшения образования опухоли [76, 77, 87, 144, 146].

Извлечения из сырья стевии повышают физическую и умственную работоспособность. Стевию необходимо принимать спортсменам и людям, занимающихся тяжелой физической или напряженной умственной работой. Высокое адаптогенное действие обуславливает необходимость и безопасность длительного ее применения: в научной литературе нет ни одного сообщения о токсичности и мутагенности, а также о противопоказаниях в употреблении [114, 162, 187, 188].

Установлено положительное влияние сырья стевии на органы пищеварительной системы. Стевия оказывает благотворный эффект на функцию поджелудочной железы и печени. В результате исследований

установлено гипогликемическое действие стевии, что дает возможность ее применения при заболевании сахарным диабетом. Благодаря уникальному свойству не повышать уровень глюкозы в крови ее применяют лица, больные сахарным диабетом. Употребление стевиозида препятствует развитию гипо- и гипергликемических состояний, приводит к нормализации обмена веществ. У людей, у которых уровень сахара находится в норме, при употреблении стевии он не снижается. Стевия не повышает уровень сахара в крови даже в концентрации, в десять раз превышающей ее среднесуточное потребление. Стевия обладая комплексом биологически активных соединений и являясь бескалорийной, нормализует углеводный обмен в организме [114, 132, 137, 164].

Возможно применение стевии при гипертонической болезни, так как стевиозиды способны понижать системное артериальное давление. Показано также диуретическое действие стевиозидов. Длительное их использование вызывает кардиотонический эффект, оказывая положительное влияние на функцию сердечно-сосудистой системы [23, 84].

Доказана возможность применения стевии при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Бактерицидные свойства проявляются и при заживлении ран [73, 136, 157, 163, 176, 184]. Водный настой стевии является косметическим средством для ухода за кожей, угнетает рост бактерий, вызывающих воспаление сальных желез и образование угрей [77].

Извлечения из листьев стевии повышают иммунный ответ организма, что безусловно важно не только при их профилактике, но и в лечении других болезней [107, 109, 114].

Содержащиеся в стевии вещества обладают антиоксидантными свойствами (витамин С, β -каротин, Zn, Se), что позволяет использовать ее сырье при отравлениях радионуклидами. Мягкое диуретическое действие растения способствует выведению солей тяжелых металлов, шлаков, продуктов обмена из организма. Употребление продуктов на основе стевии замедляет процессы старения [39, 96, 156, 185].

Лекарственные растения классифицируют на потенциальные, перспективные и эффективные. Потенциальными лекарственными растениями считаются виды, проявившие тот или иной фармакологический эффект в опытах, но не прошедшие клинические испытания. Перспективными являются виды, возможность применения которых в медицине установлена, но в настоящее время они не используются либо из-за незавершенности работ в области фармакологии и клинической проверки, способов сбора сырья, либо несовершенства технологии переработки, недостаточности природных ресурсов. Эффективные производящие лекарственные растения - это ботанические виды, используемые в качестве официальных (фармакопейных). Согласно фармакологической классификации лекарственных растений Сыроежко Н.В., Блиновой К.Ф. и Лесиовской Е.Е., стевию можно отнести к следующим группам лекарственных растений (табл. 6): Iб; IIIв; IVд; V; IX;XI в;XII в;XIII [108, 110], что дает основание рассматривать стевию как перспективное лекарственное растение.

Таблица 6 - Фармакологическая классификация стевии

| Заболевания | Группа лекарственных растений | Фармакологический эффект | Подгруппа лекарственных растений |
|--------------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------------|
| Сердечно-сосудистой системы | I | Гипотензивный | б |
| Центральной нервной системы | III | Тонизирующий и адаптогенный | в |
| Желудочно-кишечного тракта | IV | Гепатопротекторный | д |
| Инфекционно-воспалительные | V | –Бактерицидный* –Бактериостатический* | – |
| Иммунной системы | IX | Иммуномодулирующий | – |
| Отравления, контакт с радионуклидами | XI | –Антиоксидантный* –Выводит соли тяжелых металлов из организма | в |
| Эндокринной системы | XII | – Антидиабетический – Нормализует углеводный обмен* | в |
| Кожи | XIII | Противовоспалительный* | – |

Примечание: * - отмечены эффекты, выявленные нами на основании анализа литературных данных и которые не выделены в классификации.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.

1. Анализ литературных источников показал, что в настоящее время возделывается большое количество новых сортов льна посевного, отличающихся по химическому составу.

2. Проведение сравнительного исследования фармакогностических признаков льна семян, получаемых от новых сортов этого растения с целью возможности применения их в медицине, представляется актуальной задачей.

3. Стевия успешно культивируется на территории Российской Федерации, однако недостаточная степень изученности данного растения ограничивает возможности его использования в медицинской практике.

4. Льна посевного семена и стевии листья обладают ценными фармакологическими свойствами для профилактики алиментарно-зависимых заболеваний.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1 . Объекты исследования

В качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) для разработки растительного сбора использовали высушенные стевии листья и льна посевного семена в порошкованном, измельченном и цельном виде, собранные в различные фазы вегетации растений в период с июля по сентябрь 2015 г. Подбор компонентов и оптимизацию состава проводили с учетом правил составления фитокомпозиции лечебного и профилактического действия [112].

Объектом исследования служили семена 21 сорта льна (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). Сырье льна заготавливали на территории Пензенской области (Рис.1).

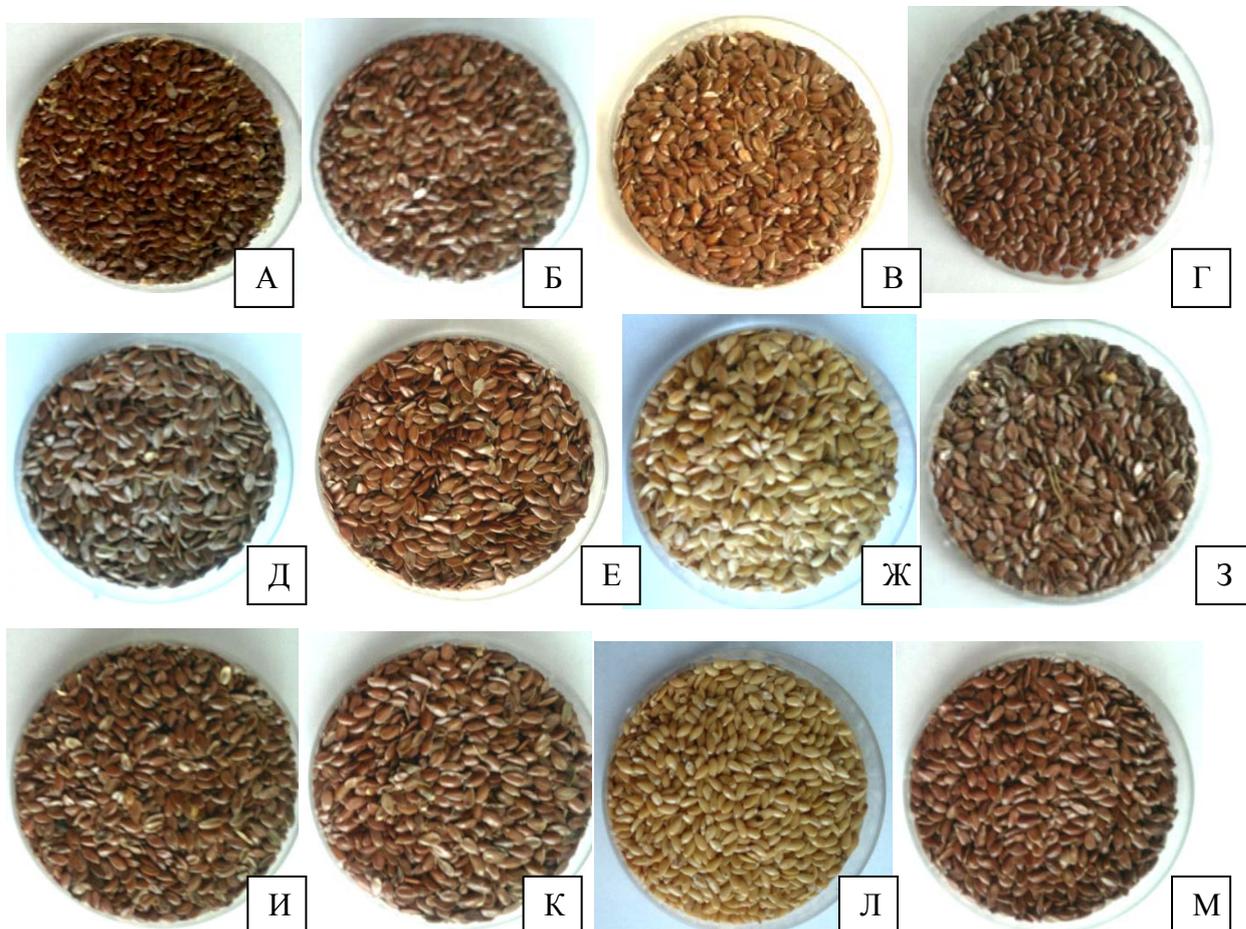


Рисунок 1 – Сырье некоторых изучаемых современных сортов льна:
А - Алексим, Б - Арктический, В - Бахмальский, Г - Белинка, Д – ВНИИМК 620,
Е – ВНИИМК 622, Ж - ВНИИМК 630, З – Исилькульский, И – Кинельский
2000, К – Кустанайский янтарь, Л - Небесный, М - Санлин

Для определения физико-химических констант использовались 6 образцов жирного масла: масло льна Северный, масло льна Исток (2014), масло льна Исток (2008), масло льняное нерафинированное пищевое (Васильева Слобода), масло льняное салатное (Царевщино), масло льняное с Селеном (Льняная диета).

Образцы лекарственного растительного сырья стевии: свежие листья, высушенные листья, измельченное сырье из высушенных листьев 3 сортов (Рамонская сластена, Услада, София), выращенных в условиях выщелоченного чернозёма и серых лесных почв (рис. 2), высушенные листья сорта Рамонская сластена, выращенного в условиях Тверской области, Краснодарского края, Республики Крым, а также импортное сырье стевии из Индии и Парагвая.



Рисунок 2 - Изучаемые сорта стевии:

А – Рамонская сластена; Б – Услада; В – София

Заготовку, сушку и хранение сырья проводили в соответствии со специальными требованиями для отдельного вида сырья [33, 34, 36].

Все сырье хранили в тканевых мешках, картонных пачках, при комнатной температуре, в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII издания (15-25 °С) [32, 36].

Объемы изучения составили 200 образцов сырья, 6 образцов фитопрепаратов, 250 микропрепаратов и более 1000 микрофотографий.

2.2 . Методы исследования

2.2.1 . Методы стандартизации сырья

2.2.1.1 . Методы морфолого-анатомического исследования

Методами экспериментальных исследований являлись макроскопический и микроскопический анализы как составные части фармакогностического анализа [52, 104]. Макроморфологию изучали визуально и при помощи стереоскопической лупы. Микроскопию микропрепаратов проводили с использованием микроскопов МИКМЕД-1, БИОМЕД-6 (кратность увеличения 40×, 100×, 400×). Фотографирование микро- и макрообъектов проводили цифровыми фотокамерами Nikon Coolpix 2500, Nikon Coolpix 6300, Panasonic DMC-FX100. Для обнаружения жирного масла микропрепарат на предметном стекле помещали в каплю раствора Судана III, накрывали покровным стеклом. В результате реакции наблюдали оранжево-желтое окрашивание, что подтверждает наличие в препарате жирного масла. Статистическую обработку морфометрических данных и описания микропрепаратов осуществлялось в соответствии с современной методической и справочной литературой [24, 98].

2.2.1.2 . Определение проявляемости диагностически значимых признаков

Определение проявляемости диагностически значимых признаков проводилось в лекарственном растительном сырье, являющемся компонентами сбора «Стелинол», в соответствии с методикой предложенной Самылиной И.А. [97, 98, 104].

Для анализа использовали порошки, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Наблюдение проводили с использованием микроскопов МИКМЕД-1, БИОМЕД-6 (кратность увеличения 40×, 100×, 400×). Фотографирование микро- и макрообъектов проводили цифровыми фотокамерами Nikon Coolpix 2500, Nikon Coolpix 6300, Panasonic DMC-FX100. Исследование проводили в 10 повторностях. При подсчете учитывали сумму диагностически незначимых частиц, сумму диагностически значимых частиц, общую сумму частиц.

2.2.1.3 . Методика количественного определения компонентов в сборе

Количественное определение компонентов в сборе осуществляли в соответствии с методикой, предложенной Самылиной И.А. [97, 104].

Наблюдение проводили с использованием микроскопов МИКМЕД-1, БИОМЕД-6 (кратность увеличения 40×, 100×, 400×). Фотографирование микро- и макрообъектов проводили цифровыми фотокамерами Nikon Coolpix 2500, Nikon Coolpix 6300, Panasonic DMC-FX100.

2.2.1.4 . Определение сухого остатка жидких экстрактов

Определение сухого остатка спиртового экстракта и настоя, полученных из лекарственного растительного сырья стевии, осуществляли согласно методике ГФ РФ XIV издания [35].

Приготовление лекарственных форм из листьев стевии.

а) Настой 1:10 готовили массообъемным способом в соответствии с требованиями XIV Государственной фармакопеи. Для приготовления настоя измельченное лекарственное растительное сырье заливали стерильной водой комнатной температуры, взятой с учетом коэффициента водопоглощения ($K = 2$), и настаивали в соответствии с требованием ГФ РФ XIV.

б) Спиртовый экстракт (1:10) был получен методом дробной мацерации. Для приготовления экстракта рассчитанное количество измельченного сырья поместили в бюретки с кранами (отдельную для каждого сорта), залили

частью экстрагента в объеме 3 мл. Оставили на сутки при комнатной температуре, после чего вытяжку слили, а оставшееся сырье залили второй порцией экстрагента в объеме 2 мл. Данную операцию повторяли каждые сутки до обесцвечивания сырья, сливая готовую вытяжку и добавляя чистый экстрагент 2:1,5:1,5 мл соответственно. На пятые сутки, после того как слили вытяжку, сырье отжали. Оставшимся экстрагентом довели объем экстракта до 10 мл.

в) Сок готовили путем отжима из измельченных свежих листьев стевии.

2.2.2. Химические методы анализа

В ходе предварительного анализа химического состава сырья были проведены качественные реакции на основные группы биологически активных соединений.

Цианидиновая реакция (проба Синода), реакция с раствором натрия гидроксида, реакция с аммиаком, реакция с солями железа (III) использовались для доказательства наличия флавоноидов в сырье стевии [14, 61, 124].

Реакции пенообразования, осаждения солями бария использовались для доказательства наличия сапонинов в сырье стевии [61, 124].

Реакции с раствором щелочи (аммиака), с хлористоводородной кислотой использовались для доказательства наличия полисахаридов в семенах льна [61, 124].

Определение химического состава сырья осуществляли согласно следующим методикам: содержания белка - методом титрования в аппарате Кьельдаля; содержания жира –методом обезжиренного остатка в аппаратах Сокслета (в качестве экстрагента использовали петролейный эфир); содержания фосфора - путем озоления по Пиневиц в модификации Куркаева – спектрофотометрическим -методом при длине волны 670 нм; содержание клетчатки – методом по Геннебергу и Штоману в модификации ЦИНАО [25, 61, 103, 124].

2.2.3. Хроматографические методы

1. Газо-жидкостная хроматография.

Изучение жирно-кислотного состава масла льна семян проводили методом газо-жидкостной хроматографии после предварительного перевода жирных кислот в метиловые эфиры по методике ГОСТ 31665 - 2012. Лабораторную пробу жидкого растительного масла тщательно перемешивали, отобранную навеску массой 0,1 г помещали в стеклянную пробирку и растворяли в 2,0 см³ гексана. В гексановый раствор вводили 0,1 см³ раствора метилата натрия в метаноле молярной концентрации 2 моль/дм³. После интенсивного перемешивания в течение 2 мин реакционную смесь отстаивали 5 мин и центрифугировали в течение 10 мин. Отбирали для анализа верхний прозрачный слой – 1 мкл. Анализ проводили на газовом хроматографе «Кристалл 2000М». В ходе исследования использовали колонку капиллярную НР-FFAP, длиной 50 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной фазы 0,50 мкм. Подготовленную анализируемую пробу в объеме 1 мкл вводили в испаритель газового хроматографа. Газом-носителем являлся азот, давление газа-носителя - 100 кПа, скорость потока – 50 мл/мин. Разделение компонентов масла осуществляли при следующих хроматографических условиях: температура испарителя – 280 °С, температура термостатов колонок – режим программы температур 140 - 220 °С [36, 74]. Определение жирно-кислотного состава масла осуществляли по времени выхода метиловых эфиров соответствующих жирных кислот. Общее время анализа составляло 1 час 35 минут с детектором по ионизации пламени. Полученные в ходе эксперимента значения сравнивали по времени удерживания с результатами экспериментальных данных, полученных при газохроматографическом анализе стандартов веществ, в качестве которых использовали смесь метиловых эфиров высших жирных кислот [27, 28, 29, 75, 128].

2. Тонкослойная хроматография.

В работе использовали хроматографические пластинки «Силуфол УФ-254», «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ». Пластинки для ТСХ-анализа предварительно выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение часа с целью их активирования [54].

Методика обнаружения для всех объектов исследования заключалась в следующем: на линию старта хроматографической пластинки размером 10x15 см наносили с помощью капилляра для хроматографии извлечение из растительного сырья. Хроматографические камеры предварительно насыщали парами растворителей в течение 40-60 минут. Анализ проводили, когда фронт растворителя достигал 7-8 см. Полученные хроматограммы после хроматографического анализа высушивали и просматривали при дневном свете, затем в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм. На хроматографической пластинке отмечали особенности свечения зон веществ, после чего хроматограммы обрабатывали реактивами: щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты при нагревании [4, 54, 75, 120, 130].

2.2.4. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия

С помощью УФ-спектрофотометрии определяли содержания суммы фенилпропаноидов, флавоноидов, тритерпеновых сапонинов, каротиноидов, дитерпеновых гликозидов в извлечениях из стевии листьев, а также в сборе на ее основе [7, 8, 10, 40, 74, 118]. Проводили исследование 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.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в стевии
листьях

Для количественного определения суммы флавоноидов в извлечениях из стевии листьев использовали метод дифференциальной спектрофотометрии [14, 15, 41, 57, 70, 71, 152, 161].

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта различной концентрации (40%, 70% и 95%) и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане при температуре 90°C в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Измеряли оптическую плотность 1 раствора через 30 минут после приготовления. 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл алюминия хлорида раствора 3% в спирте 70% и через 10 мин 2 капли разведенной кислоты уксусной. Объем раствора доводили спиртом этиловым (40%, 70% 95%) до метки, перемешивали и оставляли на 30 минут (раствор Б).

Оптическую плотность полученного раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя раствор сравнения для испытуемого раствора.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 2 \times 1 \times 50 \times 25 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО цинарозида;

m_0 – масса ГСО цинарозида, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

2) С использованием удельного показателя поглощения рутина.

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

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

где: A – оптическая плотность раствора;

350 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в стевии листьев

Для количественного определения суммы фенилпропаноидов в извлечениях из стевии листьев использовали метод прямой спектрофотометрии [49, 58, 69].

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

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

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.

Методика количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов в стевии листьев

Для количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов в извлечениях из стевии листьев использовали метод прямой спектрофотометрии [10, 99].

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта 95% и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане при температуре 90°C в течение 45 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждали до комнатной температуры. После охлаждения содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и доводили 95% этиловым спиртом до метки и перемешивали. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Измеряли оптическую плотность 1 раствора через 40 минут после приготовления. 0,5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, разбавляли в 30 мл спирта 95%. Объем раствора доводили спиртом этиловым 95% до метки и оставляли на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 203 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя раствор сравнения для испытуемого раствора [4].

Содержание суммы дитерпеновых гликозидов в процентах (X) в пересчете на стевииозид и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 50 \times 1 \times P \times 100}{D_0 \times m \times 2 \times 0,5 \times 25 \times 25 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора рабочего образца;

m_0 – масса рабочего образца, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Методика количественного определения каротиноидов в стевии
листьях

Для количественного определения каротиноидов в извлечениях из сырья стевии использовали спектрофотометрический метод. Для этого 5 г листьев

стевию (точная навеска, степень измельчения – 1 мм) помещали в колбу вместимостью 100 мл и экстрагировали с 25 мл гексана при перемешивании 1,5 ч. Затем фильтровали через бумажный фильтр. Отбирали 2 мл извлечения в мерную колбу на 25 мл и доводили гексаном до метки. Определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-104 при длине волны 450 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм, относительно гексана. Параллельно относительно воды очищенной измеряли оптическую плотность раствора РСО калия бихромата, который готовили в соответствии с ФС–42–1730–86, а именно: 0,3600 г (точная навеска) калия бихромата растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 1 л и доводили объем до метки водой; раствор по окраске соответствует раствору, содержащему 0,00208 мг β-каротина в 1 мл. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную [81].

Содержание суммы каротиноидов в сырье стевию (X) в пересчете на β-каротин в мг% рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times 0,00208 \times 25 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 2 \times (100 - W)}$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО калия бихромата;

0,00208 – количество β-каротина, мг, в растворе, соответствующем по окраске раствору РСО калия бихромата;

m – навеска шрота, г;

Методика количественного определения каротиноидов льна посевного
семян

Для количественного определения каротиноидов в льна семенах использовали спектрофотометрический метод [81, 99]. При анализе снимали спектр раствора масла в петролейном эфире в интервале 400-500 нм, вычисляли оптическую плотность при длине волны наиболее интенсивного максимума и определяли содержание каротиноидов в граммах в пересчете на β-каротин

Методика количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов в стевии листьях

Для количественного определения сапонинов в извлечениях из сырья стевии использовали спектрофотометрический метод, основанный на реакции с концентрированной кислотой серной, с последующим измерением оптической плотности [105]. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора РСО олеаноловой кислоты в аналогичных условиях эксперимента. Получены спектры продуктов реакции суммы тритерпеновых сапонинов стевии и стандарта олеаноловой кислоты с серной кислотой [4, 105].

Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в листьях стевии в пересчете на олеаноловую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 250 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 5 \times 20 \times 1 \times 25 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_0 \times 500000}{D_0 \times m \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО олеаноловой кислоты;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса РСО олеаноловой кислоты, г;

W – влажность сырья, %.

2. Фотоэлектроколориметрия

Количественный анализ токоферолов производили по Эммери - Эпгелю, то есть по окрашенным продуктам, которые образуются при восстановлении токоферолами хлорного железа и последующего взаимодействия двухвалентного железа с α, α_1 -дипиридиллом [31, 99]. Оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 520 нм.

2.2.5. Гравиметрические методы

Методика количественного определения суммы полисахаридов в льна семян

Для количественного определения суммы полисахаридов в семенах льна использовали методику ГФ РФ XIV издания [36].

Методика определения слизиобразующей способности льна семян

Для оценки динамики гидратации семян льна использовали 1-миллилитровые медицинские шприцы, в которые помещали семена объемом 0,30 мл и заливали дистиллированной водой до 1 мл. Затем через временные промежутки: 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72 часа - проводили определение степени слизиобразования по увеличению объема выборки семян каждого сорта. Количественное определение гидратированных полисахаридов осуществляли взвешиванием семян до и после помещения в воду [179].

Методика определения влажности лекарственного растительного сырья

Влажность лекарственного растительного сырья определяли фармакопейным методом ГФ РФ XIII, ГФ РФ XIV [33, 35].

Методика определения экстрактивных веществ

Методика используется для определения содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье, которые в последующем подвергаются процессу однократной экстракции по методике ГФ РФ XIII издания [33, 56, 78].

2.2.6. Капиллярный электрофорез

Изучение аминокислотного состава листьев стевии и семян льна проводили методом капиллярного электрофореза [80].

Навеску пробы № 1 массой (100,0±0,2) мг помещали в виалу для гидролиза, добавляют 10 см³ соляной кислоты, герметично закрывали завинчивающейся крышкой и перемешивали.

Навеску пробы № 2 массой (100,0±0,2) мг помещали в фарфоровую чашку, добавляют 5 см³ свежеприготовленной окислительной смеси и выпаривали при постоянном перемешивании в струе теплого воздуха при температуре 60 °С досуха. Сухой остаток количественно переносили в виалу для гидролиза, используя 10 см³ соляной кислоты. Виалу герметично закрывали завинчивающейся крышкой и перемешивали.

Навеску пробы № 3 массой (100,0±0,2) мг помещали в виалу для гидролиза, добавляли 5 см³ горячего раствора гидроксида бария. Виалу герметично закрывали завинчивающейся крышкой и перемешивали.

Устанавливали виалу в сушильный шкаф. Гидролиз проводили при температуре 110 °С в течение 14-16 ч.

Подготовленные для анализа растворы переносили в пробирки и центрифугируют в течение 5 мин при скорости вращения 5000 об/мин.

Подготавливали капилляр к работе. Для каждого раствора регистрировали не менее двух электрофореграмм.

Массовую долю каждой аминокислоты (X, %) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{100 \times V_{\text{гидр}} \times V_{\text{кон}} \times C_{\text{изм}}}{1000 \times m \times V_{\text{ал}}},$$

X – массовая доля аминокислоты в пробе, %;

C_{изм} – измеренное значение массовой концентрации аминокислоты в подготовленном растворе, мг/дм³;

m – масса навески пробы, мг;

V_{гидр} – общий объем гидролизата, см³;

V_{кон} – объем конечного (анализируемого) раствора, см³;

V_{ал} – объем аликвотной порции гидролизата, взятый для получения ФТК-производных, см³;

100 – множитель для выражения результатов в процентах;

1000 – коэффициент согласования размерности единиц измерения объема.

2.2.7. Титриметрические методы

Методы титриметрии использовали для установления содержания свободных органических кислот с помощью алкалометрии, согласно методики ГФ РФ XIV издания [36].

2.2.8. Определение физико-химических констант жирного масла

Такие физико-химические константы, как йодное число, эфирное число, перекисное число, число омыления, индекс окисленности, устанавливали методами, принятыми ГФ РФ XIII издания и в соответствии с ГОСТ Р ИСО 3961–2010 [26, 30, 33, 35, 123].

Определение неомыляемых веществ, летучих веществ, примесей парафина, воска, смоляных и минеральных масел, цианиды, синильная кислота устанавливали методами, принятыми ГФ РФ XIII издания [33, 35].

2.2.9. Микробиологические методы анализа

Индикация антимикробного эффекта сока, настоя и спиртового экстракта из лекарственного сырья стевии проводилась путем диффузии в агар на питательной среде с целью определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. В эксперименте использовали 10 чистых культур микроорганизмов различного таксономического происхождения: *Escherichia coli*, *Mycococcus species*, *Staphylococcus species (albus)*, *Bacillus species (anthracoides)*. Посев в опытах осуществляли прямыми радиальными штрихами и сплошным газоном, количество вносимого в чашки Петри материала находилось на уровне $10^2 \dots 10^3$ колониобразующих единиц. В лунки диаметром 8 мм вносили по 0,10 мл настоя, спиртового экстракта или сока. Контроли: I - стерильная вода, II - 95 % этиловый спирт, III - без добавления извлечений и контрольных жидкостей. Культивирование осуществляли при температуре 36°C. Учет результатов проводили через 16-18 часов путем определения диаметра зон задержки (подавления, угнетения, отсутствия) роста, характера роста по штриху. Определение антимикробного действия проводили в сравнении интенсивности роста изучаемых культур в присутствии и в отсутствии извлечений из сырья стевии [21, 33, 65, 79, 83].

2.2.10. Фармакологические методы анализа

2.2.10.1 . Исследование влияния настоя из сбора «Стелинол» на выживаемость и уровень глюкозы крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Для оценки влияния настоя на основе растительного сбора "Стелинол" на состояние углеводного обмена у животных с сахарным диабетом использовали пероральный глюкозотолерантный тест с последующим определением в крови уровня глюкозы [18, 90, 126].

Исследование проводили на базе ООО НПП «Белкор». Испытание проводилось на 72 нелинейных белых крысах женского пола массой 180-280 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей и были одобрены локальным этическим комитетом.

Животные первой группы (N=18) получали стандартный рацион в течение всего эксперимента (45 суток) и являлись интактными. Крысам второй группы (N=18, контроль) моделировали сахарный диабет аллоксаном, вводимым в дозе 137 мг/кг однократно внутрибрюшинно после предварительной 24-часовой депривации пищи при сохранном доступе к воде [100]. Животным третьей (N=18) и четвертой (N=18) групп проводилась фитотерапевтическая коррекция углеводного обмена водным извлечением из фитокомпозиции «Стелинол»: крысам третьей группы «Стелинол» вводили за 1 сутки до моделирования экспериментальной патологии и далее на протяжении всего эксперимента; крысам четвертой группы «Стелинол» вводился, начиная с 1-ых суток от начала формирования экспериментального сахарного диабета и до окончания эксперимента.

2.2.10.2 . Исследование психоэмоциональной активности настоя из сбора «Стелинол»

Оценивали влияние настоя на основе растительного сбора «Стелинол» на психоэмоциональный фон крыс [18, 90, 126].

Проводили исследование двигательной и психоэмоциональной активности крыс в тесте «Открытое поле» [129]. Согласно методическим рекомендациям, нами использовалась квадратная камера (1x1 м) из темного пластика с нижней стенкой, расчерченной на квадраты (10x10 см), с боковыми стенками высотой 50 см, в нижней части которых имелись отверстия диаметром 0,8 см, предназначенные для изучения норковых реакций. Освещение производилось с помощью лампы мощностью 75 Вт, находившейся на высоте 1,5 м над центром поля. В ходе 3-минутного теста на основе визуального наблюдения регистрировались следующие показатели: количество пересеченных сторон квадратов камеры (в центре арены и на периферии) – горизонтальная активность, вставание на задние лапы (обычные и пристеночные стойки) – вертикальная активность, норковые реакции – исследовательская активность [18, 126].

Повышение горизонтальной и вертикальной активности расценивалось как показатель увеличения стрессоустойчивости животных в новых для них условиях, которые воссоздает тест «Открытое поле». Количество эпизодов груминга, дефекации и замирания, а также длительность эпизодов замирания расценивались как показатели эмоционального состояния крыс: возрастание данных показателей интерпретировались как увеличение тревожности и беспокойства, снижение - как показатель анксиолитического действия исследуемого фитопрепарата [18].

2.2.10.3. Изучение острой токсичности настоя из сбора «Стелинол»

Острую токсичность настоя сбора «Стелинол» изучали на 20 белых беспородных половозрелых крысах мужского пола массой 200-220 г.

Животных разделили на 2 группы, по 10 крыс в каждой. Одна группа получала однократно внутривенно настой на основе сбора «Стелинол» в дозе 5 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, а другая группа – очищенную воду в аналогичном объеме. В первый день исследования животные находились под непрерывным наблюдением, в последующие дни осмотр производился два раза в день. Общая продолжительность эксперимента составила 2 недели [5, 78, 87].

2.2.11. Статистическая обработка результатов эксперимента

Статистическую обработку результатов химических и фармакологических экспериментов проводили согласно ГФ РФ XIII издания и руководства по изучению новых фармакологических веществ с использованием расчетных формул в компьютерной программе Microsoft Excel [1, 3, 19, 32].

ГЛАВА 3. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЬНА ПОСЕВНОГО СЕМЯН

На сегодняшний день получено большое количество новых сортов льна, семена которых имеют значительные отличия. Данные семена применяются в пищевой промышленности и как компоненты биологически активных добавок. Также они могут быть применены в целях получения лекарственных растительных препаратов. Проведение сравнительного морфолого-анатомического анализа семян льна современных сортов до настоящего времени не проводилось. В настоящей главе представлены результаты изучения морфологических, анатомо-гистологических признаков семян современных сортов льна обыкновенного, культивируемого на территории Пензенской области (глава 2, раздел 2.1)

3.1. Внешние признаки

Опираясь на данные литературы [33, 43, 86, 147, 148], нами были проанализированы и подтверждены особенности морфологического строения сырья льна. Поверхность семян гладкая, блестящая с явно заметным семенным рубчиком. Цвет семян разнообразен от коричневого до светло-желтого (табл.7, рис.1,3).

Таблица 7 - Внешние особенности льна семян

| № | Название сорта | Окраска семени | Форма верхушки семени |
|----|------------------------|-------------------|--|
| 1 | ВНИИМК 620 | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 2 | Арктикский | коричневая | выражена с загнутым носиком |
| 3 | Кентавр | желтая | сильно выражена с слабо загнутым носиком |
| 4 | Исилькульский | коричневая | выражена с загнутым носиком |
| 5 | ВНИИМК 630 | желтая | выражена с загнутым носиком |
| 6 | Небесный | светло-коричневая | выражена с прямым носиком |
| 7 | Белочка | светло-коричневая | слабо выражена с прямым носиком |
| 8 | Кустанайский янтарь | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 9 | Белинка | светло-коричневая | слабо выражена с прямым носиком |
| 10 | ВНИИМК 622 | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 11 | Карабалыкский | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 12 | Исток | светло-желтая | сильно выражена с загнутым носиком |

| | | | |
|----|-----------------|------------|--|
| 13 | Алексим | коричневая | выражена с загнутым носиком |
| 14 | Сокол | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 15 | Бахмальский | коричневая | слабо выражена слегка загнутым носиком |
| 16 | Санлин | желтая | выражена с прямым носиком |
| 17 | Кинельский 2000 | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 18 | Брестский | коричневая | слабо выражена слегка загнутым носиком |
| 19 | Северный | коричневая | сильно выражена с загнутым носиком |
| 20 | Ручеек | коричневая | выражена с прямым носиком |
| 21 | Линола + | коричневая | слабо выражена с прямым носиком |

Сорта льна можно подразделить на крупносеменные (вес 1000 семян 6,6-13г и более) на мелкосеменные (вес 1000 семян 3-6,5г) (табл. 8).

Таблица 8 - Морфометрическая характеристика льна семян

| № п/п | Сорт | Длина, мм | Ширина, мм | Масса 1000 семян, г |
|-------|---------------------|-----------|------------|---------------------|
| 1 | ВНИИМК 620 | 5,5±0,5 | 2,5±0,5 | 7,962±0,002 |
| 2 | Северный | 5,5±0,5 | 2,0±0,2 | 7,861±0,032 |
| 3 | Карабалыкский | 5,0±0,1 | 2,1±0,1 | 6,894±0,023 |
| 4 | ВНИИМК 622 | 4,8±0,2 | 2,0±0,1 | 6,251±0,034 |
| 5 | Сокол | 5,0±0,1 | 2,9±0,1 | 6,2134±0,05 |
| 6 | Небесный | 4,5±0,1 | 2,2±0,2 | 6,212±0,052 |
| 7 | Бахмальский | 4,5±0,5 | 2,2±0,2 | 6,002±0,045 |
| 8 | Арктикский | 4,2±0,2 | 2,2±0,2 | 5,686±0,051 |
| 9 | Исток | 4,0 ±0,5 | 2,0±0,1 | 5,443±0,041 |
| 10 | Кинельский 2000 | 4,5±0,5 | 2,0±0,1 | 5,444±0,043 |
| 11 | ВНИИМК 630 | 5,0±0,1 | 2,1±0,1 | 5,348±0,051 |
| 12 | Кентавр | 4,5±0,5 | 2,0±0,1 | 4,519±0,033 |
| 13 | Кустанайский янтарь | 4,5±0,5 | 2,0±0,1 | 5,782±0,051 |
| 14 | Исилькульский | 5,0±0,1 | 2,2±0,2 | 4,462±0,034 |
| 15 | Белинка | 4,0±0,5 | 2,2±0,2 | 3,991±0,033 |
| 16 | Белочка | 4,5±0,5 | 2,0±0,1 | 4,423±0,024 |
| 17 | Санлин | 4,5±0,5 | 2,0±0,5 | 4,354±0,043 |
| 18 | Алексим | 4,0±0,5 | 1,8±0,3 | 4,262±0,021 |
| 19 | Брестский | 4,4±0,2 | 2,3±0,2 | 5,234±0,043 |
| 20 | Ручеек | 4,2±0,2 | 2,3±0,2 | 5,131±0,047 |
| 21 | Линола + | 4,5±0,3 | 1,3±0,2 | 5,154±0,046 |

В строении семени льна можно выделить три основные части: оболочку, эндосперм и зародыш (рис.3)

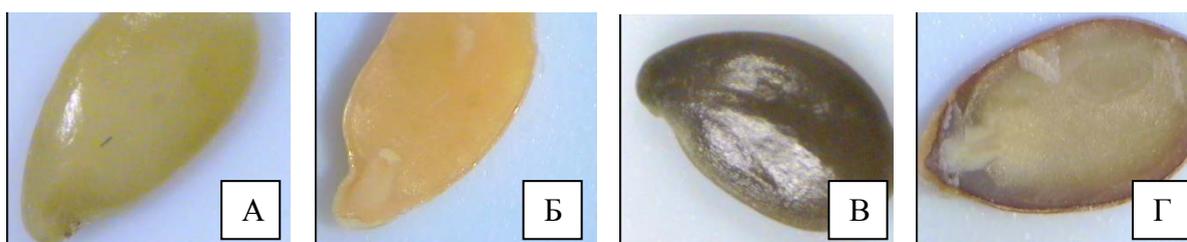


Рисунок 3 - Льна семена А,Б- сорт Санлин; В,Г – сорт Белочка

3.2. Микроскопический анализ

Снаружи семя покрыто тонкой оболочкой. Семенная кожура многослойная и является производным наружного и внутреннего интегументов семяпочки. В ней можно выделить несколько слоев (рис. 4). Наружный слой представлен крупными четырехугольными клетками эпидермиса, имеющими толстый слой кутикулы. Клетки содержат слизь, которая видна на препаратах в виде бесцветной массы при окрашивании срезов черной тушью. При погружении семян в воду клейкое содержимое растворяется в ней и клетки набухают, что приводит к разрыву наружной стенки эпидермиса и слизь вытекает. Боковые стенки клеток данного слоя извилистые. На продольном срезе клетки наружного эпидермиса имеют изодиаметрическую форму.

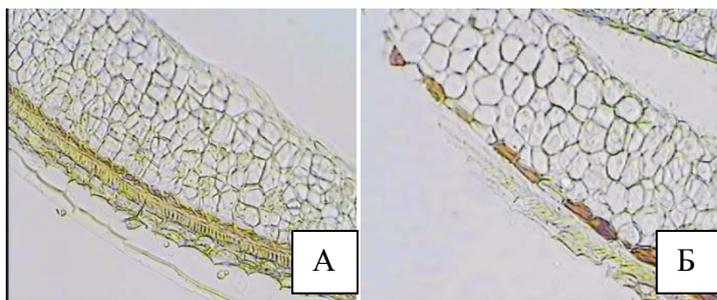


Рисунок 4 - Строение семенной кожуры льна А - сорта Исток (x 100), Б - сорт Северный (x 100)

Под эпидермисом располагается два ряда клеток воздухоносной паренхимы, вытянутых в поперечном направлении. Далее находится один слой клеток механической ткани, которые имеют сильно утолщенные клеточные стенки. На срезе виден слой тонкостенных клеток, располагающихся поперек семени. Самый нижний слой семенной кожуры представлен пигментными клетками, придающими окраску семенам. Клетки этого слоя вытянуты и имеют утолщенные стенки. У светлосемянных сортов этот слой клеток не выражен.

Под оболочкой семени располагается эндосперм, клетки которого более мелкие и имеют многоугольную форму. Клетки этого слоя богаты белком

(аллейроновые зерна) и жиром. На препаратах при окрашивании суданом III капли жирного масла окрасились в оранжевый цвет (рис. 5).

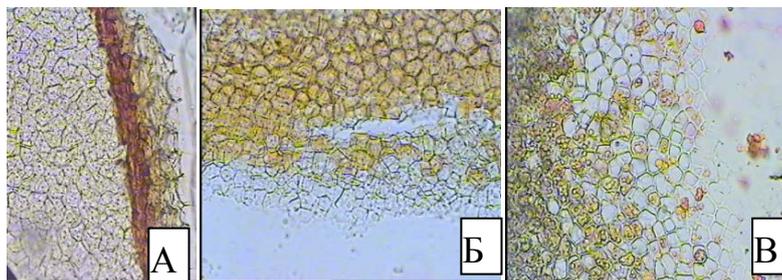


Рисунок 5 - Клетки эндосперма льна семени (x 100): А - Белочка, Б- ВНИИМК 622 (окраска раствором Люголя), В – исток (окраска раствором Судана III)

В семенах зародыш и эндосперм развиты равномерно. Зародыш состоит из корешка, семядольных листочков и почечки (рис. 6).

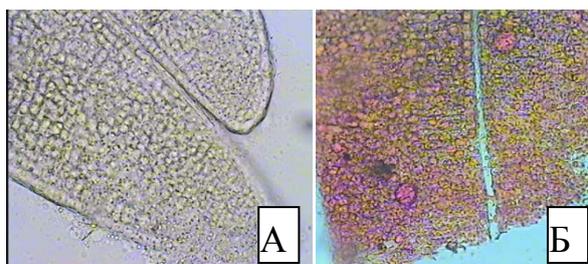


Рисунок 6 - Анатомическое строение зародыша льна семени (x 100):

А – Небесный, Б-Белочка (окраска раствором Судана III)

Различные сорта льна имеют сходное анатомическое строение семени, однако наблюдаются различия в строении клеточной стенки и размерах клеток эпидермального слоя семенной кожуры, а также в особенностях расположения слоев слизи в клетках. У льна сортов Северный, Арктикский, Бахмальский, Санлин клетки вытянуты, наружная клеточная стенка по краям имеет небольшие выросты. При набухании клетки сильно вытягиваются в высоту и отчетливо видны слои расположения слизи. У сорта льна 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.

В строении эпидермального слоя семенной кожуры льна сорта Исток имеется ряд отличительных особенностей: высота клеток меньше, клеточная

стенка имеет выросты, отличающиеся по форме. Кроме того, при набухании форма клеток становится несколько более овальной, чем у предыдущего сорта, слизистые слои не видны.

Таким образом, у изучаемых нами сортов льна наблюдаются различия в строении семенной кожуры, а именно в форме и размерах клеток, в наличии и форме выростов, в расположении слоев слизи, что может иметь важное значение для определения подлинности.

3.3. Слизеобразующие свойства

Благотворное действие льна семян обусловлено наличием большого количества обволакивающих веществ. Это свойство связано с содержанием слизи до 10% и гликозида линамарина. Полисахариды льняного семени обладает также противовоспалительным действием. Кроме того, слизеобразование может являться хемосистематическим признаком внутривидовых таксонов [47, 89, 179]. Сведения, касающиеся межсортовой изменчивости данного показателя, в литературе ограничены [43, 86, 147]. Поэтому представляет интерес сравнительная оценка слизеобразующей способности семян сортов льна различных морфотипов. Показано, что максимальной степенью слизеобразования обладают сорта Бахмальский, Небесный, Кустанайский янтарь. Полученные данные свидетельствуют о наличии морфотипо- и сортоспецифичности слизеобразования и возможности его использования в качестве маркерного признака новых форм *L. usitatissimum*.

Исследование проводили по методике определения слизеобразующей способности льна семян [глава 2, раздел 2.2.4]. Предложенная методика, основанная на определении физико-химических показателей семян, может использоваться для анализа растительных образцов и их дифференцирования по направлениям использования: в качестве жирномасличного или слизесодержащего лекарственного сырья [179].

В ходе опыта для всех сортов обнаружена нелинейная динамика ослизнения. Наибольшее разбухание семян происходит в течение первого часа после погружения в дистиллированную воду, далее происходит замедление. Это дает основание полагать, что слизевые клетки локализируются преимущественно в наружном слое, что также было подтверждено данными микроскопирования. В течение 24 часов отмечается 2-3 периода ускорения и замедления темпов слизиобразования в зависимости от сорта. Последующая экспозиция семян в воде уже не приводит к заметным изменениям объема изучаемых выборок семян, т.е. коллоидных веществ в растворе (рис. 7).

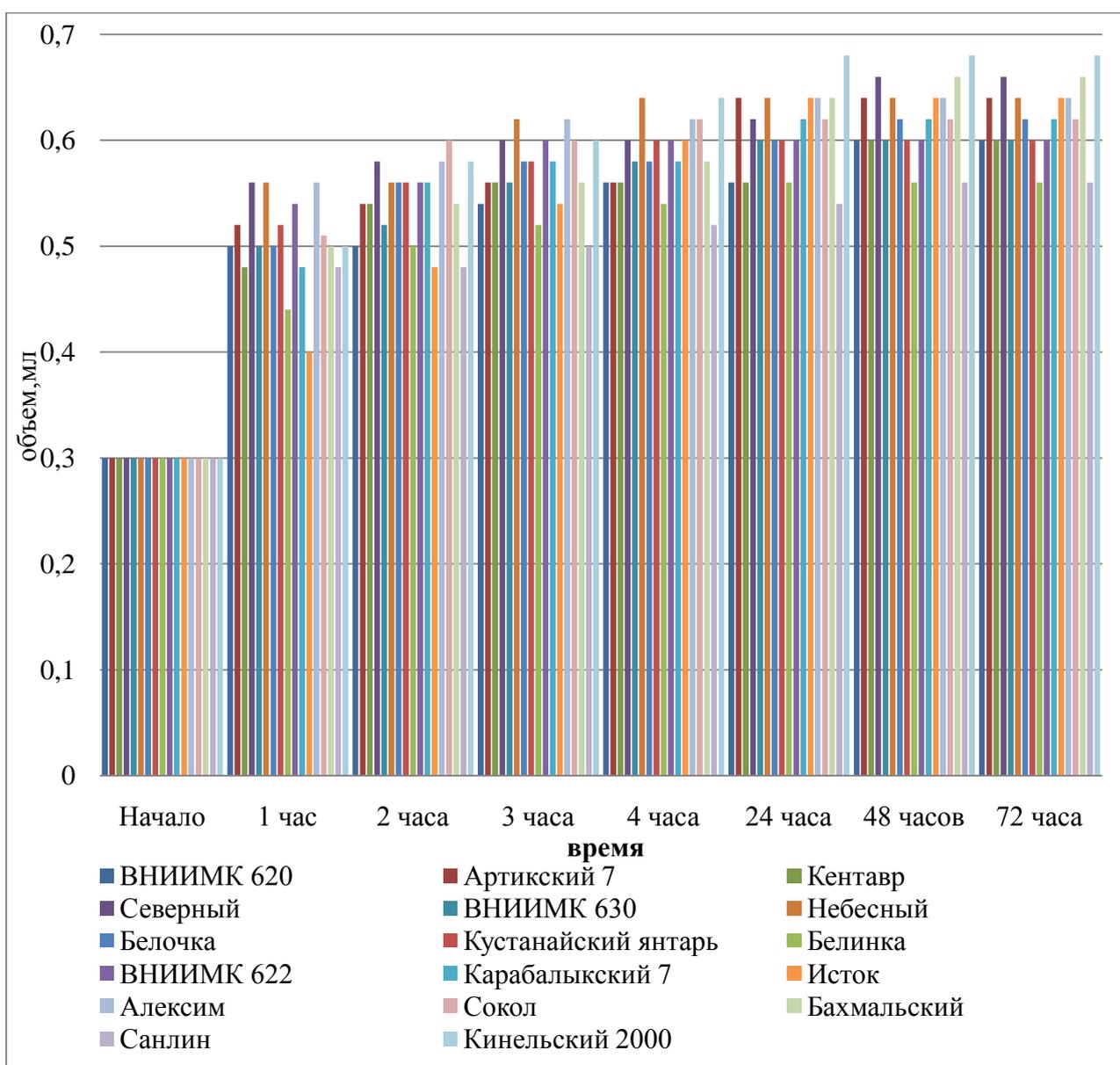


Рисунок 7 - Динамика слизиобразования цельных семян современных сортов льна

Предположительно, обнаруженная динамика увеличения объема гидратированных льна семян связана с одновременным набуханием и переходом в раствор различных фракций слизиобразующих полисахаридов [179]. На основании результатов проведенного эксперимента анализируемые сорта можно разделить на три группы по степени слизиобразования: сорта 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.8).

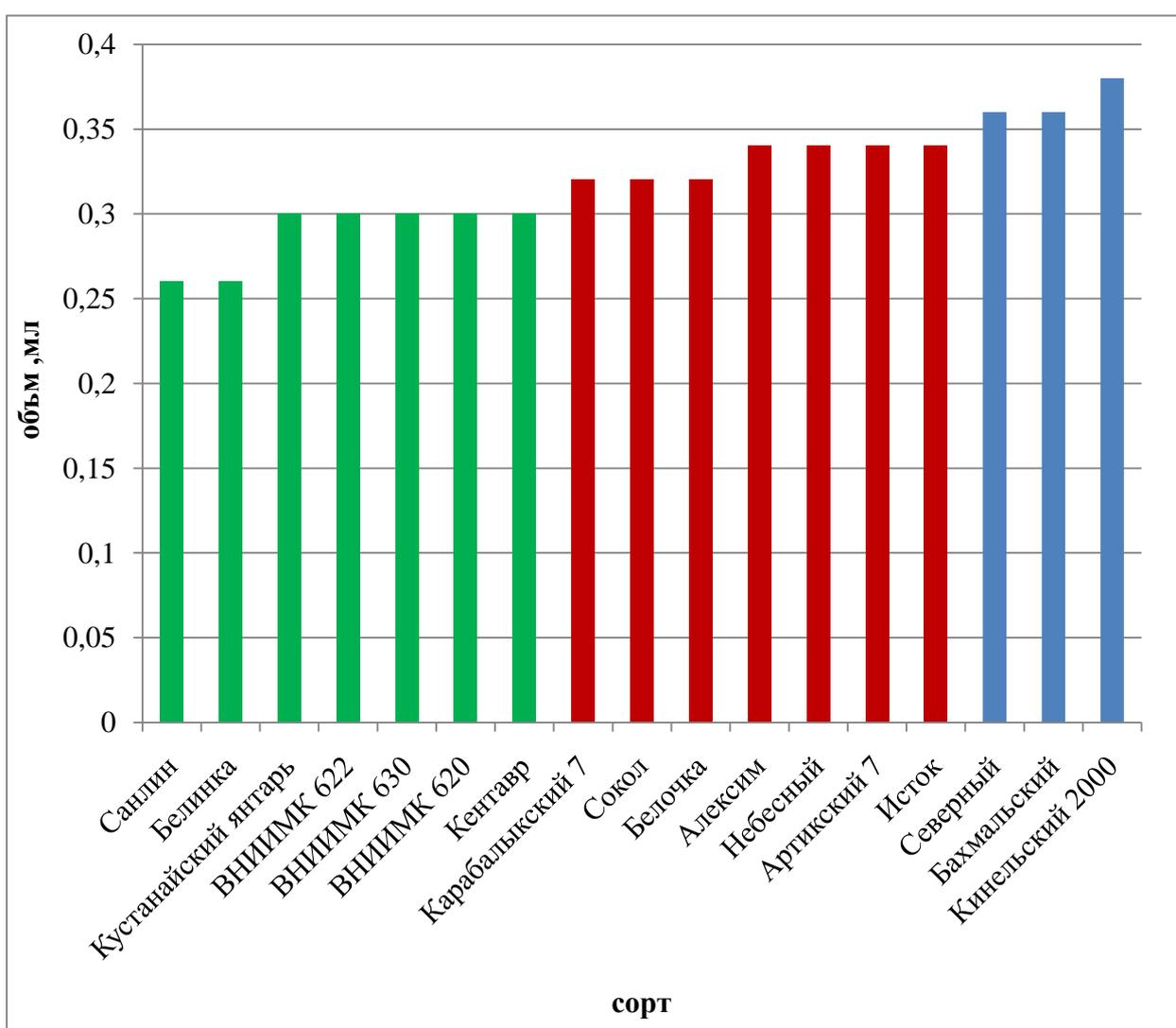


Рисунок 8 - Ранжирование степени слизиобразования (увеличения объема при гидратации) цельных семян современных сортов льна обыкновенного

Как следует из данных, представленных в таблицах 9, 10 и на рисунке 9, наибольшие показатели интенсивности слизиобразования наблюдались для сортов ВНИИМК 620, Небесный, Бахмальский и Кустанайский янтарь, относящихся к кудряшам и межуемкам, в то время как семена сортов долгунцового типа (Алексим, Белинка и Белочка), а также сорт Санлин показали наиболее низкие результаты.

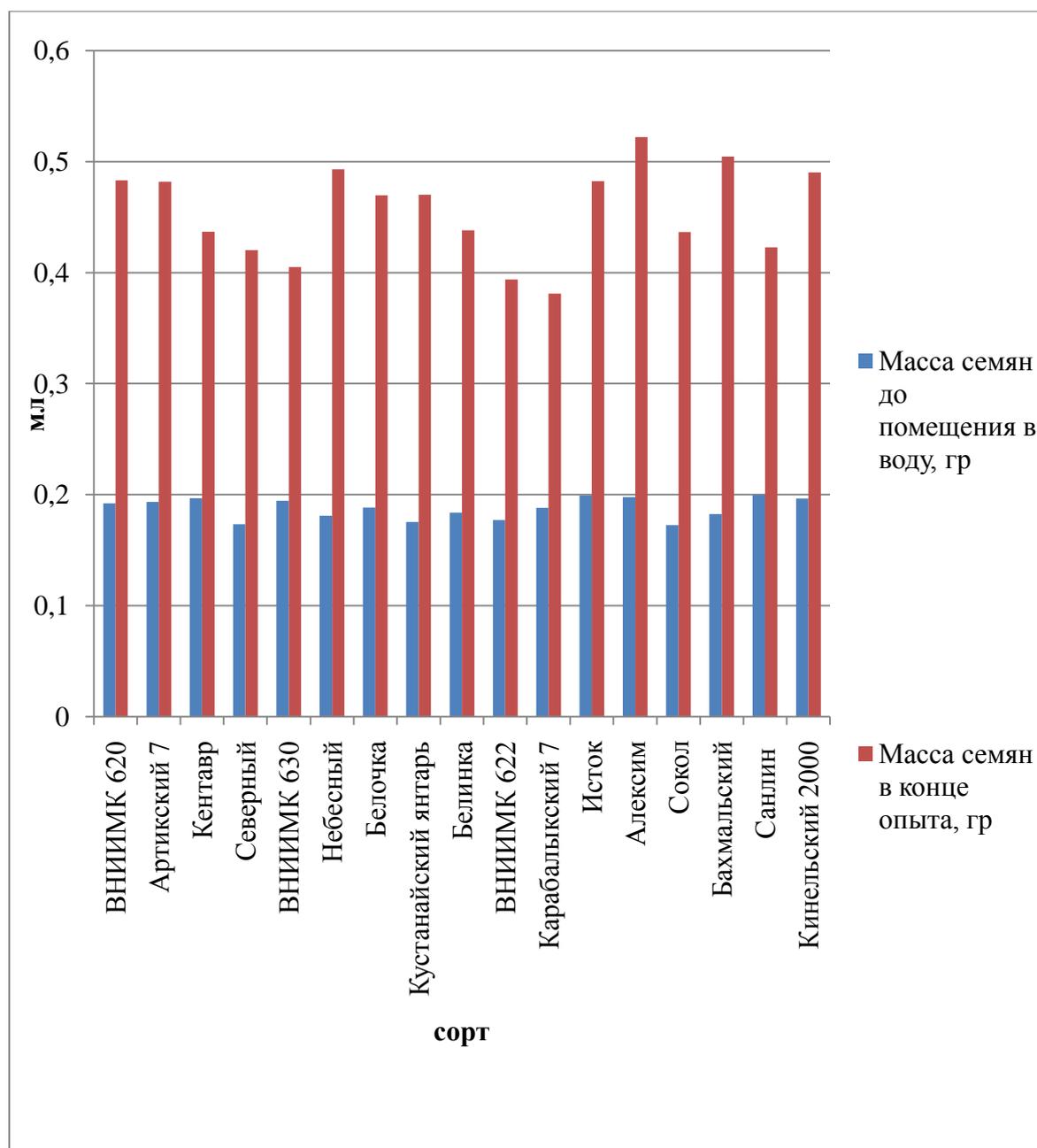


Рисунок 9 - Изменение массы семян исследуемых сортов льна в процессе гидратации

При этом коэффициенты вариации находились в пределах 0,0-14,7%, что свидетельствует об относительной однородности изучаемой совокупности, слабой вариабельности и достоверности полученных экспериментальных данных.

Таблица 9 - Слизеобразующая способность цельных льна семян

| № | Сорт | Слизеобразующая способность, Δ мл | | | | | |
|----|---------------------|-----------------------------------|------------|------------|---------------|-----------|-----------|
| | | на г воздушно-сухих семян | δ, % | Cv, % | на 1000 семян | δ, % | Cv, % |
| 1 | Санлин | 0,74±0,02 | 2,6 | 2,2 | 6,8±0,3 | 3,7 | 4,4 |
| 2 | Белинка | 0,67±0,03 | 4,4 | 4,1 | 6,9±0,4 | 5,7 | 5,8 |
| 3 | Исток 2014 | 0,63±0,01 | 1,6 | 1,2 | 8,8±0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | Кустанайский янтарь | 0,61±0,02 | 2,9 | 1,4 | 9,7±0,4 | 3,6 | 4,1 |
| 5 | ВНИИМК 622 | 0,59±0,02 | 3,4 | 2,8 | 10,0±0,3 | 3,0 | 3,0 |
| 6 | ВНИИМК 630 | 0,65±0,07 | 10,7 | 10,6 | 9,4±0,2 | 1,6 | 2,1 |
| 7 | ВНИИМК 620 | 0,65±0,01 | 0,7 | 0,0 | 12,4±0,4 | 3,3 | 3,2 |
| 8 | Кентавр | 0,65±0,02 | 3,0 | 3,1 | 8,7±0,2 | 2,3 | 2,3 |
| 9 | Северный | 0,68±0,01 | 1,4 | 1,3 | 12,0±0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10 | Карабалыкский 7 | 0,56±0,03 | 5,3 | 5,4 | 12,5±0,2 | 1,6 | 1,6 |
| 11 | Сокол | 0,53±0,01 | 1,8 | 1,9 | 11,0±0,3 | 2,7 | 5,8 |
| 12 | Белочка | 0,59±0,02 | 3,3 | 2,8 | 7,5±0,1 | 1,3 | 1,3 |
| 13 | Алексим | 0,58±0,01 | 1,7 | 2,4 | 6,6±0,1 | 1,5 | 1,5 |
| 14 | Небесный | 0,56±0,03 | 5,3 | 5,2 | 10,6±0,3 | 2,8 | 2,8 |
| 15 | Арктикский 7 | 0,57±0,02 | 2,6 | 1,8 | 9,7±0,3 | 3,1 | 3,1 |
| 16 | Исток 2004 | 0,59±0,01 | 1,7 | 1,6 | 8,5±0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 17 | Исилькульский | 0,49±0,07 | 14,3 | 14,7 | 10,8±0,5 | 4,6 | 4,6 |
| 18 | Бахмальский | 0,52±0,01 | 1,9 | 1,3 | 10,9±0,4 | 3,1 | 3,7 |
| 19 | Кинельский 2000 | 0,53±0,02 | 3,7 | 3,2 | 9,4±0,1 | 1,1 | 1,6 |
| 20 | Lim (min...max) | 0,49...0,74 | 0,7...14,3 | 0,0...14,7 | 6,5...12,4 | 0,0...5,7 | 0,0...5,8 |

Примечание. Δ мл - прирост объема.

Таблица 10 - Интенсивность слизиобразования цельных льна семян

| № | Сорт | Интенсивность слизиобразования, Δ г | | | | | |
|----|---------------------|-------------------------------------|------------|------------|---------------|------------|------------|
| | | на г воздушно-сухих семян | δ, % | Cv, % | на 1000 семян | δ, % | Cv, % |
| 1 | Санлин | 1,25±0,07 | 5,6 | 8,5 | 5,9±0,4 | 6,8 | 6,8 |
| 2 | Белинка | 1,41±0,02 | 1,4 | 0,8 | 6,4±0,1 | 0,8 | 0,8 |
| 3 | Исток 2014 | 1,41±0,01 | 0,7 | 0,7 | 8,1±0,2 | 2,4 | 2,5 |
| 4 | Кустанайский янтарь | 1,68±0,01 | 0,6 | 0,6 | 10,0±0,2 | 2,0 | 2,0 |
| 5 | ВНИИМК 622 | 1,23±0,01 | 0,8 | 1,0 | 7,5±0,1 | 0,7 | 0,7 |
| 6 | ВНИИМК 630 | 1,08±0,01 | 0,9 | 0,9 | 6,6±0,1 | 1,5 | 1,5 |
| 7 | ВНИИМК 620 | 1,66±0,02 | 1,2 | 1,2 | 12,3±0,7 | 5,6 | 5,7 |
| 8 | Кентавр | 1,39±0,02 | 1,4 | 0,7 | 7,4±0,4 | 5,4 | 5,4 |
| 9 | Северный | 1,58±0,01 | 0,6 | 0,6 | 13,6±0,2 | 1,5 | 1,5 |
| 10 | Карабалыкский 7 | 1,33±0,22 | 16,5 | 12,7 | 8,2±0,8 | 9,7 | 9,8 |
| 11 | Сокол | 1,56±0,03 | 1,9 | 1,9 | 8,5±0,2 | 2,4 | 2,4 |
| 12 | Белочка | 1,59±0,09 | 5,7 | 5,8 | 6,6±0,1 | 1,5 | 1,5 |
| 13 | Алексим | 1,86±0,21 | 11,2 | 6,3 | 6,2±0,7 | 11,2 | 11,3 |
| 14 | Небесный | 1,93±0,17 | 8,8 | 5,5 | 10,8±0,7 | 6,4 | 6,5 |
| 15 | Арктикский 7 | 1,47±0,03 | 2,0 | 2,1 | 8,4±0,2 | 2,4 | 2,4 |
| 16 | Исток 2004 | 1,47±0,04 | 2,7 | 1,7 | 7,2±0,1 | 1,4 | 1,4 |
| 17 | Исилькульский | 1,36±0,05 | 3,7 | 4,2 | 7,5±0,2 | 2,7 | 2,7 |
| 18 | Бахмальский | 1,77±0,01 | 0,6 | 0,5 | 10,0±0,1 | 1,0 | 1,0 |
| 19 | Кинельский 2000 | 1,98±0,01 | 0,5 | 0,4 | 8,7±0,9 | 10,3 | 10,3 |
| 20 | Lim (min...max) | 1,08...1,93 | 0,6...16,5 | 0,4...12,7 | 5,9...13,6 | 0,7...11,2 | 0,7...11,3 |

Примечание. Δ г - прирост массы гидратированных семян по сравнению с воздушно-сухими.

Максимальными показателями слизиобразующей способности обладают Бахмальский, Небесный, Кустанайский янтарь. Предложенная методика, основанная на определении физико-химических показателей семян, может использоваться для экспресс-анализа растительных образцов и их дифференцирования по направлениям использования: в качестве жирномасличного или слизесодержащего лекарственного сырья.

3.4. Химический состав

3.4.1. Основной компонентный состав

Химический состав льна семян представлен на рисунке 10.

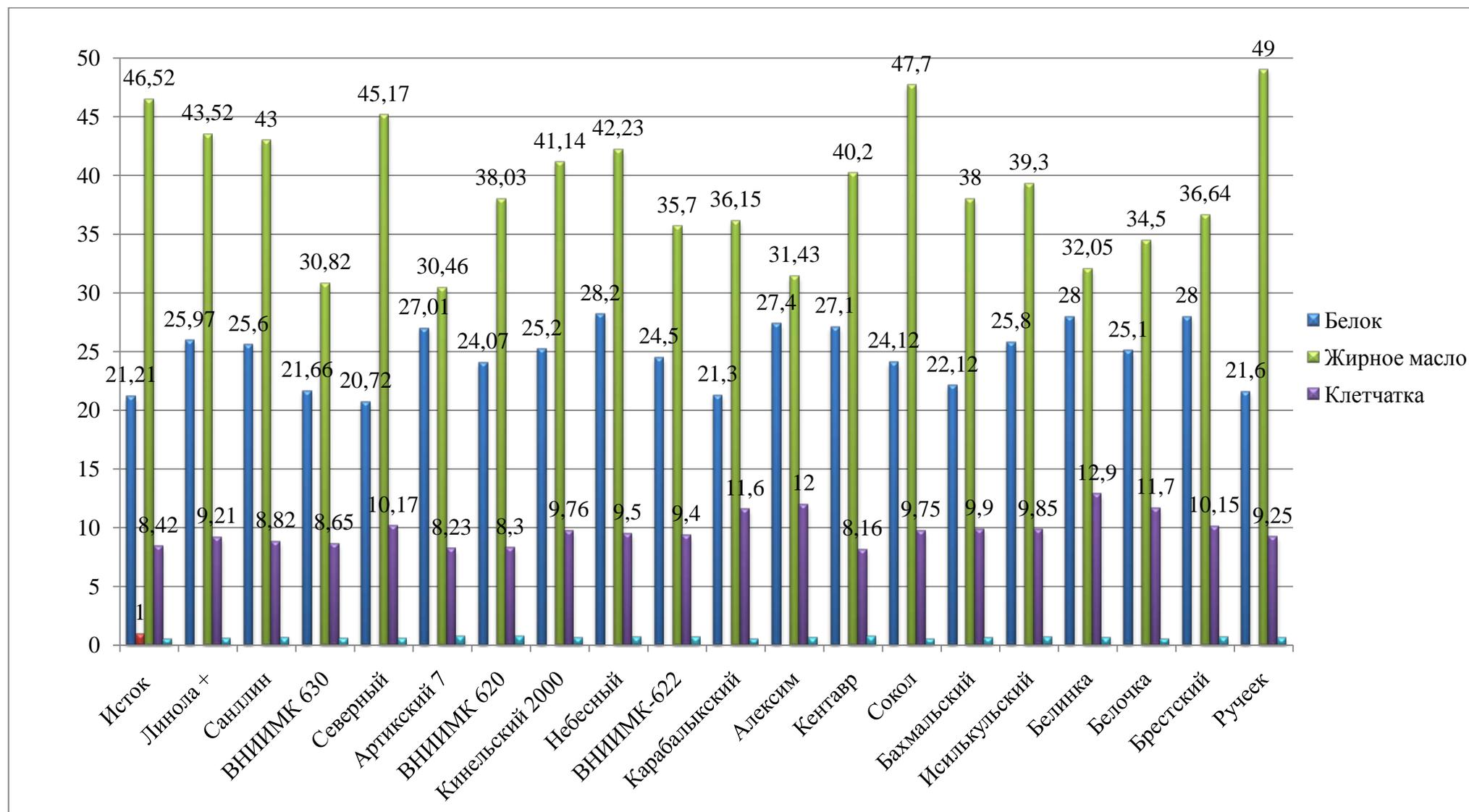


Рисунок 10 - Химический состав льна семян, %

Количественный анализ основного компонентного состава проводили согласно методикам главы 2, раздел 2.2.1. Проведенный химический анализ показал, что семена изученных сортов льна содержат ряд физиологически ценных ингредиентов (рис.10). Они отличаются повышенным содержанием белков и жирного масла, суммарное количество которых составляет в среднем 65-69% от общей массы. Содержание белка варьировало в пределах от 20,72% до 28,2 %, а жирного масла - от 30,46% до 46,52%.

Клетчатка представляет собой оболочки клеток и состоит из полисахаридов, крахмала и нерастворимых полимеров фенольного ряда и лигнинов [139, 147, 149, 170]. Содержание клетчатки варьировало в пределах от 8,23 % до 10,91%.

3.4.2. Аминокислотный состав

Качественный анализ. 1 мл водного извлечения из стевии листьев (1:10) нагревали на водяной бане при температуре 70°C с 5 мл 20% раствора хлористоводородной кислоты 5 минут. Полученный раствор наносили на фильтровальную бумагу и после обработки 0,1% спиртовым раствором нингидрина и нагревания в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 2-3 минут обнаруживали характерные красно-фиолетовые пятна.

Количественное определение [глава 2, раздел 2.2.5].

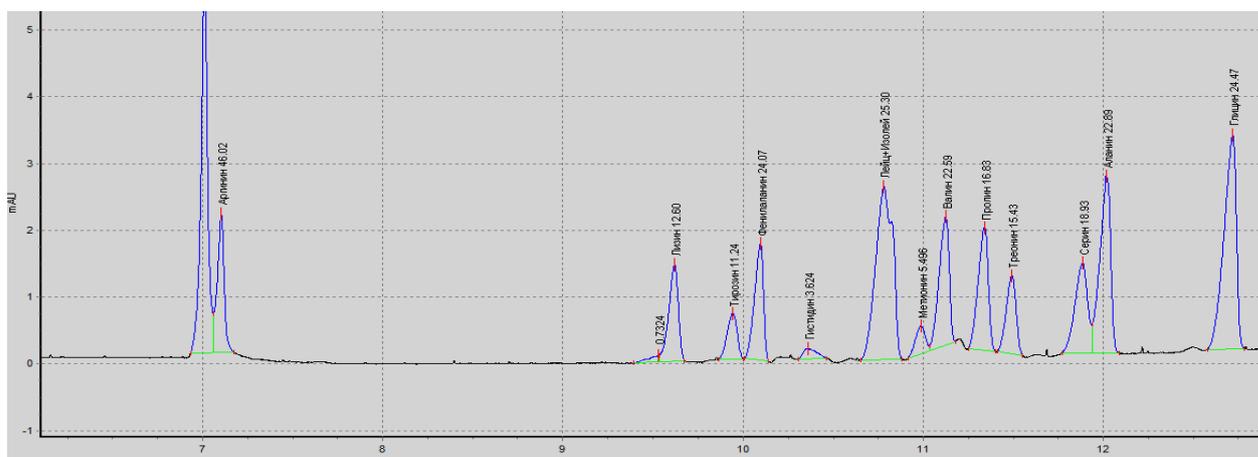


Рисунок 11 – Электрофореграмма аминокислотного состава льна семян

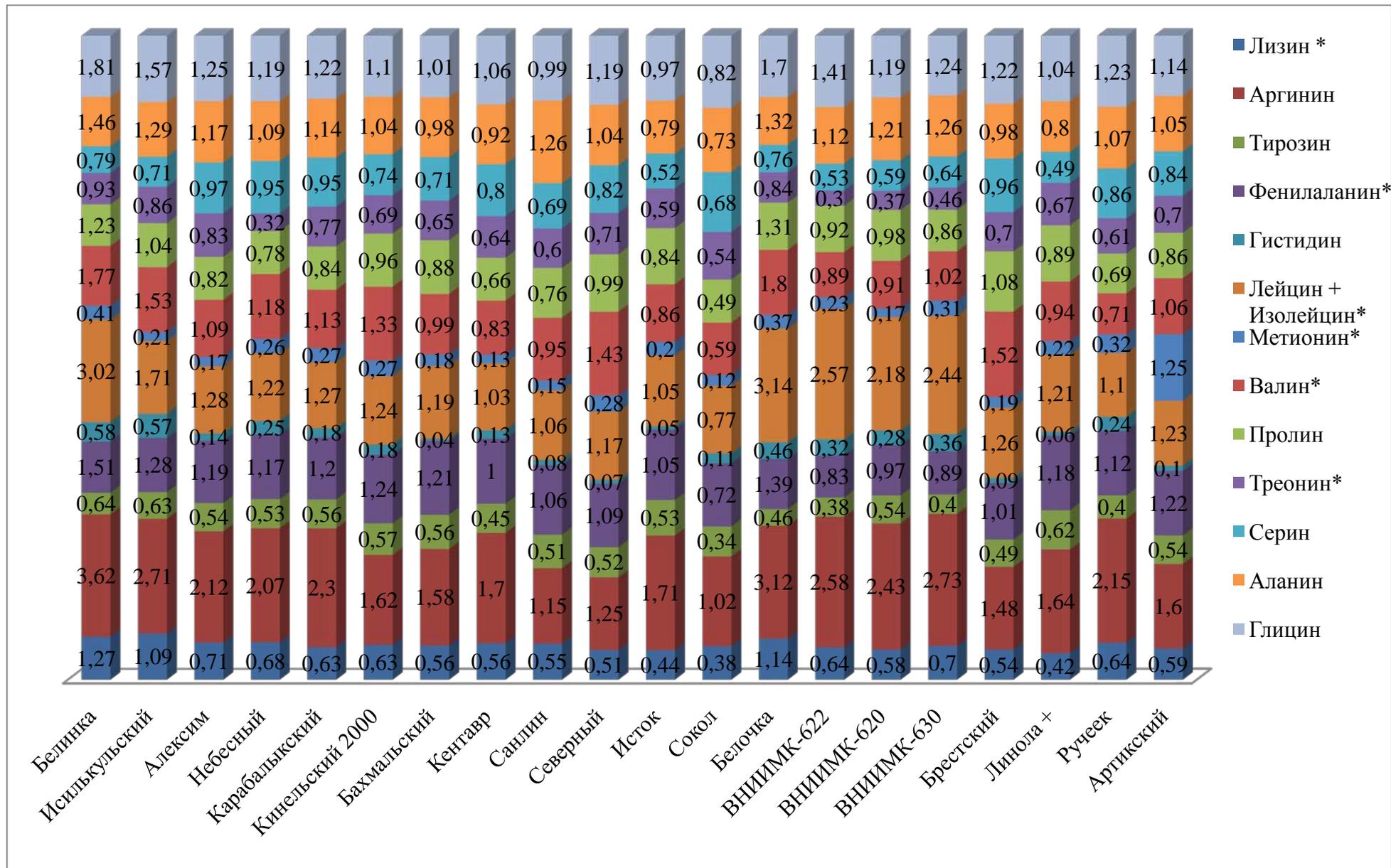


Рисунок 12 - Аминокислотный состав льна семян, мг/%

Изучение аминокислотного состава льна семян методом капиллярного электрофореза позволило определить их содержание в сырье. Содержание аминокислот варьировалось в зависимости от сорта: лизин (0,38 – 1,27%), аргинин (1,02 – 3,62%), тирозин (0,34 – 0,64%), фенилаланин (0,72 – 1,51%), лейцин + изолейцин (0,77 – 3,02%), гистидин (0,04 – 0,58%), 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%) (рис.11, 12).

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.

Наибольшее содержание среди незаменимых аминокислот имели: аргинин – 1,02 - 3,62 %, фенилаланин – 0,71 - 1,51 % и валин – 0,59 - 1,77 %. Кроме того, в состав белков семян льна входит незаменимая серосодержащая аминокислота метионин – 0,12 - 0,41 % от общего количества белка. Максимальное ее процентное содержание определено в семенах льна Арктикский – 1,25 %.

3.4.3. Жирнокислотный состав

Количественное определение [глава 2, раздел 2.2.2 Газо-жидкостная хроматография]. Оптимальный жирнокислотный состав растительных масел определяется не только питательной ценностью той или иной кислоты, но и его пригодностью для хранения и переработки [72, 140].

В одинаковых условиях выращивания содержание основных жирных кислот сортоспецифично, что является следствием генетической детерминации.

Результаты изучения жирнокислотного состава семян некоторых современных сортов льна представлены на рисунке 13.

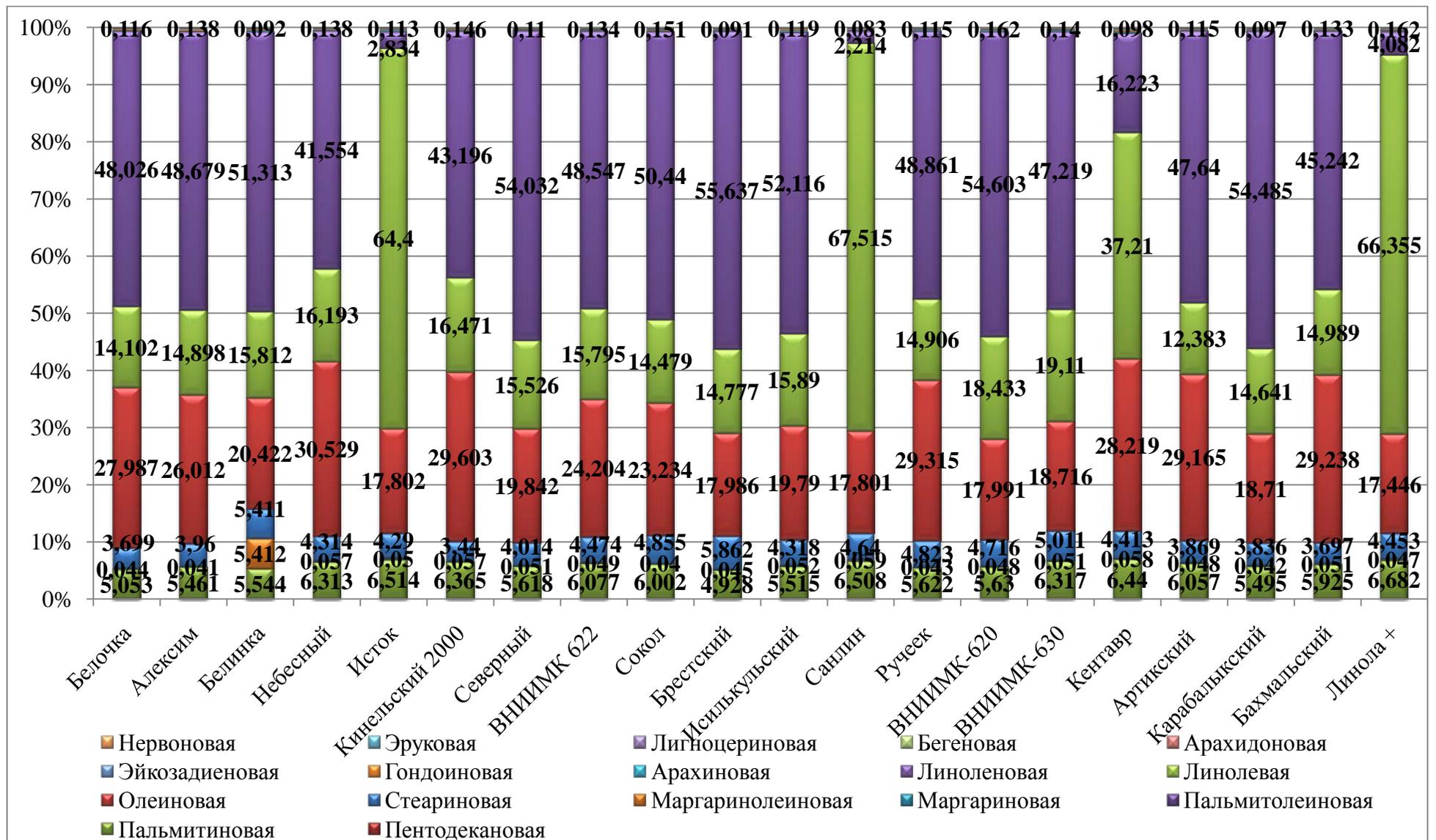


Рисунок 13 - Жирнокислотный состав масла льна семян, % к сумме жирных кислот

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). Жирные кислоты арахидовая, гондоиновая и др. (с числом углеродных атомов, равным 20...22) присутствовали в незначительных количествах: 0,0...0,18%. Следует отметить, что линолевая и линоленовая кислоты относятся к классам ω -6 и ω -3. Это единственные экзогенные жирные кислоты, которые не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей.

Масло характеризуется высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот (88,2 %), в том числе полиненасыщенных 69,7 %. Из ненасыщенных жирных кислот преобладают линолевая кислота, затем олеиновая и линоленовая; из предельных – пальмитиновая. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот линолевой и линоленовой делают льняное масло ценным продуктом. Высокое содержание линолевой кислоты позволяет предположить наличие у масла семян льна биологической активности, а именно гипохолестеринемической [145].

Нетрадиционный состав масла выявлен у сортов Санлин, Исток, Кентавр (ЛВ-002). У Санлина и Истока он приближается к подсолнечному растительному маслу, а у Кентавра (ЛВ-002) занимает промежуточное положение между традиционными льняным и оливковым маслами по содержанию линолевой, линоленовой и олеиновой жирных кислот. Сорты Небесный и Кинельский 2000 характеризуются высоким содержанием олеиновой кислоты: 30,529 % и 29,603 % соответственно.

Высокое содержание в льняных маслах полиненасыщенных жирных кислот (особенно линоленовой) обуславливает их низкую стойкость к окислению. Чем больше в состав масла входит ненасыщенных жирных кислот, тем быстрее протекают окислительные процессы. Так как содержание линоленовой кислоты в составе льняного масла существенно превышает

такое во всех других растительных маслах, то это масло окисляется быстрее других. В связи с этим выводятся сорта льна с меньшим содержанием линоленовой кислоты.

Содержание жирных кислот взаимосвязано. Во всех образцах положительно коррелировало содержание пальмитиновой и стеариновой кислот. Это объясняется тем, что пальмитиновая кислота является начальным субстратом для цепи биосинтеза всех остальных жирных кислот, а стеариновая — следующая в этой цепочке.

При оценке качества семян масличных культур большое значение имеет содержание в их составе полиненасыщенных жирных кислот. Содержание ω кислот представлено в таблице 11.

Таблица 11 - Содержание ω кислот в липидах льна семян

| Название сорта | Линоленовая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая. ω -3 % | Линолевая, арахидоновая. ω -6 % | Олеиновая, пальмитиновая, стеариновая. ω -9 % | Соотношение ω_3 : ω_6 : ω_9 |
|-----------------|--|--|--|--|
| Белинка | 52,5 | 16,2 | 30,3 | 3:1:2 |
| Белочка | 48,0 | 14,6 | 36,7 | 3:1:2,5 |
| Алексим | 48,7 | 15,0 | 35,4 | 3:1:2 |
| Небесный | 41,5 | 16,2 | 41,2 | 2,5:1:2,5 |
| Кинельский 2000 | 43,2 | 16,5 | 39,4 | 2,5:1:2,5 |
| Северный | 54,0 | 15,6 | 29,5 | 3,5:1:2 |
| Сокол | 50,4 | 14,5 | 34,1 | 4:1:2 |
| Брестский | 55,6 | 14,8 | 28,8 | 4:1:2 |
| Исилькульский | 53,3 | 16,1 | 30,4 | 3:1:2 |
| Санлин | 2,2 | 68,7 | 30,2 | 1:34:15 |
| Ручеек | 56,1 | 13,4 | 28,3 | 4:1:2 |
| ВНИИМК-620 | 58,1 | 14,1 | 27,1 | 4:1:2 |
| ВНИИМК-630 | 63,2 | 11,4 | 23,7 | 7:1:2 |
| Исток | 4,5 | 69,2 | 25,4 | 1:16:6 |
| Кентавр | 33,1 | 34,0 | 31,2 | 1:1:1 |
| Линола + | 4,1 | 66,4 | 28,6 | 1:16:6 |
| ВНИИМК-622 | 48,6 | 15,8 | 34,8 | 3:1:2 |
| Артикский | 47,6 | 12,4 | 39,1 | 4:1:3 |
| Бахмальский | 45,2 | 15,0 | 38,9 | 3:1:2,5 |
| Карабалыкский | 54,5 | 14,7 | 9,3 | 4:1,5:1 |

Жирнокислотный состав масел низколиноленовых сортов льна имеет оптимальное соотношение ω -6 и ω -3 жирных кислот, так как, по рекомендациям Института питания РАМН, соотношение полиненасыщенных

жирных кислот ω -6: ω -3 для здорового питания составляет (5-10):1, а при некоторых заболеваниях для лечебного питания (3-5):1. В жирнокислотном составе масла семян льна традиционного сорта линум-типа ВНИИМК 630 соотношение линолевая ω -6 кислота: линоленовая ω -3 кислота составляет 1:6, а в сорте Исток (2014) 16:1, что практически соответствует рекомендациям Института питания РАМН для здорового питания [180,181].

Очень важное значение для качества масла имеет содержание в нем биологически активных компонентов и степень окисленности липидов, которые играют определенную роль при хранении масла. Процесс окисления масел сдерживается содержащимися в них антиоксидантами – токоферолами и каротиноидами. Методом фотоэлектроколориметрии по Эммери-Энгелю установлено, что содержание токоферолов в липидах льна колеблется от 36,6 до 76,9 мг%, причем значительная часть токоферолов представлена изомерами, обладающими наиболее выраженными антиоксидантными свойствами [67]. Для льна характерно невысокое содержание пигментов группы хлорофиллов: 0,15 - 0,47 мг/кг. В составе липидов среди биологически активных соединений особое место занимают токоферолы (витамин Е), которые являются естественными антиоксидантами растительных масел. В семенах масличных культур они встречаются в четырех формах – альфа (α), бета (β), гамма (γ), дельта (δ), которые различаются по биологической и антиокислительной активности [129].

Содержание фитостероидов определено методом ТСХ. Для определения фитостероидов сырье экстрагировали хлороформом в соотношении 1:1, в течение 30 мин, а затем центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре. В качестве стандарта при ТСХ-анализе использовали 0,5% раствор стигмастерола и эргостерола в хлороформе, который наносили на силикагелевую пластинку с ПЭТ-Э подложкой (Sorbfil, Россия) размером 10x10 см вместе с анализируемым образцом в соотношении 20:100 мкл. ТСХ-пластинки выдерживали 20 мин в смеси растворителей толуол-диэтиловый эфир (40:40), до тех пор пока растворитель не достигал 1 см от края пластинки.

Затем пластинки высушивали при комнатной температуре, проявляли 5% серной кислотой в 96% этиловом спирте 15 с и сразу же 1% раствором ванилина 15 с. Далее высушивали при комнатной температуре и прогревали при 80°-100° С в течение 5 мин. Проведенный ТСХ-анализ на фитостеролы в полученных экстрактах показал наличие характерных для стероидов синих пятен с R_f равным 0,55-0,56, в то же время значения R_f для стандартов стигмастерола и эргостерола составило 0,51 и 0,53 соответственно. Количественное определение проводили с помощью видеоденситометра Sorbfil. Их количество в льняном масле варьирует от 0,123 до 0,452 %. Также на окисляемость масел влияет их жирнокислотный состав.

Содержание каротиноидов определяли методом фотоэлектроколориметрии и планарной хроматографии [81].

Результаты исследования содержания биологически активных компонентов в липидах льна семян представлены на рисунке 14.

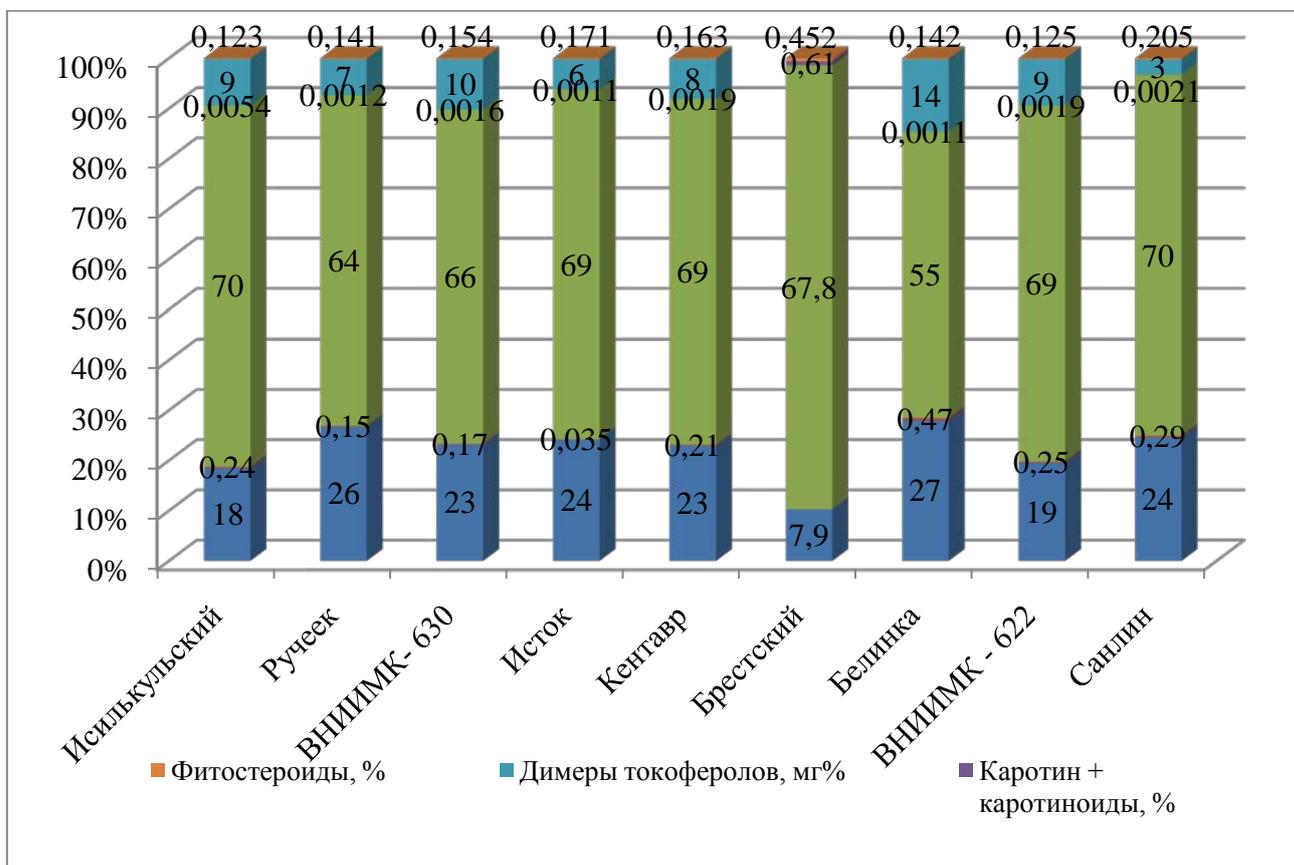


Рисунок 14 - Содержание биологически активных компонентов в липидах льна семян

Содержание каротиноидов находилось в пределах от 0,0011 % (Исток, Белинка) до 0,0061% (Брестский); фитостероидов от 0,123 % (Исилькульский) до 0,452% (Брестский); хлорофиллов от 0,035 мг/кг (Исток) до 0,47мг/кг (Белинка); токофероллов, мг% в т.ч., % к сумме α – токоферол от 7,9 (Брестский) до 27 (Белинка), β + γ – токоферолы от 55 (Белинка) до 70 (Исилькульский, Санлин).

Таким образом, количество каротиноидов у изучаемых генотипов различается в 5 раз, хлорофилла в 15 раз, токоферолов в 2 раза, фитостероидов более чем в 1,5 раза, что дает возможность использовать лучшие из них по данным показателям в качестве исходных форм в селекции при создании специализированных сортов различного назначения.

Льна семена возможно использовать и как источник белка, при этом важное значение имеет качественный и количественный состав заменимых и незаменимых аминокислот.

Качественный и количественный состав льна семян свидетельствует об их лечебно-профилактической и лечебно-диетической ценности.

3.4.4. Физико-химические константы жирного масла

Проведены исследования по определению показателей физико-химических констант жирного масла льна посевного (табл. 12) [53, 82].

По числу омыления в совокупности с другими показателями можно судить о природе жирного масла и его свежести. Для большинства жирных масел обычно колеблется в пределах от 150 до 195 мг КОН/г. Малые числа омыления указывают на присутствие высокомолекулярных кислот или неомыленных веществ, для масла льна Северный показатель составляет 137 мг КОН/г, показатель масла льняное салатное (Царевщино) составляет 122,4 мг КОН/г, для масла льняного нерафинированного пищевое (Васильева Слобода) установлено 116,3 мг КОН/г. Самое высокое значение йодного числа у образца: масло льняное нерафинированное пищевое (Васильева Слобода) - 175,3 г йода/100 г. Самое низкое значение йодного числа у образца: масло

льняное (Биокор) - 151,0 г йода/100 г. Перекисное число у изучаемых сортов составило от 0,035 (масло льна Исток (2014)) до 0,102 (масло льна Исток (2008)) мг активного кислорода $\frac{1}{2}$ O на кг. Кислотное число масел и жиров является одним из качественных показателей, который нормируется ТНПА. Кислотное число зависит от качества сырья, способа получения масла или жира, условий их хранения и других факторов. Значение кислотного числа характеризует товарный сорт и доброкачественность пищевых жиров. При не правильном хранения жирных масел кислотное число увеличивается, что связано с гидролизом триглицеридов. Минимальное значение кислотного числа у масла льна Исток (2008) – 1,85; максимальное – у масла льняного «Царевщино» - 5,59. Масло льняное «Царевщино» не удовлетворяет требованиям ГФ РФ XIV. Масло льна Исток (2008) является наиболее качественным среди данных образцов.

Таблица 12 - Физико-химических констант жирного масла льна семян

| Название сорта | Число омыления, КОН/г | Йодное число, йода/100 г | Перекисное число, (1/2O) / кг | Кислотное число | Эфирное число | Индекс окисленности | Содержание летучих веществ, % |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------|---------------------|-------------------------------|
| Масло льна Исток (2014) | 163,2 | 167,44 | 0,0035 | 1,8895 | 161,311 | 0,5837 | 0,02 |
| Масло льна Северный | 137,0 | 156,6 | 0,0083 | 2,8640 | 134,136 | 0,4532 | 0,0096 |
| Масло льна Исток (2008) | 148,3 | 151,0 | 0,0102 | 1,8479 | 146,453 | 0,4204 | 0,01 |
| Масло льняное салатное (Царевщино) | 122,4 | 168,5 | 0,0058 | 5,5886 | 116,812 | 0,3208 | 0,022 |
| Масло льняное нерафинированное пищевое (Васильева Слобода) | 116,3 | 175,3 | 0,0070 | 2,7085 | 113,592 | 0,7007 | 0,013 |
| Масло льняное с Селеном (Льняная диета) | 180,1 | 166,9 | 0,0044 | 4,1784 | 175,952 | 0,4889 | 0,01 |

УФ-спектр растительного масла позволяет рассчитать очень важный параметр - индекс окисленности (ИО), который характеризует качество

липидного комплекса масла (рис.15). Данный параметр отражает накопление суммы продуктов перекисного окисления жирнокислотных остатков липидов [38].

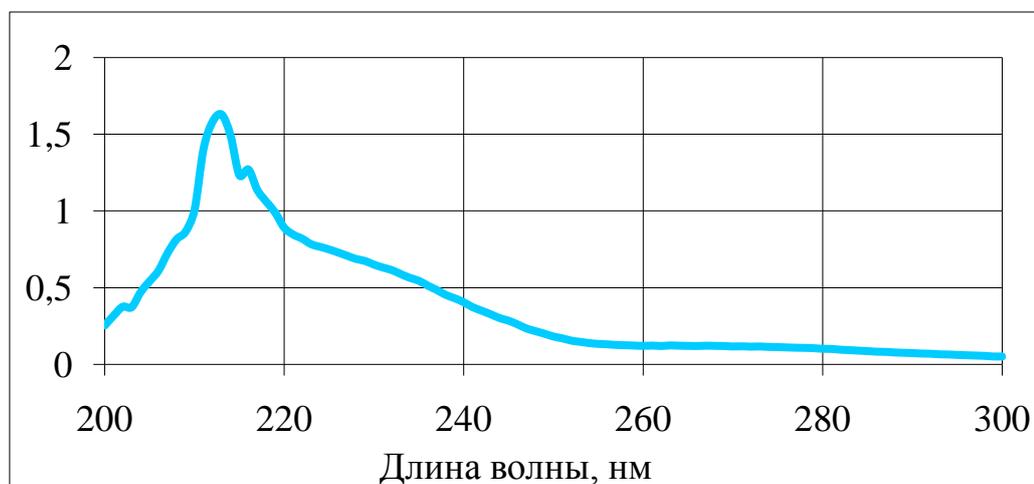


Рисунок 15 - Спектр поглощения масла льна сорта Исток

Значение индекса окисленности для жирных масел шести образцов составляет от 0,3 до 0,7, что говорит о доброкачественности всех образцов масла. Превышение этих величин, что не характерно ни для одного масла, свидетельствует о низком качестве липидного комплекса масла, и следовательно, о нестабильности масла и коротком сроке годности. Если сравнивать образцы между собой по показателю индекса окисленности, то можно сделать вывод чем ниже ИО, тем выше качество липидного комплекса масла, а значит выше стабильность масла и срок годности. Масло с наиболее прочным липидным комплексом является у масла льняного «Царевщино» его индекс окисленности равен 0,3208. Масло льняное нерафинированное пищевое (Васильева Слобода), имеет самый высокий показатель равный 0,7007, что говорит о понижении качества относительно других образцов.

Процентное содержание летучих веществ всех образцов соответствует требованиям НД (не более 0,15%) [33]. Самое высокое процентное содержание летучих веществ у образца: Масло льняное салатное (Царевщино) - 0,022%. Самое низкое процентное содержание летучих веществ у образца: Масло льна северного - 0,0096%.

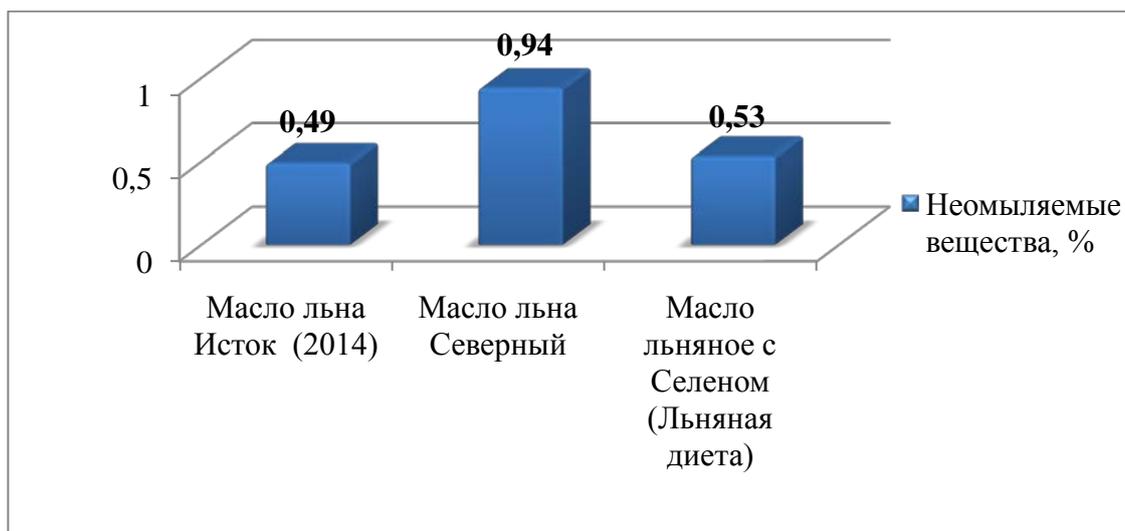


Рисунок 16 - Данные по определению неомыляемых веществ в льняном масле.

Самое высокое значение неомыляемых веществ у образца: Масло льна Северный - 0,94%. Самое низкое значение неомыляемых веществ у образца: масло льна Исток (2014) - 0,49%. Следовательно, самое высокое качество из представленных образцов у масло льна Исток (2014) (рис.16).

Определение примесей парафина, воска, смоляных и минеральных масел [38].

В образцах 4 и 6 наблюдаются следы парафина, воска, смоляных и минеральных масел (рис.17).



Рисунок 17 - Результаты определения примесей парафина, воска, смоляных и минеральных масел в образцах масла льна различного происхождения.

Масло льна Исток (2014), масло льна Северный, масло льна Исток (2008), масло льняное нерафинированное пищевое не содержат примесей парафина, воска, смоляных и минеральных масел. Масло льняное «Царевщино» и масло льняное с селеном содержит примеси, что не удовлетворяет требованиям ГФ РФ XIV издания.

3.4.5. Слизеобразующие полисахариды

Для подтверждения присутствия полисахаридов льна семян [глава 2, раздел 2.1.1] использовали химические реакции (табл.13).

Таблица 13 - Результаты качественных реакций на полисахариды

| № | Реакция | Условия проведения | Аналитический эффект |
|---|--|--|--|
| 1 | Осаждение слизи этанолом из водного извлечения | 5 мл водного извлечения и 20 мл 95% спирта этилового, нагревание 1-2 минуты на водяной бане. | Образование хлопьев, а при стоянии осадка. |
| 2 | Реакция Фелинга | Проведение гидролиза в кислой среде. 1 мл извлечения и 1 мл реактива Фелинга. Смесь перемешивают и нагревают в пламени горелки до кипения. | Осадок оранжево-красного цвета |

Значительная часть углеводов представлена в виде слизеобразующих полисахаридов [48, 139]. В результате проведенного количественного определения полисахаридов льна семян установлено, что их содержание варьирует от 9,8 до 26,4% (Рис.18).

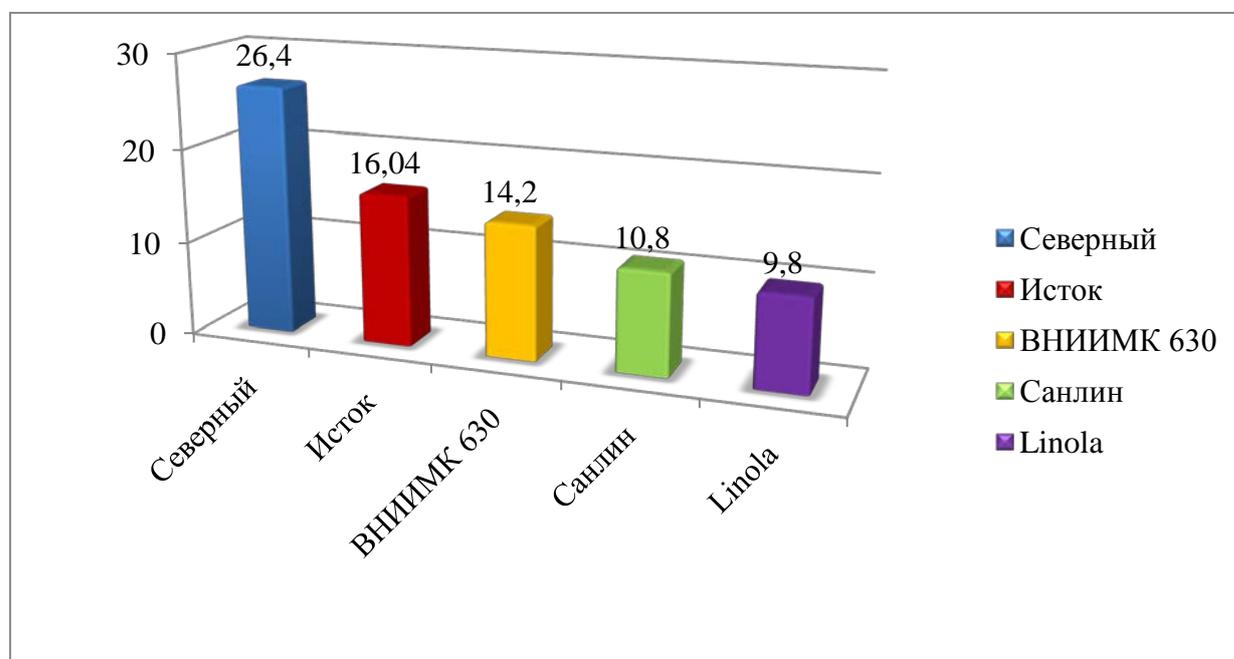


Рисунок 18 – Сумма полисахаридов льна семян

Содержание полисахаридов варьировалось от 26,4 % (лен Северный) до 9,8 % (Linola)

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3:

1. Различные сорта льна имеют сходное анатомическое строение семени, однако наблюдаются различия в строении клеточной стенки и размерах клеток эпидермального слоя семенной кожуры, особенностях расположения слоев слизи в клетках. У льна сортов Северный, Арктикский, Бахмальский, Санлин клетки вытянуты, наружная клеточная стенка по краям имеет небольшие выросты. У сорта льна 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.
2. Льна семена содержат слизиобразующие полисахариды, отвечающие за основной фармакологический эффект, жирные масла и сопутствующие вещества: токоферолы, каротиноиды, влияющие на процессы хранения семян.
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 у сортов, обладающих высокой слизиобразующей способностью, как правило, снижено содержание жирного масла в семенах.
4. Предложена 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.
5. Качественными и гистохимическими реакциями подтверждено наличие биологически активных соединений: полисахариды, жирное масло, аминокислоты. В результате проведенного сравнительного количественного

определения полисахаридов в семенах современных сортов льна установлено, что их содержание варьирует от 9,8 до 16,04 %. Максимальное количество белка было отмечено в сырье сортов Небесный (28,20 %), Арктикский 7 (27,01 %), Санлин (25,60 %), а жирного масла - сортов Исток (46,52 %), Северный (45,17 %), Брестский (44,25 %).

6. С помощью газожидкостной хроматографии определен жирно-кислотный состав льна семян современных сортов. Идентифицированы 17 жирных кислот, установлен их количественный состав. Проведенный анализ позволил выявить, 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).
7. С помощью метода капиллярного электрофореза определен аминокислотный состав льна семян современных сортов. Идентифицированы 13 аминокислот, установлено их содержание. Доля незаменимых аминокислот в сырье льна 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%, Иссилькульский – 9,96 %, Belinka – 13,11 %, от суммы аминокислот.
8. Методом фотоэлектроколориметрии установлено содержание каротиноидов для льна семян современных сортов от 0,0010 % до 0,0054 %. Методом фотоэлектроколориметрии по Эммери-Эпгелю установлено содержание токоферолов для семян льна обыкновенного от 65,37 мг% до 76,9 мг%. Содержание фитостероидов, определенное методом тонкослойной хроматографии, составляет для льна посевного семян от 0,123 мг% до 0,452 мг%. Методом гравиметрии установлено содержание слизиобразующих полисахаридов в семенах льна от 9,8 до 26,4%.

ГЛАВА 4. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТЕВИИ ЛИСТЬЕВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В Российской Федерации отсутствует нормативная документация на листья стевии, что препятствует разработке отечественных препаратов на основе данного вида ЛРС. Оценка подлинности ЛРС посредством морфолого-анатомического анализа является одним из обязательных критериев стандартизации любого вида сырья. В фармацевтическом анализе данный вид диагностики особенно важен ввиду необходимости выявления случайной подмеси или намеренной фальсификации ЛРС.

4.1. Внешние признаки и органолептические свойства

Цельное сырье. Выявленная совокупность макроморфологических диагностических признаков изучаемых образцов стевии может быть представлена следующим образом: лист простой, сидячий, 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. Цвет зелёный, запах слабый, вкус водного извлечения приторно-сладкий (рис. 1). Прикорневые листья обратнояйцевидные, имеют большие размеры до 9 см [64].

Поверхность гладкая. Цвет листьев у Софии зелёный, более темный по сравнению с сортами Улада и Рамонская сладлена (рис. 1). Растения всех сортов, выращенные в условиях открытого грунта, имели более сильную опушенность листа с нижней стороны по сравнению с листьями растений закрытого грунта.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листовых пластинок с ясно заметными жилками и мелкими прижатыми волосками с одной стороны, а также черешки, реже встречаются

элементы чашечки и венчика. Цвет измельченного сырья зелёный, запах слабый, вкус водного извлечения приторно-сладкий.

Порошок. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листовых пластинок, черешков, стеблей, реже встречаются элементы чашечки и венчика. На поверхности листовой пластинки видны жилки, снизу по жилкам могут располагаться слегка прижатые волоски беловатого цвета; кусочки черешков и стеблей зеленого цвета, на фрагментах стеблей волоски немногочисленные. Цвет порошка зеленый или светло-зеленый; запах слабый, вкус водного извлечения приторно-сладкий.

4.2. Микроскопический анализ

Изучение микроскопических признаков стевии листьев проводилось на ЛРС, выращенном в условиях открытого и закрытого грунта. В диагностике листьев стевии также большее значение имеют и анатомо-морфологические признаки, которые были изучены на микропрепаратах цельных, измельченных и порошоканных листьев [64].

При рассмотрении микропрепаратов листа стевии с поверхности с верхней и нижней стороны выявлен ряд анатомо-диагностических признаков (рис.19).



Рисунок 19 - Микроморфология стевии листьев (x100): А – кутикула, эпидермис, основание волоска, Б – устьица с чечевицевидными клетками, В -округлые желёзки и чечевицевидные клетки устьиц

Характер кутикулы лучисто-морщинистый – выступы в виде прямых или волнистых ребер, которые расходятся в виде лучей от устьиц, волосков, железок, их мест прикрепления (рис. 19А). Устьица имеют круглую форму. Тип устьиц (по уровню расположения относительно поверхности эпидермиса): погруженные устьица (для листьев растений открытого грунта). Напротив, у образцов, выращенных в закрытом грунте, устьица расположены в одной плоскости с эпидермисом (рис. 19Б). Устьичный аппарат аномоцитный - замыкающие клетки не имеют ярко выраженных околоустьичных клеток. Тип устьичных клеток - чечевицевидный - 2 одинаковые клетки полулунной формы расположены симметрично. На фронтальной плоскости утолщение оболочки почти равномерное. Щель веретеновидная. Волоски простые многоклеточные однорядные конусовидные и остроконусовидные. Характер утолщенности клеточных стенок волосков - большинство волосков тонкостенные. Покрывающая кутикула волосков имеет гладкую поверхность. Особенностью мест присоединения волосков является многоклеточное основание (рис. 19В) [64].

Клетки палисадной паренхимы имеют цилиндрическую форму, плотно сомкнуты и располагаются в листьях перпендикулярно верхнему эпидермису, образуют один-два слоя. Клетки губчатой паренхимы изодиаметрической формы, с выраженными межклетниками. На поверхности листа, кроме волосков, находятся также сидячие железки округлой формы [64].

Характер проводящей системы: 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. Наличие механической ткани: колленхима в листьях отсутствует.

На основании данных, полученных при анализе микропрепаратов стевии листьев сорта Рамонская сладена, выращенной в условиях открытого и закрытого грунта, были обнаружены отличия в типе устьиц: погруженные или

расположенные в одной плоскости с эпидермисом листа у растений, выращенных в открытом или закрытом грунте, соответственно (табл. 14).

Таблица 14 - Сравнительная характеристика микроморфологических признаков стевии листьев, выращенной в различных условиях

| Наименование признака | Условия выращивания | |
|-------------------------|---|---|
| | открытый грунт | закрытый грунт |
| Характер кутикулы | лучисто-морщинистый | лучисто-морщинистый |
| Тип устьичного аппарата | аномоцитный | аномоцитный |
| Форма устьичных клеток | чечевицевидная | чечевицевидная |
| Тип устьиц | погружённые | расположены в одной плоскости с эпидермисом |
| Волоски | однорядные многоклеточные конусовидные или остроконусовидные | однорядные многоклеточные конусовидные или остроконусовидные |
| Основание волосков | многоклеточное | Многоклеточное |
| Желёзки | сидячие, округлые | сидячие, округлые |
| Проводящая система | Проводящий пучок (центральная жилка) и трахеиды со спиральным утолщением стенок | Проводящий пучок (центральная жилка) и трахеиды со спиральным утолщением стенок |

Микроморфология измельченных свежих листьев стевии представлена на рисунке 20.

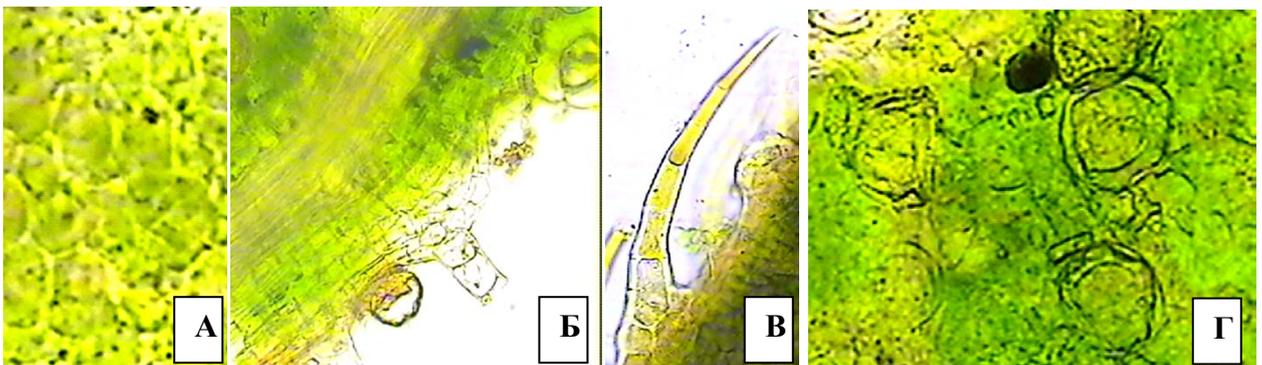


Рисунок 20 - Микроморфология измельчённых свежих листьев стевии (x100): А – клетки эпидермиса, Б – сидячие желёзки, В – многоклеточный конусовидный волосок, Г – идиобласты (x400)

Микроскопический анализ образцов измельченных свежих листьев стевии позволил выявить совокупность диагностически значимых признаков: клетки эпидермиса округло-овальные со слабоизвилистыми равномерно

утолщенными стенками, кутикула имеет лучисто-морщинистый характер – выступы в виде прямых или волнистых ребер, которые расходятся в виде лучей от устьиц, волосков, железок, их мест прикрепления, устьица аномоцитного типа, устьичные клетки чечевицевидной формы, волоски крупные или мелкие многоклеточные, сидячие железки округлой формы, идиобласты рассеяны неравномерно среди клеток других тканей и имеют одно или несколько включений (рис. 20).

Различия между сортами выражается в типе устьичных клеток: у диплоидного сорта Рамонская сладостена они сферовидные, а у тетраплоидных сортов Услава и София форма приближена к чечевицевидной. Размеры клеток варьируют в зависимости от сорта и условий выращивания: более крупными были сидячие железки сортов Услава, София.

4.3. Химический состав

4.3.1. Основной компонентный состав

Количественный анализ основного компонентного состава проводили согласно методикам главы 2, раздел 2.2.1. Проведенный химический анализ показал, что высушенные листья стевии включают ряд химических соединений. Содержание веществ в листьях нижеуказанных образцов стевии представлено следующими показателями (рис.21). Установлено количественное содержание химического состава в стевии листьях: клетчатка от 15,36 % до 26,53 %, протеина от 17,32 % до 19,05%, жирного масла 3,07 % до 4,90 %, фосфора от 0,31 % до 0,35 %.

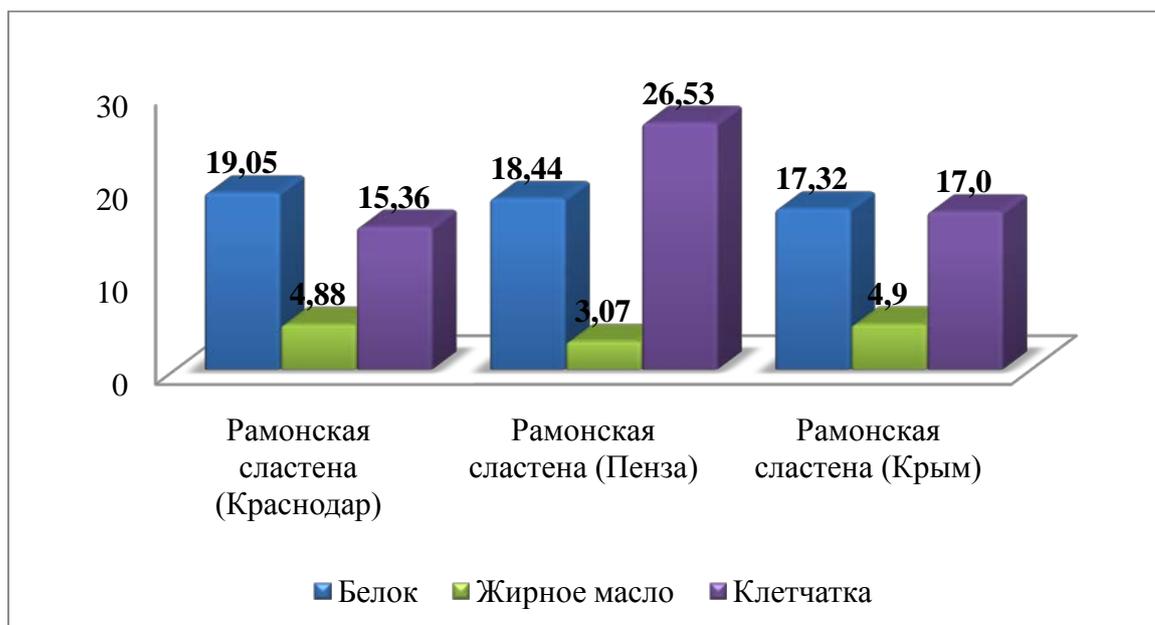


Рисунок 21 - Химический состав стевии листьев, % (средние значения)

Полученные данные о химическом составе подтверждают, что стевии листья являются перспективным растительным сырьем.

4.3.2. Экстрактивные вещества

Определение содержания экстрактивных веществ, проводили по методике ГФ РФ XIII издания [33]. В качестве экстрагента рекомендуется использовать воду очищенную, так как выходит наибольшее количество экстрактивных веществ, данные представлены в таблице 15.

Таблица 15- Содержание экстрактивных веществ в стевии листьях

| Образцы сырья | Экстрактивные вещества, % | |
|-------------------|---------------------------|---------------------|
| | Измельченное сырье | Порошкованное сырье |
| Парагвай | 45,62±0,11 | 46,71±0,11 |
| Индия | 52,62±0,12 | 54,02±0,09 |
| Россия, Тверь | 45,12±0,06 | 47,71±0,10 |
| Россия, Крым | 50,64±0,10 | 52,01±0,11 |
| Россия, Краснодар | 45,61±0,11 | 46,22±0,10 |
| Россия, Пенза | 41,32±0,04 | 42,92±0,13 |

Содержание экстрактивных веществ в стевии листьях колеблется от 42,9 до 54,0% в порошкованном сырье, от 41,3 до 52,6% в измельченном сырье.

4.3.3. Аминокислотный состав

Количественное определение [глава 2, раздел 2.2.5 Капиллярный электрофорез]. Важное значение имеет количественный и качественный состав заменимых и незаменимых аминокислот (рис.22, 23).

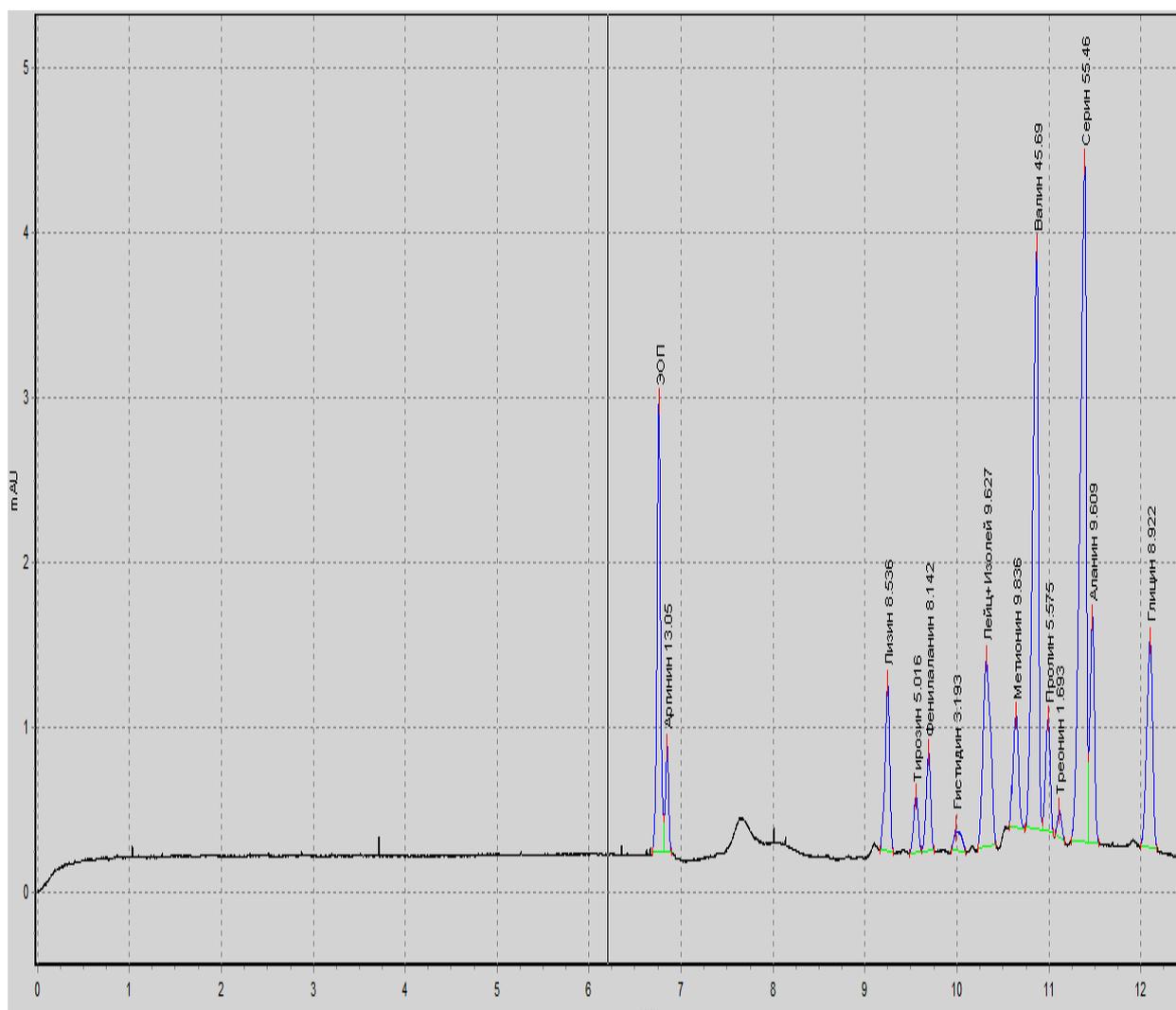


Рисунок 22 – Электрофореграмма аминокислотного состава стевии листьев, метод капиллярного электрофореза.

С помощью метода капиллярного электрофореза определен аминокислотный состав стевии листьев. Идентифицированы 13 аминокислот, установлен их количественный состав. Массовая доля аминокислот 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 %. Доля незаменимых аминокислот в сырье стевии составила от 2,89 % до 4,99% (Рис.24)

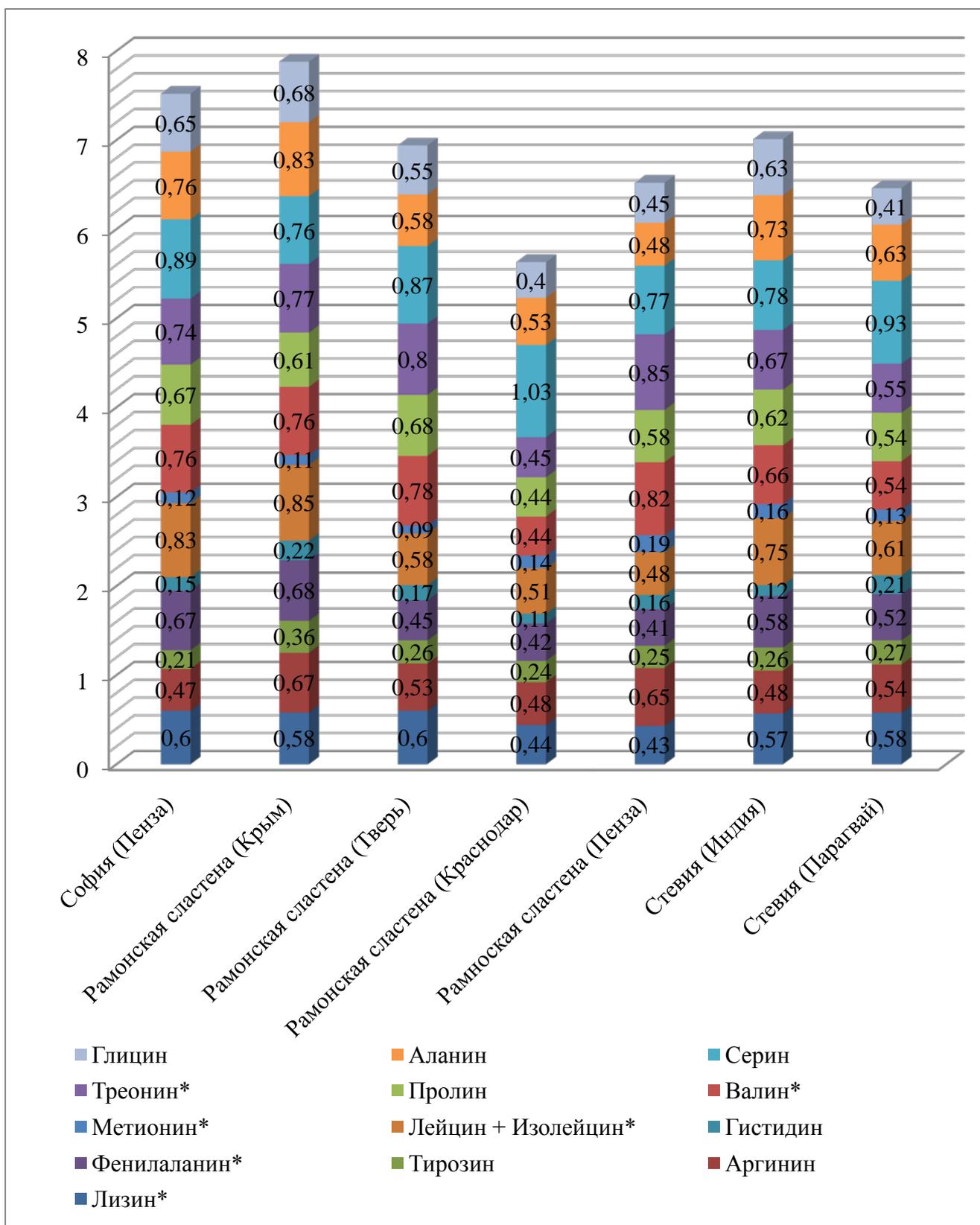


Рисунок 23– Аминокислотный состав стевии листьев различных сортов

Наибольшее содержание среди незаменимых аминокислот имели: аргинин – 0,47...0,67%, лизин – 0,43...0,60%, фенилаланин – 0,41...0,68%, валин – 0,44...2,28%. Кроме того, в состав белков листьев стевии входит незаменимая серосодержащая аминокислота метионин – 0,04...0,49% от общего количества белка. Максимальное ее процентное содержание определено в листьях стевии Рамонская сладкая (Пенза) – 0,49%. Аминокислотный состав белков существенно зависит от морфогенетических, технологических и экологических факторов.

Доля незаменимых аминокислот составила: Рамонская сладкая (Пенза) – 4,99%, Рамонская сладкая (Краснодар) – 2,89%, Рамонская сладкая (Крым) – 4,64% , София (Пенза) – 4,19%, Рамонская сладкая (Тверь) - 3,87%, от суммы аминокислот (рис.24).

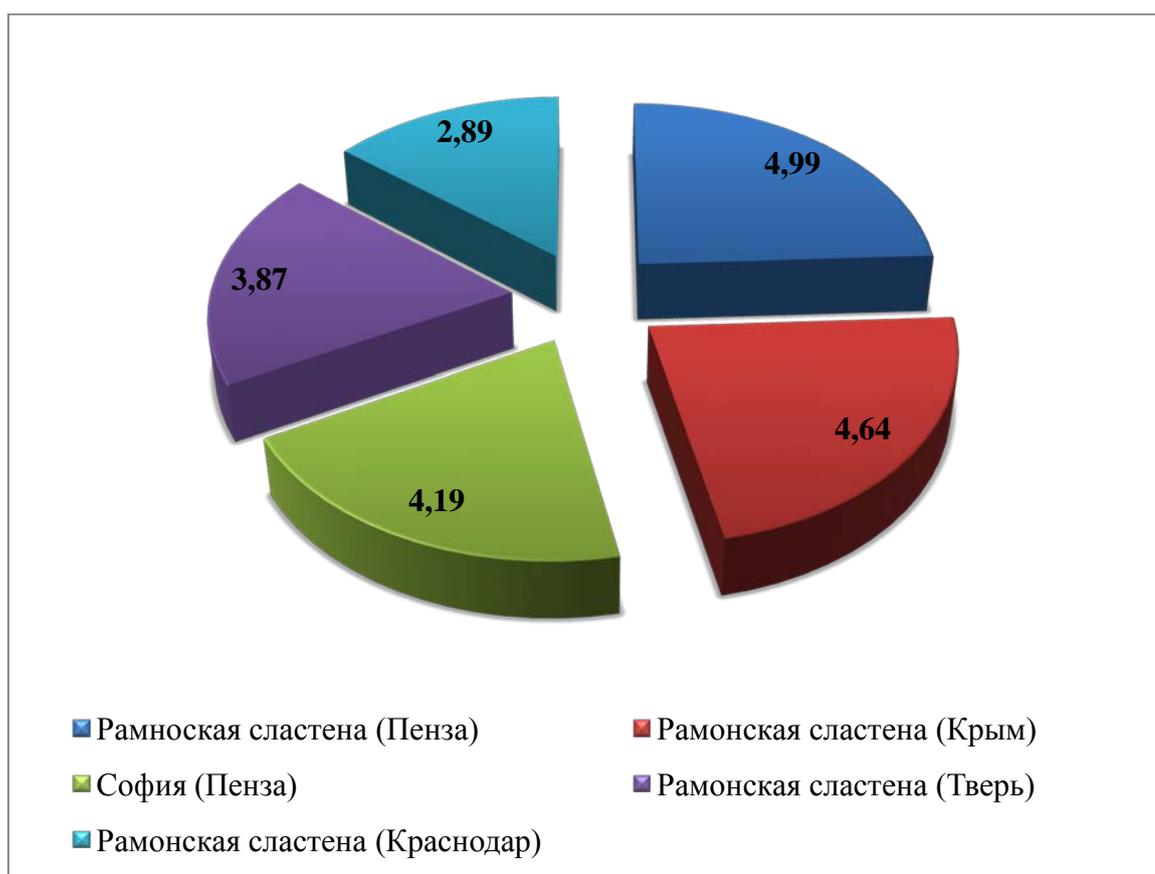


Рисунок 24 – Сумма незаменимых аминокислот в листьях стевии различных сортов

4.3.4. Сумма дитерпеновых гликозидов

Основной группой БАС в сырье стевии являются дитерпеновые гликозиды. На сегодняшний день разработан метод идентификации комплекса гликозидов в листьях стевии методом ВЭЖХ и ТСХ [55, 85, 168, 189].

Качественный анализ. Использовали хроматографическую пластинки «Силуфол УФ-254». Пластинки для ТСХ-анализа предварительно выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение часа с целью их активирования. Хроматографировали восходящим способом в камере с системой растворителей: хлороформ - метанол - вода (60:30:6). После того как фронт растворителей пройдет 13 см, пластинку вынимали из камеры и высушивали на воздухе в течение 30 мин, затем пластинку опрыскивали 50 % раствором серной кислоты. После выдерживания пластинки в сушильном шкафу при температуре 100° С в течение 15 мин на хроматограмме идентифицировали пятна черного цвета с различными значениями R_f. Стевиозиду соответствовало пятно с R_f = 0,39, присутствующее как в стандартном, так и в испытуемом образце.

Количественное определение. Для скринингового анализа содержания комплекса гликозидов в листьях стевии была применена прямая спектрофотометрия [глава 2, раздел 2.2.3]. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта 95% и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане при t° - 90°C в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Измеряли оптическую плотность 1 раствора через 40 минут после приготовления. 0,5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, разбавляли в 30 мл спирта 95%. Объем раствора доводили спиртом этиловым 95% до метки и оставляли на 30 минут (раствор Б). Оптическую

плотность полученного раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 203 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя раствор сравнения для испытуемого раствора (рис.25). На рисунке 25 представлен общий вид спектра спиртовых извлечений из листьев стевии, полученного в ходе количественной оценки содержания суммы дитерпеновых гликозидов методом прямой спектрофотометрии. Для извлечений из листьев стевии отмечается присутствие характерного максимума при длине волны 203 ± 2 нм.

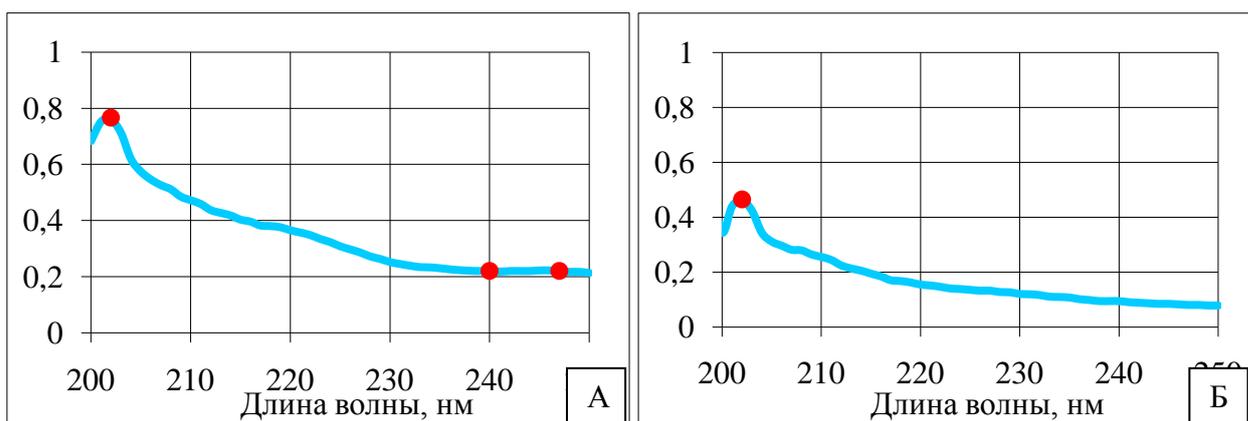


Рисунок 25 - А - УФ-спектр поглощения дитерпеновых гликозидов спиртового извлечения из сырья стевии, спирт этиловый 95% (1:10000), Б - УФ-спектр раствора сравнения.

В качестве раствора сравнения использовался сироп стевии с известным содержанием дитерпеновых гликозидов 31,2% и сухих веществ 62,4%. Доказана линейность поглощения при 203 нм от концентрации.

Для спектрофотометрических определений использовали извлечение с соотношением сырье-экстрагент 1:100. При использовании концентрации 40% спирта и 70% спирта не было ярко выраженного максимума. Для извлечений из листьев стевии отмечается присутствие характерного максимума при длине волны 203 ± 2 нм. Следует отметить, что при использовании сырья стевии различного происхождения характер спектра не менялся у всех образцов. Аналитическая длина волны может быть использована для идентификации дитерпеновых гликозидов.

При разработке количественного определения дитерпеновых гликозидов в листьях стевии были изучены УФ-спектры стевиозида. Для количественного

спектрофотометрического анализа необходим стандарт или величина удельного показателя поглощения дитерпеновых гликозидов, $El\ cm^{-1}\ \% = 57,3$. Мы провели сравнительный анализ лекарственного растительного сырья стевии, выращенной в разных климатических условиях, с целью выявления сырья с наибольшим содержанием дитерпеновых гликозидов. С использованием прямой спектрофотометрии были проанализированы образцы стевии, выращенной в различных регионах России и зарубежья. Полученные результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Результаты количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов в сырье стевии, в пересчете на стевиозид, %

| № п\п | Сорт стевии, регион произрастания | Содержание суммы дитерпеновых гликозидов, % |
|-------|-----------------------------------|---|
| 1 | Рамонская сладкая (Краснодар) | 17,92±0,278 |
| 2 | Рамонская сладкая (Крым) | 21,10±0,299 |
| 3 | Рамонская сладкая (Пенза) | 14,74±0,251 |
| 4 | София (Пенза) | 14,64±0,256 |
| 5 | Стевия (Парагвай) | 17,33±0,263 |
| 6 | Стевия (Индия) | 17,14±0,258 |
| 7 | Стевия (Тверь) | 14,39±0,261 |

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов в сырье стевии методом прямой спектрофотометрии указаны в таблице 17. Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 1,92\ \%$.

Таблица 17 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов в стевии листьях

| ЛРС | N | F | \bar{X} | S^2 | S | P, % | t (P, f) | $\Delta \bar{X}$ | E, % |
|--------------------------------------|---|---|-----------|----------|----------|------|----------|------------------|-------|
| Рамонская сластена (Краснодар) | 5 | 4 | 17,92 | 0,045462 | 0,213219 | 95 | 2,306 | ±0,186 | ±1,03 |
| Рамонская сластена (Крым) | 5 | 4 | 21,10 | 0,21613 | 0,464898 | 95 | 2,306 | ±0,407 | ±1,92 |
| Рамонская сластена (Пенза) | 5 | 4 | 14,74 | 0,042347 | 0,205783 | 95 | 2,306 | ±0,180 | ±1,22 |
| София (Пенза) | 5 | 4 | 14,64 | 0,044037 | 0,20985 | 95 | 2,306 | ±0,184 | ±1,25 |
| Стевия (Парагвай) | 5 | 4 | 17,33 | 0,053705 | 0,231744 | 95 | 2,306 | ±0,203 | ±1,17 |
| Стевия (Индия) | 5 | 4 | 17,14 | 0,047521 | 0,217994 | 95 | 2,306 | ±0,191 | ±1,11 |
| Стевия (Тверь) | 5 | 4 | 14,39 | 0,038696 | 0,196712 | 95 | 2,306 | ±0,172 | ±1,19 |

Было установлено, что содержание суммы дитерпеновых гликозидов в листьях стевии варьирует от 14,39 до 21,10 % (табл.16). Показано, что по содержанию дитерпеновых гликозидов стевия, выращенная в Пензенской области, на 30% уступает сырью стевии, полученного в условиях Республики Крым. Это дает основание полагать, что регион возделывания стевии в России может быть расширен и включать агроклиматические условия Пензенской области.

Валидация методики количественного определения.

Согласно требованиям к стандартизации неотъемлемой частью современного количественного анализа является валидация (оценка пригодности) используемых аналитических методик, которая включает в себя следующие характеристики: повторяемость, воспроизводимость [3, 19].

Повторяемость методики определяли на одном образце в 5 повторностях. Критерий приемлемости выражался относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Он составил для листьев стевии 1,18%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 18).

Таблица 18 - Повторяемость методики определения дитерпеновых гликозидов

| № п/п | Повторяемость | Содержание дитерпеновых гликозидов в листьях стевии, % |
|-------|---|--|
| 1 | 1 | 18,198 |
| 2 | 2 | 17,920 |
| 3 | 3 | 17,642 |
| 4 | 4 | 18,109 |
| 5 | 5 | 17,992 |
| 6 | Среднее значение | 17,972 |
| 7 | Относительное стандартное отклонение, % | 1,18 |

Воспроизводимости разработанной методики определение дитерпеновых гликозидов, проводили 2 аналитика. Исследование проводили на 3 образцах в 3 повторностях (табл. 19).

Таблица 19 - Воспроизводимость методики

| Повторность | Аналитик | Содержание дитерпеновых гликозидов в листьях стевии, % | | |
|---|----------|--|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 1 | 18,125 | 17,925 | 17,675 |
| 2 | 1 | 17,991 | 18,004 | 17,954 |
| 3 | 1 | 17,785 | 17,885 | 18,113 |
| 4 | 2 | 17,665 | 18,112 | 18,188 |
| 5 | 2 | 17,980 | 17,781 | 17,773 |
| 6 | 2 | 17,699 | 17,659 | 17,631 |
| Среднее значение | | 17,874 | 17,894 | 17,805 |
| Относительное стандартное отклонение, % | | 1,01 | 0,89 | 1,23 |

Критерии приемлемости выражались величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Он составил для листьев 1,04 %, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Таким образом, нами была проведена валидационная оценка методики количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов по повторяемости и воспроизводимости. Установлено, что методика количественного определения надежна и дает воспроизводимые результаты.

4.3.5. Качественный анализ фенольных веществ в стевии листьях

Отдельные группы биологически активных соединений стевии листьев определяли качественными реакциями (табл.33) [глава 2, раздел 2.1.1].

Для подтверждения присутствия флавоноидов в изучаемом сырье использовали химические реакции и ТСХ-анализ (табл.20, рис.26).

Таблица 20 - Результаты качественных реакций на флавоноиды.

| Группа БАВ | Реакция | Аналитический эффект |
|------------|-----------------------|---|
| Флавоноиды | Цианидиновая проба | Образование красного окрашивания |
| | С аммиаком | Появление оранжево-красного окрашивания |
| | С солями железа (III) | Появление зеленого окрашивания |

Тонкослойная хроматография

На линию старта хроматографической пластинки, предварительно активированной в сушильном шкафу при температуре 100-105°C, микропипеткой наносили 0,02 мкл водно-спиртового извлечения из листьев стевии. В качестве веществ-свидетелей на ту же пластинку наносили спиртовой раствор ГСО цинарозида, спиртовой раствор ГСО лютеолина, спиртовой раствор РСО кофейной кислоты, спиртовой раствор РСО хлорогеновой кислоты, спиртовой раствор ГСО рутина, спиртовой раствор ГСО гиперозида, спиртовой раствор ГСО кверцетина. Пластинку помещали в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителей в течение 24 ч, и хроматографировали восходящим способом в системе хлороформ – этиловый спирт 70 % – вода (26:16:3) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ».

После того как фронт растворителя проходил около 8 см, пластинку доставали из хроматографической камеры, высушивали и детектировали зоны веществ.

Полученные хроматограммы просматривали при дневном свете, в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм, а также обрабатывали щелочным раствором ДСК и фосфорно-молибденовой кислоты. Схема полученной хроматограммы представлена на рисунке 26.

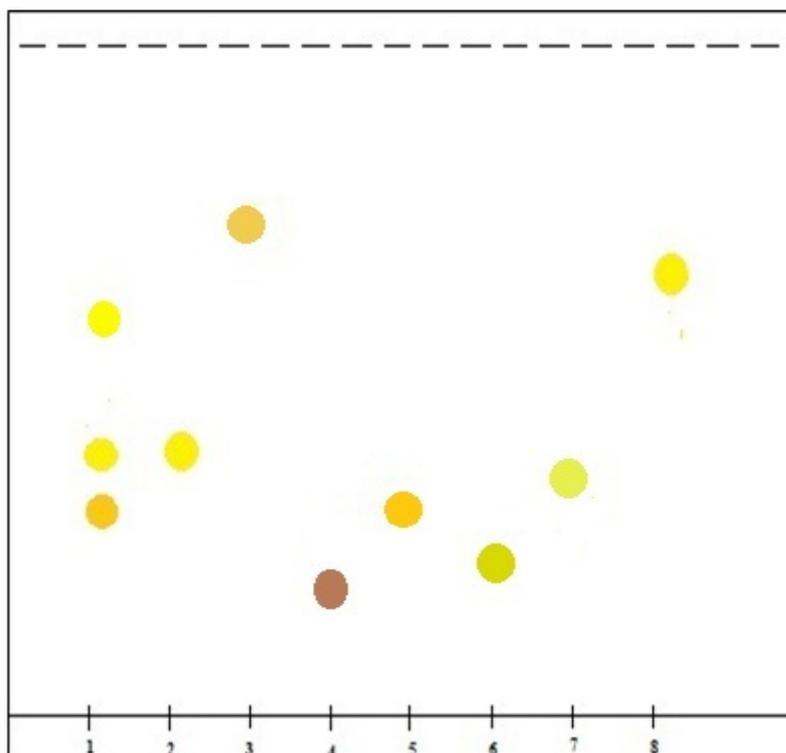


Рисунок 26 – Схема хроматограммы извлечения из стевии листьев.

Система хлороформ – этиловый спирт 70 % – вода (26:16:3).

Обозначения: 1 – извлечение из стевии листьев (1:50); 2- ГСО цинарозида, 3 - ГСО лютеолина, 4 - РСО кофейной кислоты, 5 - РСО хлорогеновой кислоты, 6 - ГСО рутина, 7 - ГСО гиперозида, 8 - ГСО кверцетина.

На полученной хроматограмме видно, что в извлечении 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 при проведении качественного анализа стевии листьев и ее препаратов методом тонкослойной хроматографии является использование в качестве веществ-стандартов хлорогеновой кислоты и цинарозида с последующим расчетом значений R_f . Можно также сказать, что цинарозид характерен для сырья многих представителей семейства сложноцветные (пижма, одуванчик, расторопша и др.).

Разработанная методика качественного анализа листьев стевии методом ТСХ вошла в проект ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Стевии листья».

4.3.6. Количественное определение содержания фенольных веществ в стевии листьях

4.3.6.1. Исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья стевии

Проводилось исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья. Изучалось влияние экстрагента на процесс экстракции (табл. 24, 28). При этом спирт этиловый 70%-ной концентрации был выбран в качестве оптимального экстрагента.

Нами также изучен вопрос относительно продолжительности экстракции на кипящей водяной бане (табл. 21).

Таблица 21 - Зависимость выхода БАС листьев стевии от времени настаивания на кипящей водяной бане

| № п/п | Время настаивания на кипящей водяной бане | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид | Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту |
|-------|---|---|---|
| 1 | 45 мин | 1,74 ± 0,03% | 10,73±0,06% |
| 2 | 60 мин | 1,64 ± 0,03% | 10,43±0,05% |
| 3 | 90 мин | 1,57 ± 0,03% | 10,09±0,05% |
| 4 | 120 мин | 1,51 ± 0,03% | 9,69±0,05% |

Результаты исследований по выбору оптимального соотношения «сырье-экстрагент» приведены в таблице 22. Оптимальными параметрами экстракции являются: извлечение 70 % этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 45 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:100.

Таблица 22 - Зависимость выхода БАС листьев стевии от соотношения «сырье-экстрагент»

| № п/п | Соотношение «сырье-экстрагент» | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид, % | Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту |
|-------|--------------------------------|--|---|
| 1 | 1:30 | 1,34 ± 0,03% | 10,08±0,05% |
| 2 | 1:50 | 1,50 ± 0,02% | 10,42±0,06% |
| 3 | 1:100 | 1,74 ± 0,03% | 10,73±0,06% |

Таблица 23 - Зависимость выхода БАС листьев стевии от степени измельченности сырья

| № п/п | Размер частиц | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид, % | Содержание суммы фенолпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту |
|-------|---------------|--|---|
| 1 | 1 мм | 1,70 ± 0,03% | 10,65±0,06% |
| 2 | 2 мм | 1,74 ± 0,03% | 10,73±0,06% |
| 3 | 3 мм | 1,61 ± 0,03% | 10,37±0,05% |

Зависимость выхода биологически активных соединений из стевии от степени измельченности сырья представлена в таблице 23. Следует отметить, что, по нашим данным, степень измельчения от 1 до 3 мм сильного влияния на экстракцию не оказывает. Однако в качестве оптимальной нами выбрана степень измельчения 2 мм.

4.3.6.2. Сумма флавоноидов

Оценка количественного содержания. Количественное определение флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом [глава 2, раздел 2.2.3]

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 (рис. 27, 28, 29).

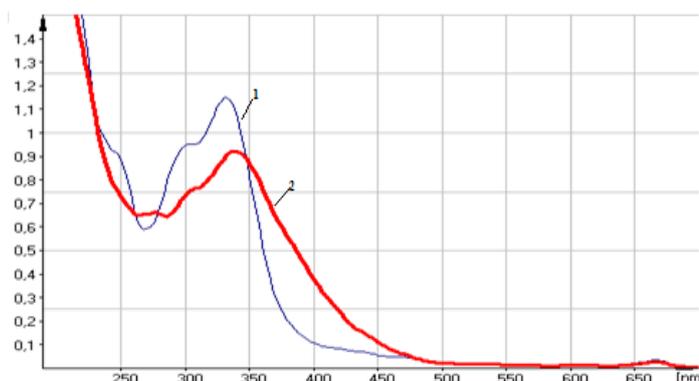


Рисунок 27 – УФ спектр водно-спиртового извлечения стевии листьев
Обозначения: 1 – исходный раствор (1:5000); 2 – раствор в присутствии AlCl₃

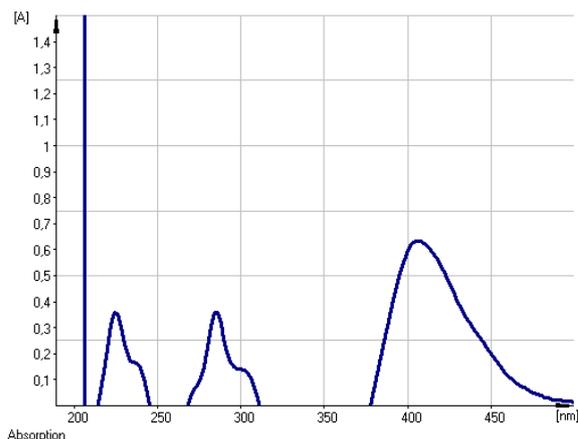


Рисунок 28 - Электронные спектры раствора цинарозида в присутствии $AlCl_3$.

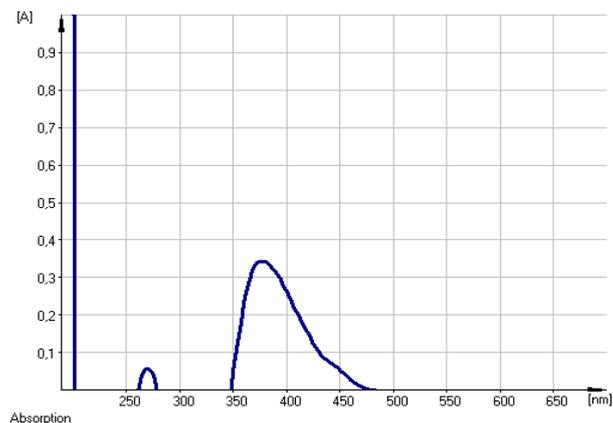


Рисунок 29 - УФ-спектр извлечения из стевии листьев (1:1250) в присутствии $AlCl_3$

Следует отметить, что положение максимумов не меняется при использовании разных концентраций этанола и листьев стевии различного происхождения. Таким образом, при реакции с хлоридом алюминия флавоноиды стевии образуют комплексное соединение с максимумом поглощения 400 нм.

Представлялось интересным проанализировать возможность использования 400 нм в качестве аналитической длины волны при разработке метода количественного определения суммы флавоноидов стевии. Для количественного спектрофотометрического анализа необходим стандарт или величина удельного показателя поглощения флавоноидов. В фармакопейных анализах классическим стандартом флавоноидов является рутин. Но он имеет максимум 412 ± 2 нм. В нашей работе в качестве стандарта был использован цинарозид, который с хлоридом алюминия имеет максимум при 400 ± 2 нм (рис. 28) и также используется в методиках анализа сырья, содержащего флавоноиды.

Следовательно, цинарозид по спектральным характеристикам близок к флавоноидам стевии листьев и может быть использован в методике количественного анализа в качестве стандарта.

Таблица 24 - Количественное содержание суммы флавоноидов в высушенных стевии листьях, % (среднее значение)

| № п/п | Сорт стевии, место произрастания | Спирт, % | Содержание флавоноидов, % (по ГСО цинарозида) | Содержание флавоноидов, % (по удельному показателю поглощения цинарозида при $\lambda = 400$ нм) |
|-------|--|----------|---|--|
| 1. | Рамонская сладостена (Россия, Краснодар) | 40 | 1,24 ±0,03 | 1,21 ±0,03 |
| 2. | Рамонская сладостена (Россия, Краснодар) | 70 | 1,74 ±0,02 | 1,71 ±0,02 |
| 3. | Рамонская сладостена (Россия, Краснодар) | 95 | 1,69 ±0,04 | 1,66 ±0,04 |
| 4. | Рамонская сладостена (Россия, Тверь) | 40 | 1,19 ±0,02 | 1,16±0,02 |
| 5. | Рамонская сладостена (Россия, Тверь) | 70 | 1,38±0,03 | 1,35±0,02 |
| 6. | Рамонская сладостена (Россия, Тверь) | 95 | 2,42±0,02 | 1,39±0,02 |
| 7. | Рамонская сладостена (Россия, Пенза) | 40 | 1,18±0,03 | 1,15±0,03 |
| 8. | Рамонская сладостена (Россия, Пенза) | 70 | 1,59±0,05 | 1,57±0,05 |
| 9. | Рамонская сладостена (Россия, Пенза) | 95 | 1,16±0,03 | 1,14±0,03 |
| 10. | София (Россия, Пенза) | 40 | 1,35±0,03 | 1,33±0,03 |
| 11. | София (Россия, Пенза) | 70 | 1,47±0,04 | 1,43±0,04 |
| 12. | София (Россия, Пенза) | 95 | 1,23±0,03 | 1,21±0,03 |
| 13. | Стевия (Парагвай) | 40 | 1,32±0,03 | 1,28±0,03 |
| 14. | Стевия (Парагвай) | 70 | 1,42±0,03 | 1,40±0,03 |
| 15. | Стевия (Парагвай) | 95 | 1,11±0,03 | 1,08±0,03 |
| 16. | Стевия (Индия) | 40 | 1,01±0,01 | 0,98±0,01 |
| 17. | Стевия (Индия) | 70 | 1,13±0,04 | 1,09±0,04 |
| 18. | Стевия (Индия) | 95 | 1,05±0,03 | 1,03±0,03 |
| 19. | Рамонская сладостена (Россия, Крым) | 40 | 1,19±0,03 | 1,17±0,03 |
| 20. | Рамонская сладостена (Россия, Крым) | 70 | 1,52±0,05 | 1,49±0,05 |
| 21. | Рамонская сладостена (Россия, Крым) | 95 | 1,29±0,03 | 1,25±0,03 |

В результате использования модифицированной методики определения флавоноидов были проанализированы образцы стевии различного региона произрастания. Полученные данные представлены в таблице 24.

Установлено, что содержание флавоноидов в стевии листьях (по ГСО цинарозида) варьирует от 1,01 до 1,74 %.

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье стевии методом дифференциальной спектрофотометрии указаны в таблице 25. Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 1,39$ % при определении суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид.

Таблица 25 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях стевии

| ЛРС | N | F | \bar{X} | S^2 | S | P, % | t (P, f) | $\Delta \bar{X}$ | E, % |
|-------------------------------|---|---|-----------|---------|----------|------|----------|------------------|------------|
| Рамонская сладена (Краснодар) | 5 | 4 | 1,74 | 0,00032 | 0,017889 | 95 | 2,776 | $\pm 0,016$ | $\pm 0,50$ |
| Рамонская сладена (Тверь) | 5 | 4 | 1,38 | 0,00025 | 0,015811 | 95 | 2,776 | $\pm 0,014$ | $\pm 0,51$ |
| Рамонская сладена (Пенза) | 5 | 4 | 1,59 | 0,00113 | 0,033615 | 95 | 2,776 | $\pm 0,029$ | $\pm 1,01$ |
| София (Пенза) | 5 | 4 | 1,47 | 0,00092 | 0,030332 | 95 | 2,776 | $\pm 0,027$ | $\pm 1,03$ |
| Стевия (Парагвай) | 5 | 4 | 1,42 | 0,00053 | 0,023022 | 95 | 2,776 | $\pm 0,020$ | $\pm 0,80$ |
| Стевия (Индия) | 5 | 4 | 1,13 | 0,00097 | 0,031145 | 95 | 2,776 | $\pm 0,027$ | $\pm 1,39$ |
| Рамонская сладена (Крым) | 5 | 4 | 1,52 | 0,00157 | 0,039623 | 95 | 2,776 | $\pm 0,034$ | $\pm 1,37$ |

Валидация методики количественного определения.

Согласно требованиям к стандартизации неотъемлемой частью современного количественного анализа является валидация (оценка пригодности) используемых аналитических методик, которая включает в себя следующие характеристики: повторяемость, воспроизводимость [3, 19].

Повторяемость методики определяли на одном образце в 5 повторностях. Критерий приемлемости выражался относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Он составил для листьев стевии 0,53%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 26).

Таблица 26 - Повторяемость методики определения флавоноидов

| № п/п | Повторяемость | Содержание флавоноидов в листьях стевии, % |
|-------|---|--|
| 1 | 1 | 1,74 |
| 2 | 2 | 1,77 |
| 3 | 3 | 1,75 |
| 4 | 4 | 1,76 |
| 5 | 5 | 1,79 |
| 6 | Среднее значение | 1,77 |
| 7 | Относительное стандартное отклонение, % | 0,53 |

Определение воспроизводимости методики мы выполняли вдвоем (2 аспиранта). Исследование проводили на 3 образцах в 3 повторностях (табл. 27). Критерии приемлемости выражались величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10%. Он составил для листьев 0,99 %, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Таблица 27 - Воспроизводимость методики

| Повторность | Аналитик | Содержание дитерпеновых гликозидов в листьях стевии, % | | |
|---|----------|--|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 1 | 1,81 | 1,77 | 1,79 |
| 2 | 1 | 1,77 | 1,79 | 1,82 |
| 3 | 1 | 1,75 | 1,79 | 1,73 |
| 4 | 2 | 1,79 | 1,76 | 1,76 |
| 5 | 2 | 1,75 | 1,79 | 1,75 |
| 6 | 2 | 1,73 | 1,74 | 1,77 |
| Среднее значение | | 1,766 | 1,773 | 1,770 |
| Относительное стандартное отклонение, % | | 0,91 | 0,64 | 0,99 |

Таким образом, нами была проведена валидационная оценка методики количественного определения суммы флавоноидов по повторяемости и воспроизводимости. Установлено, что методика количественного определения надежна и дает воспроизводимые результаты.

4.3.6.3. Сумма фенолпропаноидов

Самым распространенным методом количественного определения фенолпропаноидов является метод прямой спектрофотометрии [глава 2, раздел 2.2.3]. Количественное определение содержания фенолпропаноидов в стевии листьях прямым спектрофотометрическим методом проводили в пересчете на хлорогеновую кислоту, исходя из спектров извлечения из стевии и хлорогеновой кислоты (рис.30).

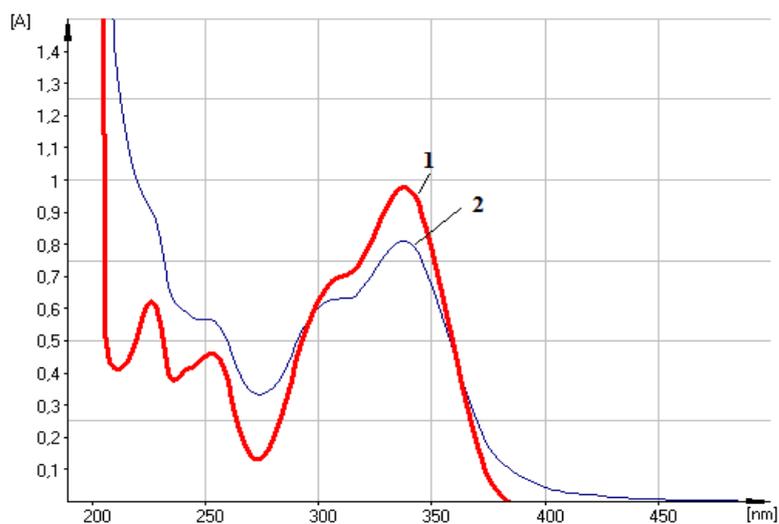


Рисунок 30 - УФ-спектр извлечения из стевии листьев (1:5000) исходный (2) и хлорогеновой кислоты (1).

Измеряли оптическую плотность извлечения стевии. Раствор готовили по методике: 0,5 мл помещали в мерную колбу на 25 мл, растворяли в 15 мл спирта этилового (40%, 70%, 95%), объем доводили до метки тем же спиртом. В качестве раствора сравнения используют раствор спирта (40%, 70% 95%).

Для экстракции фенолпропаноидов из листьев стевии целесообразно использование этанола 70%, так как интенсивность пиков в 40 % и 95%-ных спиртовых экстрактах меньше, по сравнению 70%, при условии одинаковых навесок и условий экстракции (Рис.31).

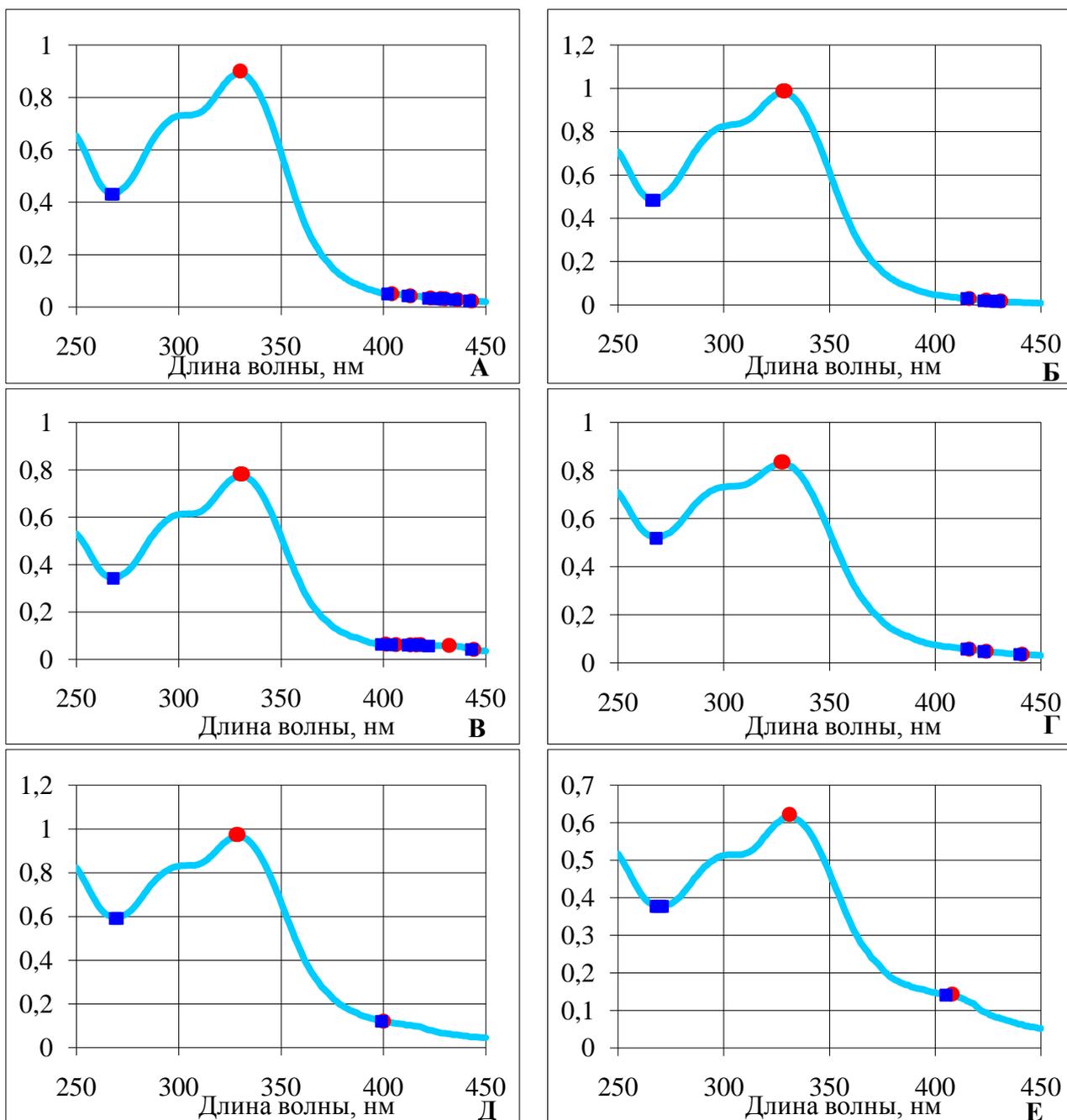


Рисунок 31 - УФ-спектр спиртового экстракта стевии (1:5000): А - Рамонская сладлена (Россия, Краснодар) 40 %, Б - Рамонская сладлена (Россия, Краснодар) 70 %, В - Рамонская сладлена (Россия, Краснодар) 95 %, Г - Рамонская сладлена (Россия, Пенза) 40 %, Д - Рамонская сладлена (Россия, Пенза) 70 %, Е - Рамонская сладлена (Россия, Пенза) 95 %.

С целью пересчета содержания веществ фенольной природы в извлечении из листьев стевии на хлорогеновую кислоту нами был рассчитан

удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при $\lambda=330$ нм для прямой спектрофотометрии. Значение $E_{1\text{см}}^{1\%}=497$ было включено в формулу расчета, что позволило не использовать РСО хлорогеновой кислоты в последующих определениях.

Определены максимумы собственного поглощения фенолпропаноидов спиртовых экстрактов из листьев стевии - 290 нм (плечо) и 330 нм (максимум). Положение максимумов не меняется при использовании в качестве экстрагента этанола 40%, 70% и 95% (рис.31). Раствор РСО хлорогеновой кислоты имеет максимум поглощения при 330 ± 2 нм и «плечо» при 290 ± 2 нм. Ввиду близкого расположения максимумов поглощения исследуемого извлечения из сырья стевии и вещества-стандарта хлорогеновой кислоты, одним из целесообразных вариантов стандартизации является прямая спектрофотометрия.

Результаты определения количественного содержания суммы фенолпропаноидов в высушенных стевии листьях представлены в таблице 28.

Таблица 28 - Количественное содержание суммы фенолпропаноидов в высушенных стевии листьях, %

| № п/п | Сорт стевии, регион произрастания | Спирт, % | Содержание фенолпропаноидов, % (по удельному показателю хлорогеновой кислоты при $\lambda=330$ нм) |
|-------|---------------------------------------|----------|--|
| 1. | Рамонская сладена (Россия, Краснодар) | 40 | 9,73±0,05 |
| 2. | Рамонская сладена (Россия, Краснодар) | 70 | 10,73±0,06 |
| 3. | Рамонская сладена (Россия, Краснодар) | 95 | 8,49±0,06 |
| 4. | Рамонская сладена (Россия, Тверь) | 40 | 9,21±0,04 |
| 5. | Рамонская сладена (Россия, Тверь) | 70 | 10,06±0,05 |
| 6. | Рамонская сладена (Россия, Тверь) | 95 | 7,75±0,06 |
| 7. | Рамонская сладена (Россия, Пенза) | 40 | 8,93±0,05 |
| 8. | Рамонская сладена (Россия, Пенза) | 70 | 10,51±0,05 |
| 9. | Рамонская сладена (Россия, Пенза) | 95 | 6,64±0,03 |
| 10. | София (Россия, Пенза) | 40 | 7,45±0,05 |
| 11. | София (Россия, Пенза) | 70 | 10,06±0,07 |
| 12. | София (Россия, Пенза) | 95 | 5,43±0,05 |
| 13. | Стевия (Парагвай) | 40 | 7,77±0,04 |
| 14. | Стевия (Парагвай) | 70 | 8,38±0,05 |
| 15. | Стевия (Парагвай) | 95 | 3,87±0,06 |
| 16. | Стевия (Индия) | 40 | 6,49±0,04 |

| | | | |
|-----|----------------------------------|----|------------|
| 17. | Стевия (Индия) | 70 | 6,73±0,04 |
| 18. | Стевия (Индия) | 95 | 4,03±0,03 |
| 19. | Рамонская сладена (Россия, Крым) | 40 | 8,17±0,06 |
| 20. | Рамонская сладена (Россия, Крым) | 70 | 10,03±0,05 |
| 21. | Рамонская сладена (Россия, Крым) | 95 | 4,75±0,07 |

Выявлено, что содержание фенилпропаноидов, при использовании в качестве экстрагента этанола 70%, в различных сортах стевии варьирует в интервале 6,73-10,73%. Отечественное сырье содержит большее количество суммы фенилпропаноидов по сравнению с импортными образцами. При этом в образцах сырья стевии, интродуцированной в климатических условиях Пензенской области и Республики Крым, содержание фенилпропаноидов выше по сравнению с сырьем, выращенным в зарубежных странах (Индия, Парагвай) (табл.28). Полученные результаты позволяют поставить листья стевии по содержанию фенилпропаноидов в один ряд с известными лекарственными растениями – источниками фенилпропаноидов.

Таблица 29 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в стевии листьях

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

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в сырье стевии методом прямой спектрофотометрии указаны в таблице 29. Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что ошибка

единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 0,66$ % при определении суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

4.3.7. Сумма тритерпеновых сапонинов

Для подтверждения присутствия сапонинов в изучаемом сырье использовали химические реакции (табл.30).

Таблица 30 - Результаты качественных реакций на сапонины.

| Группа БАВ | Реакция | Аналитический эффект |
|------------|-----------------------------------|---|
| Сапонины | Пенообразования | Образование обильной и стойкой пены |
| | Осаждения солями бария | Осаждение сапонинов |
| | Проба Лафона | При нагревании появляется зеленое окрашивание |
| | Концентрированной серной кислотой | Появление красного окрашивания |

Оценка количественного содержания. Определение суммарного содержания тритерпеновых сапонинов проводили спектрофотометрическим методом с использованием галохромной реакции с серной кислотой концентрированной [глава 2, раздел 2.2.3].

Таблица 31 - Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в стевии листьях, в пересчете на олеаноловую кислоту, %

| № п/п | Источник происхождения сырья | Количество тритерпеновых сапонинов, % |
|-------|------------------------------|---------------------------------------|
| 1. | Россия, Краснодар | 4,64 \pm 0,05 |
| 2. | Россия, Пенза | 2,51 \pm 0,03 |
| 3. | Россия, Крым | 3,35 \pm 0,04 |
| 4. | Россия, Тверь | 3,45 \pm 0,03 |
| 5. | Индия | 3,95 \pm 0,03 |
| 6. | Парагвай | 4,01 \pm 0,04 |

Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов в листьях стевии составляет от 2,51% (источник происхождения сырья – Россия, Пенза)

до 4,64 % (источник происхождения сырья – Россия, Краснодар) в пересчёте на олеаноловую кислоту и абсолютно сухое сырьё (табл.31).

4.3.8. Сумма органических кислот

Качественный анализ органических кислот. Для качественного анализа органических кислот получали водное извлечение из листьев стевии, а затем его хроматографировали.

К 0,5 г листьев стевии, измельченных до размера частиц 2 мм, добавляли 10 мл смеси эфира диэтилового и ацетона в соотношении 2,5:7,5 и несколько капель 10%-ного раствора кислоты серной. Для проведения экстракции взбалтывали все в течение 30 минут. Полученный экстракт фильтровали, растворитель отгоняли. Остаток растворяли в 1 мл воды и хроматографировали на бумаге в системе н-бутанол – кислота муравьиная – вода (18:2:9) с рабочими стандартами (PCO) органических кислот. Проявляли 0,05% спиртовым раствором бромфенолового синего. Далее хроматограммы помещали в сушильный шкаф (105-110°C). На синем фоне хроматограммы наблюдали белые пятна.

С помощью хроматографического разделения были обнаружены две зоны адсорбции, характерные для органических кислот. Сравнивая с достоверными образцами свидетелей, выявили соответственные зоны адсорбции лимонной кислоты ($R_f - 0,32$) и яблочной кислоты ($R_f - 0,70$).

Количественное определение свободных органических кислот проводили по методике ГФ РФ XIV издания [36]. Полученные данные представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Содержание свободных органических кислот в листьях стевии, %

| № п/п | Источник происхождения сырья | Количество органических кислот, % |
|-------|------------------------------|-----------------------------------|
| 1. | Россия, Краснодар | 5,18±0,05 |
| 2. | Россия, Пенза | 4,49±0,05 |
| 3. | Россия, Крым | 5,38±0,04 |
| 4. | Россия, Тверь | 3,81±0,03 |
| 5. | Индия | 4,76±0,04 |
| 6. | Парагвай | 5,15±0,06 |

Количественное содержание органических кислот в листьях стевии в пересчёте на кислоту яблочную и воздушно-сухое сырьё составляет от 3,81% (источник происхождения сырья – Россия, Тверь) до 5,38% (источник происхождения сырья – Россия, Крым) (табл.32).

4.3.9. Сумма каротиноидов

4.3.9.1. Качественный анализ

Исследование качественного состава каротиноидов проводили методом хроматографии в тонком слое сорбента (восходящим способом) из ацетоновой фракции, в следующей системе растворителей: петролейный эфир – ацетон (6:4).

Хроматографические пластинки просматривали в видимом свете и УФ-свете без проявления реактивами. Отмечали появление зон адсорбции от жёлтого до ярко-оранжевого цвета. В связи с недоступностью стандартных образцов каротиноидов, значения R_f полученных зон адсорбции сравнивали со значениями, описанными в литературе [4, 81] (табл. 33).

Таблица 33 - Результаты хроматографического определения каротиноидов стевии листьев

| Система растворителей: петролейный эфир – ацетон (6:4) | | спирт метиловый – бензол – этилацетат (5:70:25) | | Обнаружено |
|---|-----------|--|-----------|-------------------------------------|
| R_f | $R_{фст}$ | R_f | $R_{фст}$ | |
| 0,92 | 0,93 | 0,91 | 0,93 | β-каротин |
| 0,74 | 0,76 | 0,75 | 0,77 | α-криптоксантин, β-криптоксантин |

Примечание: R_f – значение полученных экспериментальным путём зон адсорбции; $R_{фст}$ – значение стандартных образцов каротиноидов, из литературных источников.

Наиболее яркими после проявления были зоны, соответствующая β-каротину и β-криптоксантину (α-криптоксантину).

Идентификации каротиноидов проводили методом УФ-спектроскопии. Вырезали зоны адсорбции веществ и экстрагировали в ацетоне, далее определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-101, в качестве раствора сравнения использовали ацетон [81].

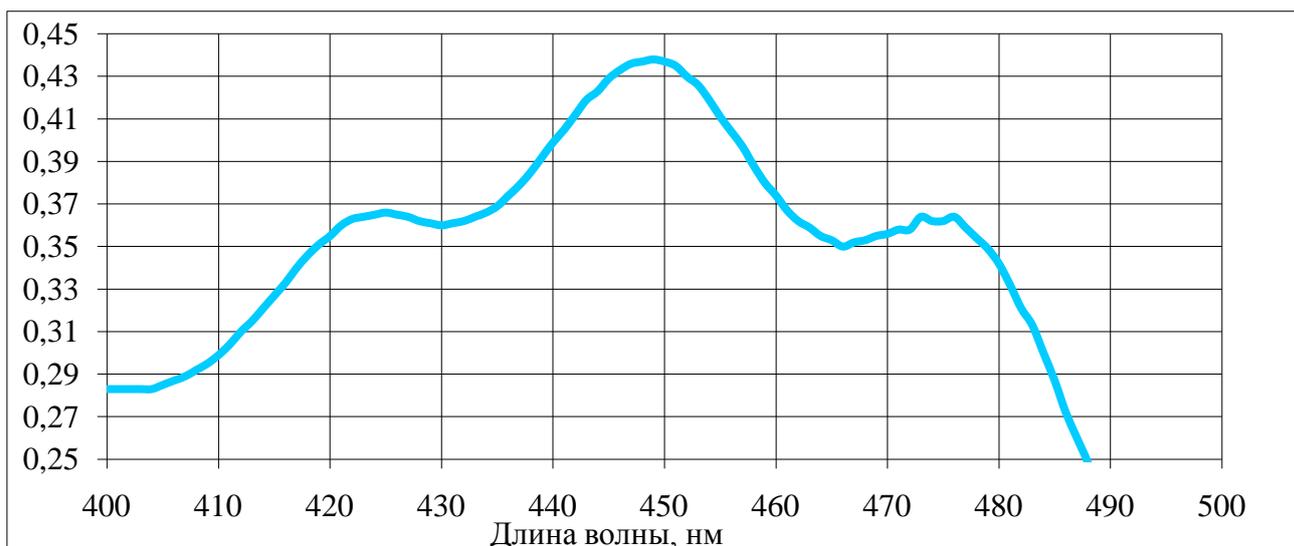


Рисунок 32 – УФ-спектр вещества 1

Вещество 1. Максимумы поглощения спектров относительно ацетона: λ_{max} 476, 450 нм (рис.32). В результате проведенного анализа методом тонкослойной хроматографии и УФ- спектрофотометрии вещество 1 идентифицировано как β -каротин.

Вещество 2. Максимумы поглощения спектров относительно ацетона: λ_{max} 477, 451 нм. В результате проведенного анализа методом тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии вещество 2 идентифицировано как β -криптоксантин.

4.3.9.2. Количественное определение каротиноидов

Количественное определения каротиноидов в стевии листьях проводили методом УФ-спектрофотометрии [глава 2, раздел 2.2.3].

Таблица 34 - Результаты УФ – спектрофотометрического определение каротиноидов в стевии листьях

| № п/п | Источник происхождения сырья | Количество каротиноидов, в пересчете на β -каротин, мг% |
|-------|------------------------------|---|
| 1. | Россия, Краснодар | 4,56±0,02 |
| 2. | Россия, Пенза | 4,33±0,03 |
| 3. | Россия, Крым | 7,15±0,04 |
| 4. | Россия, Тверь | 5,46±0,04 |
| 5. | Индия | 4,41±0,03 |
| 6. | Парагвай | 5,27±0,03 |

Содержание суммы каротиноидов в стевии листьях составило от 4,33 мг% (источник происхождения сырья – Россия, Пенза) до 7,15 мг% (источник происхождения сырья – Россия, Крым) в пересчёте на β -каротин и высушенное сырьё (табл.34).

4.4. Определение антимикробной активности сырья

4.4.1. Приготовление и стандартизация извлечений

Для определения сухого остатка 1 мл полученного извлечения помещали во взвешенный бюкс, выпаривали на водяной бане досуха и сушили два часа при температуре $102,5 \pm 2,5$ °С, затем охлаждали в эксикаторе 30 минут и взвешивали.

4.4.2. Определение сухого остатка

Сухой остаток спиртового экстракта в граммах (после высушивания): масса образца № 1 = 0,0159 г, № 2 = 0,0139 г, № 3 = 0,0111 г, № 4 = 0,0128 г

Сухой остаток настоя в граммах (после высушивания): Масса образца № 1 = 0,0372 г Масса образца № 2 = 0,0342 г Масса образца № 3 = 0,0406 г Масса образца № 4 = 0,0342 г

Сухой остаток сока в граммах (после высушивания): масса образца № 2 = 0,2005 г, № 3 = 0,1500 г, №4 = 0,0890 г

4.4.3. Антибактериальные свойства

Результаты изучения антибактериальных свойств извлечений из стевии листьев представлены в таблице 35 и на рисунке 33.

Таблица 35 - Результаты влияния сорта стевии и извлечений из сырья в отношении некоторых условно-патогенных бактерий

| Название сорта, номер образца | Извлечение | <i>Staphylococcus sp.</i> | <i>Bacillus sp.</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Mucococcus sp.</i> |
|-------------------------------|------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| Рамонская | Настой | Рк | Рк | Рк | БЦ (ЗОР 10) |

| | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------|------------|----|----------------|
| сластена, образец №1 | | | | | мм) |
| | Спиртовый экстракт | БС + БЦ (ЗОР 28 мм) | Рк | Рк | БС |
| | Сок | Нет данных | Нет данных | - | - |
| Рамонская сластена, образец №2 | Настой | Рк | Рк | БС | Рк |
| | Спиртовый экстракт | Рк | Рк | Рк | Рк |
| | Сок | Рк | - | Рк | Рк |
| Услава | Настой | БС | Рк | - | Рк |
| | Спиртовый экстракт | БС | Рк | Рк | БС |
| | Сок | Рк | - | Рк | БС |
| София | Настой | Рк | Рк | Рк | БЦ (ЗОР 13 мм) |
| | Спиртовый экстракт | Рк | Рк | Рк | БС |
| | Сок | Рк | - | Рк | Рк |

Исследования показали, что наиболее чувствительными микроорганизмами являются *Mucococcus sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Sarcina flava* [107].

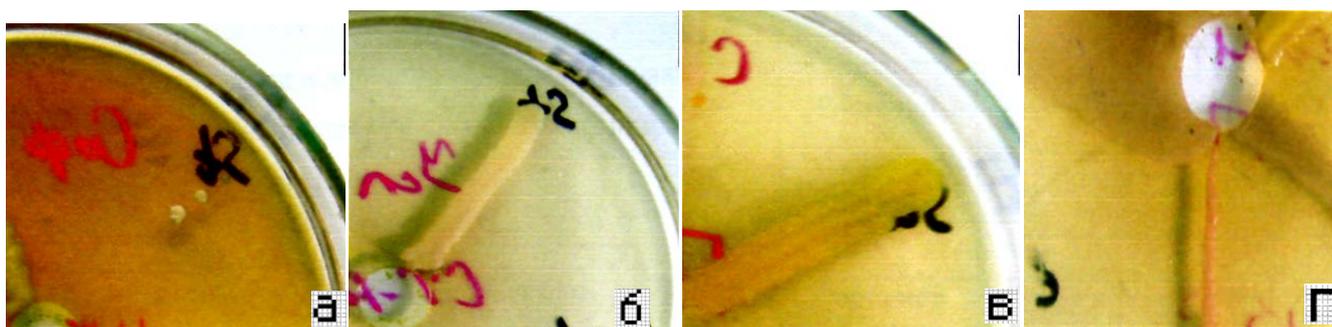


Рисунок 33 - Характер роста по штриху бактериальных культур а - диаметр зоны отсутствия роста *Staphylococcus sp.* 28 мм (БЦ), единичные колонии (БС), б - рост *Staphylococcus sp.*, характерный для данной культуры, в - диаметр зоны отсутствия роста *Mucococcus sp.* 13 мм (БЦ), г - рост *Mucococcus sp.*, характерный для данной культуры.

Анализ антимикробной активности веществ, использованных в качестве контрольных, показал, что они не оказывали действия на испытуемые микроорганизмы.

При изучении антибактериального действия извлечений из листьев стевии выявлено следующее: все извлечения обладали антимикробной

активностью, при этом ее проявление зависело от культуры микроорганизма, лекарственной формы, сорта стевии и т.д. (табл.35).

Антибактериальное действие в отношении грамположительных микроорганизмов оказалось более выраженным, чем в отношении грамотрицательных (рис. 33).

Из грамположительных микроорганизмов наиболее чувствительными культурами оказались *Staphylococcus sp.* (40,3 % случаев), грамотрицательных — *Mухосoccus sp.* (58,0 % случаев) и *Escherichia coli* (24,7 % случаев). При этом отмечен как бактерицидный эффект (в отношении *Mухосoccus sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*), так и бактериостатический (в отношении *Staphylococcus sp.*, *Mухосoccus sp.*) (табл. 35).

Показано, что из исследуемых извлечений наибольшее антибактериальное действие оказывали настой (в 38,0% случаев) и спиртовой экстракт (в 38,0% случаев), при этом сок оказывал антибактериальное действие в 25% случаев (рис.34).

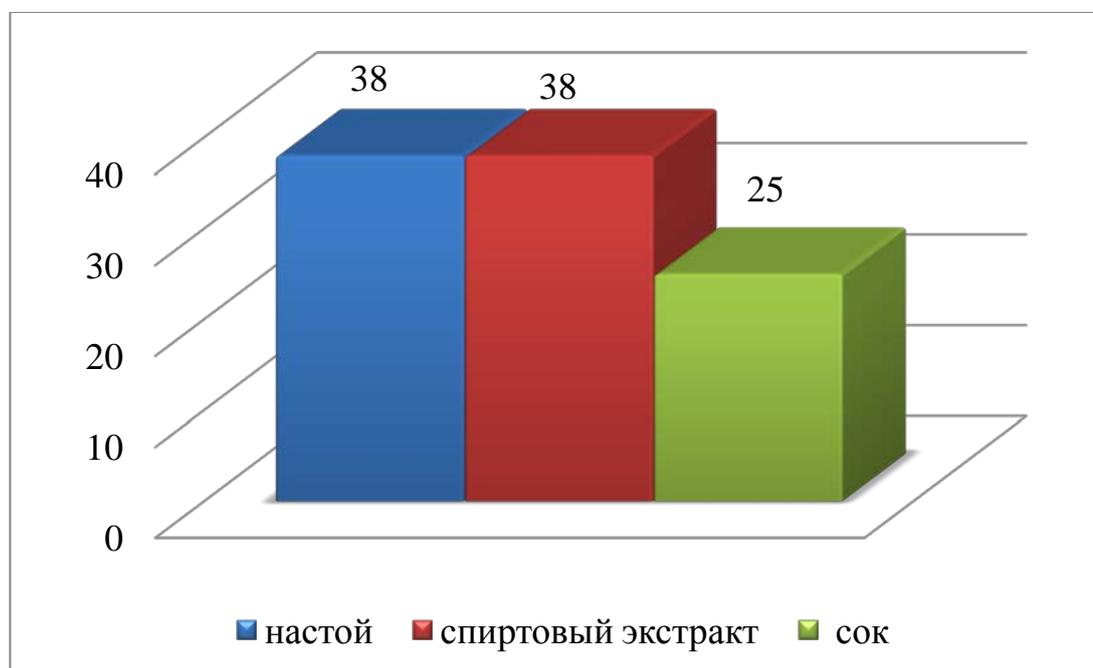


Рисунок 34 - Частота проявления антибактериального эффекта в зависимости от извлечения, %.

Оценка антибактериальной активности экстрактов и сока показала, что она выше у сортов Услада и София по сравнению с сортом Рамонская сладостена (табл. 36).

Таблица 36 - Результаты влияния сортовых особенностей на проявление антибактериального эффекта, %

| Сорт | Настой | Спиртовый экстракт | Сок |
|----------------------|--------|--------------------|------|
| Рамонская сладостена | 30,0 | 30,0 | 45,5 |
| Услада | 30,0 | 60,0 | 40,0 |
| София | 30,0 | 64,0 | 55,0 |

Таким образом, полученные экспериментальные данные по индикации антибактериального эффекта сырья стевии в условиях *in vitro* свидетельствуют о его наличии. Вероятнее всего, выраженность действия извлечений в отношении условно-патогенных микроорганизмов связана с содержанием дитерпеновых гликозидов, флавоноидов и фенилпропаноидов. Наши данные по определению указанных групп биологически активных соединений в образцах подтверждают это. Однако частота проявления антибактериальных эффектов сырья стевии различного происхождения недостаточна для того, чтобы рекомендовать его для создания препаратов антимикробного действия. При этом зоны отсутствия роста (ЗОР) тест-культур находятся в пределах 10-28 мм (изоляты *Mucococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*), что свидетельствует о варьировании уровня их чувствительности (от низкого до высокого).

Высокочувствительными считали бактериальные изоляты, дающие при действии извлечений зоны отсутствия и задержки роста, превышающие 25 мм; чувствительными - от 15 до 25 мм; малочувствительными - от 11 до 15 мм; нечувствительными – менее 11 мм.

Полученные результаты важно также учитывать при определении микробиологической чистоты, чтобы избежать ошибок интерпретации, возможных в связи с проявлением антимикробного действия нового лекарственного средства на основе стевии.

4.5. Разработка проекта фармакопейной статьи «Стевии листья»

Для разработки подходов к стандартизации стевии листьев использованы результаты исследований компонентного состава сырья данного растения.

Качественный анализ стевии листьев предлагается проводить методом тонкослойной хроматографии с использованием в качестве стандартного образца хлорогеновой кислоты (фенилпропаноиды) и цинарозида (флавоноиды), а также метод УФ-спектроскопии с последующим описанием полученного электронного спектра извлечения из стевии листьев.

4.5.1. Качественный анализ сырья изучаемого растения

Качественные реакции с водно-спиртовым извлечением стевии листьев.

Методики получения извлечения и качественных реакций, представлены в разделе 2.2.1.

Полученные результаты представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Качественные реакции с водно-спиртовым извлечением стевии

| Группа БАВ | Реакция | Ожидаемый эффект | Результат |
|------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Флавоноиды | Цианидиновая реакция | Розовое окрашивание | Розовое окрашивание |
| Флавоноиды | Со щелочью | Желтое окрашивание | Желтое окрашивание |
| Флавоноиды | С аммиаком | Желтое окрашивание | Желтое окрашивание |
| Флавоноиды | С солями железа | Зеленое окрашивание и осадок | Зеленое окрашивание и осадок |

Тонкослойная хроматография. Для доказательства присутствия дитерпеновых гликозидов в экстрактах из стевии листьев предлагаем использовать ТСХ анализ, с характерной зоной R_f около 0,55 (PCO хлорогеновой кислоты), а также R_f около 0,64 (ГСО цинарозида).

УФ- спектроскопия. В проект фармакопейной статьи предлагаем включить спектр поглощения раствора Б, полученного по методике определения фенилпропаноидов. УФ-спектр раствора Б в области от 250 до 650 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 330 нм и плечо при длине волны 290 нм (рис. 35).

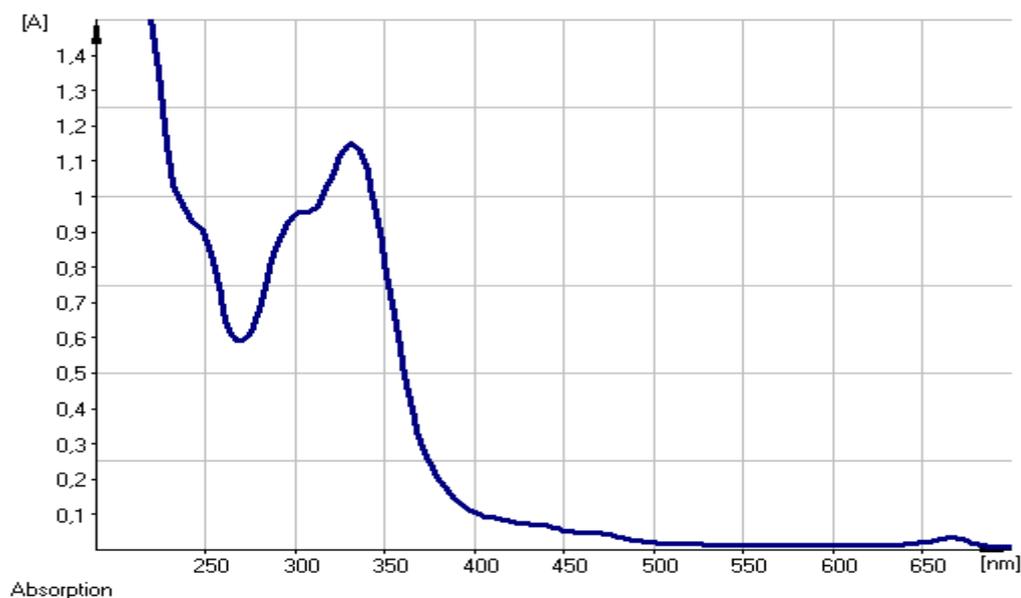


Рисунок 35 - УФ-спектр водно-спиртового извлечения из стевии листьев (1:500).

4.5.2. Количественный анализ сырья

Мы предлагаем проводить оценку качества сырья стевии листьев не только по содержанию фенилпропаноидов, но и по содержанию флавоноидов.

Определение содержания суммы фенилпропаноидов. Оценка качества сырья проводили по содержанию фенилпропаноидов по методике, описанной в разделе 2.2.3.

Стевии листья содержат большое количество фенилпропаноидов. Основным компонентом является хлорогеновая кислота. Фенилпропаноиды выделяли из сырья: измельченного и порошоканного. Для экстрагирования использовали 70 % спирт.

Как следует из результатов исследования, полученных в разделе 4.3.6., наибольшее количество фенилпропаноидов экстрагировалось в порошоканном сырье. Содержание суммы фенилпропаноидов в листьях стевии колеблется от 6 до 10 %. Предлагаем включить в ФС следующий показатель: содержание суммы фенилпропаноидов не менее 5 %.

Определение суммы флавоноидов. Стевии листья содержат большое количество флавоноидов. Флавоноиды получали из сырья: измельченного и порошоканного. Для экстрагирования использовали спирт различной

концентрации по методике, описанной в пункте 2.2.3. Основным компонентом является цинарозид. По результатам исследований, полученных в пункте 4.3.5., наибольшее количество флавоноидов экстрагировалось в порошокванном сырье 70 % спиртом. Содержание флавоноидов в листьях стевии колеблется от 1,13% до 1,74%. Предлагаем включить в ФС следующий показатель: содержание суммы флавоноидов не менее 1,0%.

4.5.3. Числовые показатели

Для присвоения ЛРС статуса фармакопейного помимо методик качественного и количественного анализа необходимо обоснование числовых показателей для сырья. Для стевии листьев нами разработаны числовые показатели, которые были включены в проект ФС на новый вид ЛРС.

Для *цельного сырья* рекомендуются следующие числовые показатели: фенолпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 5%, флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 1,0%; влажность не более 13%; золы общей не более 14%; золы, не растворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 7%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 5%; кусочков цветков и стеблей не более 1%; органической примеси не более 3%; минеральной примеси не более 1%.

Для *измельченного сырья* рекомендуются следующие числовые показатели: фенолпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 5%, флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 1,0%; влажность не более 13%; золы общей не более 14%; золы, не растворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, не более 7%, частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5%; кусочков цветков и стеблей не более 1%; органической примеси не более 3%; минеральной примеси не более 1%.

Для *порошка* рекомендуются следующие числовые показатели: фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 5%, флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 1,0%; влажность не более 13%; золы общей не более 14%; золы, не растворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, не более 7%, частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5%; минеральной примеси не более 1%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4:

1. Основные диагностические признаки для использования в подтверждении подлинности нового ЛРС «Стевии листья»: лист простой, сидячий, 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; характер кутикулы лучисто-морщинистый, устьица имеют круглую форму, устьичный аппарат аномоцитный, тип устьичных клеток чечевицевидный, волоски простые многоклеточные однорядные конусовидные и остроконусовидные, характер утолщенности клеточных стенок волосков тонкостенные, 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.
2. Качественными реакциями, а также методом тонкослойной хроматографии подтверждено наличие в стевии листьях флавоноидов, сапонинов, каротиноидов, аминокислот, дитерпеновых гликозидов и вещества терпеновой природы.
3. Впервые в Российской Федерации в стевии листьях идентифицированы флавоноиды (цинарозид), фенилпропаноиды (хлорогеновая кислота).
4. Полученные данные о химическом составе сырья стевии были приняты за основу при разработке методик стандартизации листьев стевии и препаратов на ее основе.
5. Разработаны методики количественного определения суммы фенилпропаноидов (прямая спектрофотометрия), определены параметры УФ-спектра водно-спиртового извлечения из листьев стевии, максимум

при $\lambda=330\pm 2$ нм и «плечо» при $\lambda=290\pm 2$ нм; также определены параметры УФ-спектра суммы флавоноидов (метод дифференциальной спектрофотометрии): в присутствии спиртового раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромным сдвиг, максимум дифференциального спектра при $\lambda=400\pm 2$ нм.

6. Установлено 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 %, фенилпропаноидов от 6,73 до 10,73%, флавоноидов от 1,13 до 1,74%.
7. С помощью метода капиллярного электрофореза определен аминокислотный состав стевии листьев. Идентифицировано 13 аминокислот, установлен их количественный состав. Доля незаменимых аминокислот в сырье стевии составила от 2,89 % до 4,99%.
8. Установлено, что антибактериальное действие извлечений из стевии листьев более выражено в отношении грамположительных микроорганизмов, чем в отношении грамотрицательных.
9. Разработан проект фармакопейной статьи «Стевии листья – *Steviae folia*». Установлены новые показатели качества сырья: фенилпропаноиды не менее 5,0%, флавоноиды не менее 1,0%. Предложено проводить оценку качества данного вида сырья не только по содержанию фенилпропаноидов, но и по содержанию флавоноидов.

ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СБОРА «СТЕЛИНОЛ»

5.1. Теоретическое обоснование компонентного состава сбора и его оптимизация

Основной задачей наших исследований являлась разработка сбора с антидиабетической активностью. При составлении прописи сбора мы исходили из методологических принципов создания растительных композиций с предполагаемым спектром фармакологической активности [106, 117, 121, 127].

В этом отношении большой интерес представляют семена льна и листья стевии. Объединение действующих веществ этих видов сырья в одной композиции может привести к взаимному обогащению фармакологического действия.

В соответствии с принципом системности, алгоритм подбора компонентного состава может быть представлен следующим образом в таблице 38.

Таблица 38 - Алгоритм подбора компонентного состава сбора

| № | Целевое назначение группы растительных компонентов | Число компонентов | Наименование ЛРС |
|---|--|-------------------|----------------------------|
| 1 | ЛР, отвечающее за основной фармакологический эффект | 1 | стевии листья |
| 2 | ЛР, обеспечивающие желательные сопутствующие эффекты | 1-2 | стевии листья, льна семена |
| 3 | ЛР корректирующее | 1 | стевии листья |

Разработанный алгоритм оптимизации предлагаемой фитокомпозиции представлен в таблице 39.

Таблица 39 - Алгоритм оптимизации состава предлагаемого сбора

| Наименование ЛРС (степень измельчения) | Основные фармакологические эффекты | Количество ЛРС | |
|---|---|----------------|-----------------|
| | | в частях | % |
| Льна семена (цельные, измельченные, порошкованные) | Антидиабетический, противовоспалительный, иммуномодулирующий | 10,0 | 90,91- 91,67 |
| Стевии листья (цельные, измельченные, порошкованные) | Антидиабетический, иммуномодулирующий, подсластителя - корриганта вкуса | 1,0-2,0 | 8,33-9,09 |

В процессе оптимизации использовались различные степени измельченности льна семян. Рассматривались варианты состава предлагаемого сбора с учетом степени измельчения растительного сырья, включая стевии листья. Наиболее оптимальным вариантом является использование цельных льна семян (табл. 40).

Таблица 40 - Варианты состава предлагаемого сбора с учетом степени измельчения растительного сырья и количества экстрагента воды

| № п/п | Семена льна | | Листья стевии | | Объем воды, мл |
|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-------------------|
| | Степень измельчения (размер, мм) | Масса, г | Степень измельчения (размер, мм) | Масса, г | |
| 1. | Цельные | 50,0 | Измельченные(>2,0...<5,0) | 1,0 | 100 |
| 2. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 50,0 | Измельченные(>2,0...<5,0) | 1,0 | 150 |
| 3. | Порошкованные (>0,5) | 50,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,0 | 200 |
| 4. | Цельные | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,0 | 100 |
| 5. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,0 | 150 |
| 6. | Порошкованные (>0,5) | 100,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,0 | 200 |
| 7. | Цельные | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,0 | 100 |
| 8. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,0 | 150 |
| 9. | Порошкованные (>0,5) | 110,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,0 | 200 |
| 10. | Цельные | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,0 | 100 |
| 11. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,0 | 150 |
| 12. | Порошкованные (>0,5) | 120,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,0 | 200 |
| 13. | Цельные | 50,0 | Измельченные(>2,0...<5,0) | 1,5 | 100 |
| 14. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 50,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 150 |
| 15. | Порошкованные (>0,5) | 50,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,5 | 200 |
| 16. | Цельные | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 100 |
| 17. | Измельченные | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 150 |

| | | | | | |
|-----|----------------------------|-------|----------------------------|-----|-----|
| | (>2,0...<5,0) | | | | |
| 18. | Порошкованные (>0,5) | 100,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,5 | 200 |
| 19. | Цельные | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 100 |
| 20. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 150 |
| 21. | Порошкованные (>0,5) | 110,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,5 | 200 |
| 22. | Цельные | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 100 |
| 23. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 1,5 | 150 |
| 24. | Порошкованные (>0,5) | 120,0 | Порошкованные (>0,5) | 1,5 | 200 |
| 25. | Цельные | 50,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 100 |
| 26. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 50,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 150 |
| 27. | Порошкованные (>0,5) | 50,0 | Порошкованные (>0,5) | 2,0 | 200 |
| 28. | Цельные | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 100 |
| 29. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 150 |
| 30. | Порошкованные (>0,5) | 100,0 | Порошкованные (>0,5) | 2,0 | 200 |
| 31. | Цельные | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 100 |
| 32. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 150 |
| 33. | Порошкованные (>0,5) | 110,0 | Порошкованные (>0,5) | 2,0 | 200 |
| 34. | Цельные | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 100 |
| 35. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 2,0 | 150 |
| 36. | Порошкованные (>0,5) | 120,0 | Порошкованные (>0,5) | 2,0 | 200 |
| 37. | Цельные | 50,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 100 |
| 38. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 50,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 150 |
| 39. | Порошкованные (>0,5) | 50,0 | Порошкованные (>0,5) | 3,0 | 200 |
| 40. | Цельные | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 100 |
| 41. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 100,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 150 |
| 42. | Порошкованные (>0,5) | 100,0 | Порошкованные (>0,5) | 3,0 | 200 |
| 43. | Цельные | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 100 |
| 44. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 110,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 150 |
| 45. | Порошкованные (>0,5) | 110,0 | Порошкованные (>0,5) | 3,0 | 200 |
| 46. | Цельные | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 100 |
| 47. | Измельченные (>2,0...<5,0) | 120,0 | Измельченные (>2,0...<5,0) | 3,0 | 150 |
| 48. | Порошкованные (>0,5) | 120,0 | Порошкованные (>0,5) | 3,0 | 200 |

5.2. Исследование проявляемости диагностически значимых признаков лекарственного растительного сырья в сборе

Под диагностически значимыми признаками понимают анатомо-диагностические признаки, четко отличающие данное лекарственное растительное сырье от других видов, представленные в исследуемом объекте в достаточном количестве и сохраняющиеся при измельчении ЛРС до порошка с размером частиц 0,5 мм.

Для анализа взяли растительный сбор «Стелинол». Результаты анализа приведены в таблице 41.

Таблица 41 - Проявляемость диагностически значимых признаков в сборе «Стелинол»

| Название компонента | Проявляемость диагностически значимых признаков в сборе, % | Относительная ошибка определения, при доверительной вероятности 0,95; n=10 |
|---------------------|--|--|
| Стевия | 66,7±9,5 | 14,2 |
| Лен посевной | 54,5±7,7 | 14,1 |

Полученные данные свидетельствуют, что проявляемость диагностически значимых частиц компонентов в растительном сборе больше у стевии, чем у льна посевного. В качестве числового показателя для включения в ФСП предлагается показатель ДЗП не менее 40%.

5.3. Расчет индекса участия компонентов сырья в сборе

Для проверки компонентного состава сбора были определены индексы участия (встречаемость диагностически значимых частиц ЛРС в микропрепарате) [104].

Сбор «Стелинол» имеет следующий состав:

- стевии листьев– 1,0 г;
- льна семян– 99,0 г;

Определение содержания компонентов в сборе проводили по описанной методике [104]. Доверительные интервалы индексов участия для каждого компонента приведены в таблице 42.

Таблица 42 - Индексы участия компонентов сбора «Стелинол»

| Компоненты | Средние значения | Доверительные интервалы |
|---------------|------------------|-------------------------|
| Стевии листья | 36,1 | 30,7 – 41,5 |
| Льна семена | 63,9 | 58,55 – 69,25 |

Доверительные интервалы индексов участия были получены на основании статистической обработки данных 3 измерений, представленных в таблицах 43, 44.

Таблица 43 - Результаты количественного определения компонентов сбора «Стелинол»

| № опыта | Количество частиц | | Сумма частиц | Индекс участия | |
|---------|-------------------|-------------|--------------|----------------|-------------|
| | стевии листья | льна семена | | стевии листья | льна семена |
| 1 | 3 | 3 | 6 | 50,0 | 50,0 |
| 2 | 2 | 4 | 6 | 33,3 | 66,6 |
| 3 | 1 | 3 | 4 | 25,0 | 75,0 |

Таблица 44 - Результаты статистической обработки данных количественного определения компонентов сбора «Стелинол»

| Название компонента сбора | Среднее значение индекса участия, % | P, % | $t_{p,f}$ | Δx | E, % |
|---------------------------|-------------------------------------|------|-----------|------------|------|
| Стевии листья | 36,1 | 95 | 2,23 | 5,4 | 14,9 |
| Льна семена | 63,9 | 95 | 2,23 | 5,35 | 8,3 |

На основании данных результатов, можно сказать, что практически у любого сбора можно предположить индексы участия компонентов, зная его рецептуру [104].

5.4. Определение числовых показателей

Числовые показатели качества сбора «Стелинол» определяли в аналитических пробах образцов, изготовленных в лабораторных условиях в пяти повторностях (табл.45). Определение данных показателей проводили в соответствии с требованиями статей ГФ XIV.

Таблица 45 - Числовые показатели растительного сбора «Стелинол»

| Название образца | Содержание экстрактивных веществ не менее 20% | Зола об-щей не бо-лее 8% | Орг. при-месей не более 3% | Мин. приме-сей не более 2% | Измельченность: | |
|--|---|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | част., не прох. d=5 мм не более 12% | част., прох. d=0,5 мм не более 6% |
| «Стелинол» на основе льна Исток | 30 | 3,35 | 2,15 | 1,46 | 8,70 | 3,57 |
| «Стелинол» на основе льна Северный | 33 | 2,61 | 2,31 | 1,30 | 8,92 | 3,91 |
| «Стелинол» на основе льна Исток и Северный | 32 | 3,31 | 2,40 | 1,50 | 8,99 | 4,01 |

5.5. Изучение химического состава

5.5.1. Качественный анализ изучаемого сбора

Качественные реакции с водным извлечением сбора «Стелинол». Для подтверждения присутствия полисахаридов в сборе «Стелинол» [глава 2, раздел 2.1.1] использовали химическую реакцию (табл.46).

Таблица 46 - Результаты качественной реакции на полисахариды

| № | Реакция | Условия проведения | Аналитический эффект |
|---|--|--|--|
| 1 | Осаждение слизи этанолом из водного извлечения | 5 мл водного извлечения и 20 мл 95% спирта этилового, нагревание 1-2 минуты на водяной бане. | Образование хлопьев, а при стоянии - осадка. |

УФ- спектроскопия. В проект фармакопейной статьи предлагаем включить спектр поглощения раствора Б, полученного по стандартной методике определения фенилпропаноидов. УФ-спектр раствора Б в области от 200 до 550 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 330 нм и плечо при длине волны 290 нм (рис. 36).

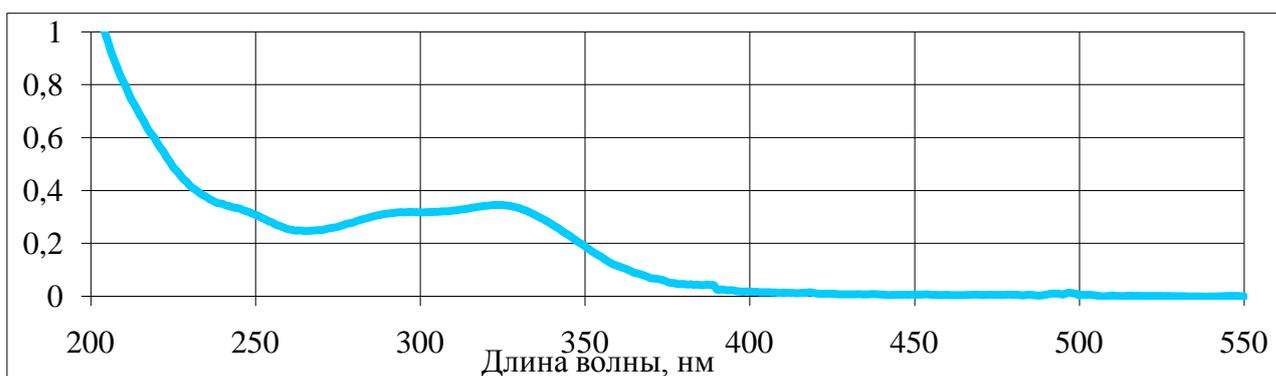


Рисунок 36 - УФ-спектр извлечения из растительного сбора «Стелинол»
(1:1250)

5.5.2. Количественный анализ изучаемого сбора

Проведенный химический анализ показал, что все образцы отличаются содержанием белков и жира. Содержание веществ в растительном сборе «Стелинол» представлено следующими показателями (табл.47).

Таблица 47 - Химический состав растительного сбора «Стелинол», %

| Образец | «Стелинол» на основе льна Исток | «Стелинол» на основе льна Северный | «Стелинол» на основе льна Исток и Северный |
|--------------|---------------------------------|------------------------------------|--|
| Белок | 22,56±0,05 | 20,77±0,04 | 21,91±0,05 |
| Фосфор | 0,56±0,02 | 0,57±0,03 | 0,50±0,03 |
| Клетчатка | 8,76±0,02 | 9,06±0,03 | 10,07±0,02 |
| Жирное масло | 46,21±0,05 | 48,22±0,04 | 46,18±0,05 |

Максимальным содержанием белка (22,56%) характеризовался образец на основе льна Исток и минимальным - образец на основе льна Северный (20,77%). Наибольшее количество клетчатки (10,07%) было выявлено у образца на основе льна Исток и Северный, минимальное – у образца на основе льна Исток (8,76%). По содержанию жира лидирует образец на основе льна Северный (48,22 %). Содержание общей золы наибольшее у образца на основе льна Северный (3,31 %), минимальное - у образца на основе льна Северный и Исток (2,22 %).

Количественное определение суммы фенилпропаноидов в растительном сборе
«Стелинол»

Для количественного определения суммы фенилпропаноидов в водном извлечении лекарственного растительного сбора «Стелинол» использовали метод прямой спектрофотометрии [49, 58, 69].

Около 20,0 г (точная навеска) растительного сбора помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 200 мл дистиллированной воды и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу нагревали на кипящей водяной бане при температуре 90°C в течение 15 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок, настаивали в течение 45 минут. Извлечение фильтровали через двойной слой марли (раствор А).

Измеряли оптическую плотность собственного поглощения извлечения из сбора. Раствор готовили по следующей методике: 2,0 мл помещали в мерную колбу на 25 мл, растворяли в 15 мл дистиллированной воды, объем доводили до метки той же водой. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду.

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:

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

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 параметры 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 расчетов содержания фенилпропаноидов в настое из растительного сбора «Стелинол» представлены в таблице 48.

Таблица 48 - 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 | $\pm 5,13$ |
| Настой (фильтр-пакет) | 5 | 4 | 0,19 | 0,00015 | 0,012247 | 95 | 2.776 | 0,0107 | $\pm 5,52$ |

Полученные в результате статистической обработки данные свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 5,52$ % при определении суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

С использованием модифицированной методики определения фенилпропаноидов были проанализированы образцы растительного сбора «Стелинол». Было установлено, что содержание фенилпропаноидов варьирует от 0,19 до 0,28 % (табл. 48).

Количественное определение суммы полисахаридов в растительном сборе «Стелинол»

Для количественного определения суммы полисахаридов в растительном сборе «Стелинол» использовали методику ГФ РФ XIV издания [36].

В результате проведенного количественного определения полисахаридов в растительном сборе «Стелинол» на основе льна сорта Северный установлено, что их содержание варьирует от 20,1 до 23,5%. Данные представлены на рисунке 37.

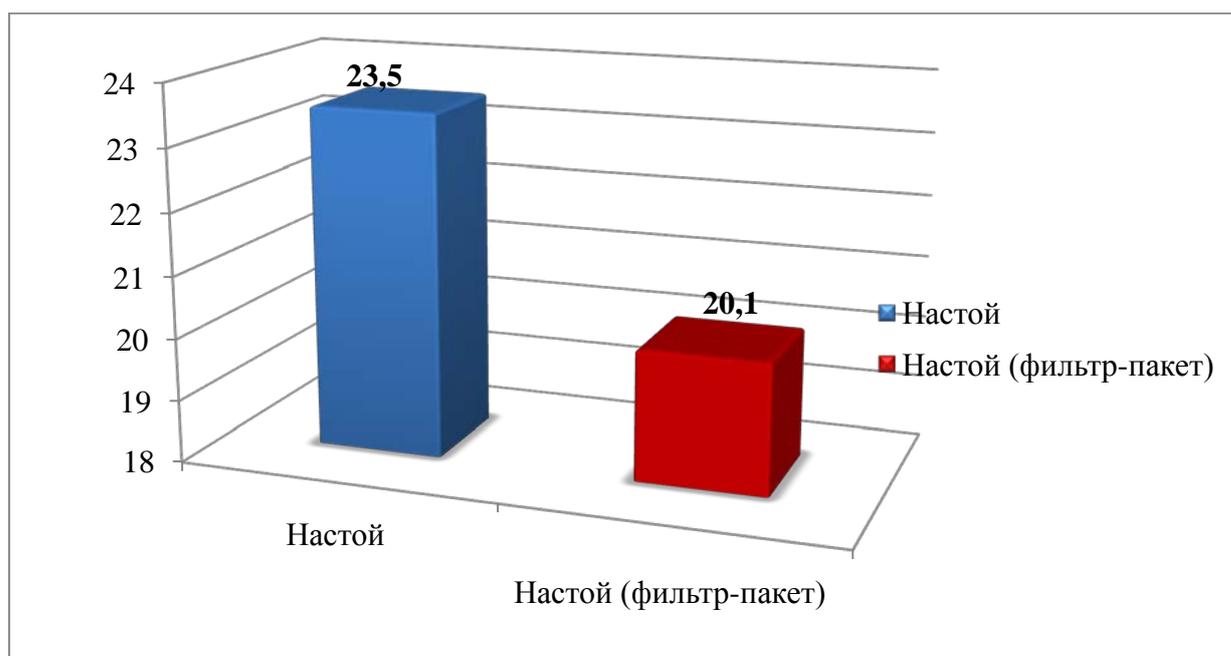


Рисунок 37 – Сумма полисахаридов в растительном сборе «Стелинол», %

Полученные данные о химическом составе растительного сбора «Стелинол» подтверждают, что все образцы содержат достаточно большое количество веществ. В связи с этим растительный сбор «Стелинол» является перспективным лекарственным растительным препаратом с антидиабетической активностью для дальнейшего изучения и применения в медицинской практике.

5.6. Определение острой токсичности настоя из сбора «Стелинол»

При создании новых препаратов растительного происхождения одним из обязательных критериев при проведении доклинических испытаний является оценка их безопасности, в связи с чем был проведен анализ острой токсичности настоя из сбора «Стелинол». Изучение острой токсичности было проведено на 20 белых беспородных половозрелых крысах мужского пола массой 200-220 г. Животных разделили на 2 группы по 10 крыс в каждой. Первой группе вводили однократно внутривентрикулярно настой в дозе 5 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, а второй группе – очищенную воду в аналогичном объеме. Животные в первый день находились под непрерывным наблюдением, общая продолжительность эксперимента составила 2 недели [5, 78, 87].

Летальных случаев в ходе исследования зарегистрировано не было. За время наблюдения изменений в поведенческой активности крыс контрольной и опытной групп зафиксировано не было. При анализе динамики массы тела грызунов обеих групп отличий не выявили. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемый образец настоя в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

5.7. Исследование анксиолитической активности настоя из сбора

«Стелинол»

Исследование анксиолитической активности проводилось в тесте «Открытое поле». На основе сбора «Стелинол» было получено водное извлечение в соотношении 1:10 путем экстракции горячей водой. Все исследования проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 200-220 г. Животные содержались в условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде. Каждая группа состояла из десяти животных. Исследуемые препараты вводили внутривентрикулярно через зонд в дозе 200 мкл/кг [41]. Контролем для исследования действия настоя препарата «Стелинол» служила вода очищенная. В качестве препарата сравнения нами был использован препарат феназепам в дозе 50 мкг/кг.

Таблица 49 - Исследование анксиолитической активности настоя из сбора

«Стелинол»

| Группы | Горизонтальная активность, с | Вертикальная активность, с | Исследовательская активность, с |
|-----------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Контроль (вода) | 35,8±9,6 | 13,7±4,3 | 18,0±3,5 |
| «Стелинол» | 27,5±9,8* | 7,2±4,5* | 16,7±3,4 |
| Феназепам | 20,8±5,8* | 6,8±3,5* | 11,6±2,5* |

Примечание: * - статистически значимое ($p < 0,05$) отличие показателей опытной группы относительно значений группы контроля;

Как видно из табл. 49, у животных получавших «Стелинол» отмечалось достоверное снижение горизонтальной двигательной активности на 23% по отношению к контролю, препарат сравнения феназепам способствовал более выраженному снижению горизонтальной двигательной активности (на 42%). Вертикальная активность в группе животных, получавших «Стелинол» уменьшалась на 47%, феназепам оказывал аналогичное действие на данный исследуемый параметр, вызывая уменьшение вертикальной активности на 50% по сравнению с водным контролем. Исследовательская активность у крыс, получавших «Стелинол», имела тенденцию к снижению. При этом препарат сравнения феназепам приводил к выраженному снижению исследовательской активности крыс по сравнению с контролем (на 36%). Это свидетельствует о наличии мягкого анксиолитического эффекта у водного извлечения, полученного на основе сбора «Стелинол», уступающего по действию препарату сравнения феназепам.

Поведение животных в условиях «открытого поля» определяет эмоциональное состояние, возникающее у крыс при попадании в новые условия. При этом горизонтальная, вертикальная двигательная активность и исследовательское поведение могут быть показателем общей возбудимости. В случае применения сбора «Стелинол» имеет место снижение всех показателей, свидетельствующее о снижении тревожности животных. Таким образом, можно заключить, что наличие мягкого анксиолитического эффекта препарата «Стелинола» будет способствовать профилактике стресса – одного из ведущих факторов многих болезней, в том числе, нарушения обмена веществ.

5.8. Оценка влияния настоя из сбора «Стелинол» на выживаемость и психоэмоциональный фон крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Выживаемость животных, начавших получать настой на основе сбора «Стелинол», как за 1 сутки до формирования экспериментальной патологии, так и с 1-х суток ее формирования, и продолжающих получать на протяжении

всего эксперимента, была выше таковой в группе нелеченого контроля (табл. 50).

Показатели выживаемости животных представлены в таблице 50.

Таблица 50 - Выживаемость крыс с экспериментальным сахарным диабетом

| Группы | Группа №1 (интактная) | Группа №2 (контроль) | Группа №3 («Стелинол») |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Количество выживших животных | 18 | 6 | 12 |
| % выживаемости | 100 | 33,3 | 66,7 |

В ходе эксперимента отмечена гибель животных во всех группах с экспериментальным сахарным диабетом, при этом в группе контроля летальность составила 66,7%, в то время как среди животных, получавших «Стелинол», погибло 33,3% крыс. Таким образом, выживаемость животных, получавших «Стелинол», была в 2 раза выше таковой в группе контроля.

В ходе проведения исследования выявлено повышение выживаемости животных, получавших настой сбора «Стелинол», по сравнению с группой контроля.

Результаты исследования двигательной и исследовательской активности с экспериментальным сахарным диабетом в тесте «Открытое поле» представлены в таблице 51.

Таблица 51 - Показатели двигательной активности крыс с экспериментальным сахарным диабетом в тесте «Открытое поле», ($M \pm m$)

| Длительность | 3 минуты | | | |
|-------------------------|--|--|---|----------|
| Показатели | Вертикальная активность (количество эпизодов обычных и пристеночных стоек) | Горизонтальная активность (количество пересеченных клеток) | Исследовательская активность (количество норковых реакций) | Грумминг |
| Группа №1(интактная) | 3,3±1,0 | 45,3±13,0 | 15,0±3,0 | 6,0±0,2 |

| | | | | |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| Группа №2 (контроль) | 2,8±0,6 | 13,7±3,3 [#] | 8,0±1,5 [#] | 8,0±0,3 [#] |
| Группа №3 («Стелинол») | 3,8±1,0 | 8,2±2,5 [#] | 16,7±1,7 [*] | 3,3±0,6 ^{*#} |
| Группа №4 (феназепам) | 0,8±0,2 ^{*#&} | 6,8±1,5 ^{*#} | 11,6±1,4 ^{#&} | 2,8±0,3 ^{*#} |

Примечание: * - статистически значимое ($P_k < 0,05$) отличие от группы контроля; # - статистически значимое ($P_n < 0,05$) отличие от интактной группы; & - статистически значимое ($P_c < 0,05$) различие между группами, получающими «Стелинол».

Исходя из представленных в таблице 51 данных, можно сделать вывод, что в группе лабораторных животных с экспериментальным сахарным диабетом, получавших настой сбора «Стелинол», достоверно по отношению к группе контроля и группе животных, получавших феназепам, повышалась исследовательская активность ($P_k < 0,05$, $P_c < 0,05$), при этом по сравнению с группой контроля показатели исследовательской активности были выше в 2 раза, а по сравнению с 4-й группой – в 1,44 раза. Также следует отметить, что показатели вертикальной активности в 3-й группе крыс были статистически значимо выше таковых в группе животных, получавших феназепам ($P_c < 0,05$).

Показатели тревожности (количество эпизодов груминга) в 3-й и 4-й группах животных статистически значимо снижались относительно группы контроля ($P_k < 0,05$), при этом не было зафиксировано статистически значимых различий между показателями животных, получавших «Стелинол» и феназепам ($P_c > 0,05$).

В ходе проведения теста «Открытое поле» выявлено статистически значимое по сравнению с группой контроля и группой животных, получавших феназепам, повышение показателей исследовательской активности при наличии косвенных доказательств уменьшения тревожности крыс при попадании в новые условия.

5.9. Оценка влияния настоя из сбора «Стелинол» на уровень гликемии крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Исследование проводилось с использованием перорального глюкозотолерантного теста и определения уровня глюкозы в крови животных [18, 126]. Полученные результаты представлены в таблице 52.

Таблица 52 - Динамика гликемии у самцов Вистар с экспериментальным сахарным диабетом на фоне введения сбора «Стелинол», ммоль/л ($M \pm m$)

| Группы | Группа № 1 (интактные) | Группа № 2 (контроль) | Группа № 3 («Стелинол» за 1 день до моделирования экспериментального сахарного диабета) | Группа № 4 («Стелинол» с 1- го дня моделирования экспериментально го сахарного диабета) |
|---------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| 1 день | 6,96±0,73 | 6,86±0,31 | 7,23±0,68 | 6,68±0,31 |
| 4 день | 6,63±0,84 | 16,58±1,49# | 12,81±0,62 &* | 13,47±1,52# |
| 8 день | 7,21±0,97 | 19,13±1,06# | 13,11±0,63 &* | 14,03±1,58# |
| 12 день | 7,05±0,64 | 18,94±1,20# | 12,58±0,57*& | 12,60±1,03# |
| 16 день | 6,75±0,68 | 13,64±1,31# | 10,21±0,77*& | 11,76±1,23# |
| 20 день | 5,9±0,50 | 12,65±0,65 | 7,50±0,90#* | 8,22±0,50 |
| 24 день | 6,43±0,30 | 9,8±0,78# | 7,42±1,37* | 6,95±0,95* |
| 28 день | 5,88±0,56 | 9,05±0,88 | 6,41±0,90#* | 5,28±1,35* |
| 32 день | 6,76±0,49 | 9,39±0,33# | 7,64±0,64* | 7,82±1,00* |
| 36 день | 4,8±0,37 | 9,6±0,69# | 4,83±0,27* | 5,84±0,54* |
| 40 день | 6,28±0,54 | 9,32±0,91# | 6,71±0,86* | 6,88±1,05* |
| 44 день | 5,93±0,71 | 9,28±1,09# | 6,26±1,01* | 6,84±1,12* |

Примечание: * - статистически значимое ($P_k < 0,05$) отличие от группы контроля; # - статистически значимое ($P_i < 0,05$) отличие от интактной группы; & - статистически значимое ($P_c < 0,05$) различие между группами, получающими «Стелинол».

В ходе проведенного исследования было выявлено статистически значимое ($P_k < 0,05$) уменьшение уровня глюкозы по сравнению с группой контроля во всех группах животных, получавших «Стелинол» (табл. 52), в третьей группе уровень глюкозы по сравнению с контрольной группой уменьшался с 8-го дня эксперимента, а в 4-й – с 12-го дня. Начиная с 32-го дня, уровень глюкозы во всех группах, получавших «Стелинол», не имеет статистически значимых различий с показателями интактной группы животных (табл. 52).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Обоснован состав и проведена оптимизация растительного сбора «Стелинол». Установлены морфолого-анатомические признаки 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 желёзок округлой формы.
2. Установлены критерии подлинности и показатели качества сбора «Стелинол». Исследована проявляемость диагностически значимых признаков компонентов в сборе: для стевии листьев 66,7 %, для льна посевного семян 54,5 %; рассчитаны индексы участия: для стевии листьев 36,1 %, для льна посевного семян 63,9 %.
3. Предложена и обоснована методика количественного определения суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту. Содержание суммы фенилпропаноидов в сборе «Стелинол» варьирует от $0,19 \pm 0,02\%$ до $0,28 \pm 0,02\%$.
4. Определены параметры УФ-спектра водного извлечения из растительного сбора «Стелинол», а именно: максимум при $\lambda = 330 \pm 2$ нм и «плечо» при $\lambda = 290 \pm 2$ нм.
5. Проведенные фармакологические исследования показали, что настой из сбора «Стелинол» характеризуется наличием гипогликемической активности и анксиолитического эффекта.
6. Исследуемый образец водного извлечения сбора «Стелинол» относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).
7. Разработан проект фармакопейной статьи на сбор «Стелинол»

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, установлен 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 совершенствовании 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.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Александров, Ю. И. Погрешность и неопределенность результата химического анализа / Ю. И. Александров, В. И. Беляков // Журнал аналитической химии. – 2002. – Т. 57, № 2. – С. 118–129.
2. Антиоксидантная активность растительных масел с разным соотношением омега-6/омега-3 жирных кислот / Д. А. Гусева, Н. Н. Прозоровская, А. В. Широнин, М. А. Санжаков, Н. М. Евтеева, О. Т. Касаикина, И. Ф. Русина // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56 (3). – С. 342–350 с.
3. Арзамасцев, А. П. Валидация аналитических методов / А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.
4. Арзамасцев, А.П. Государственные стандартные образцы лекарственных веществ (проект общей фармакопейной статьи)/А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, Н.П. Садчикова// Ведомости науч. центра экспертизы и гос. контроля лек. средств Минздрава России. – 2000. - №3. – С.24-26.
5. Аткинс, Р. Жирные кислоты / Р. Аткинс // Биодобавки. Природная альтернатива лекарствам. – М., 2004. – С. 388–422.
6. Багирова, В. Л. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / В. Л. Багирова, В. А. Северцева. – СПб. : СпецЛит, 2001. – 223 с.
7. Барковский, В.Ф. Дифференциальный спектрофотометрический анализ / В.Ф. Барковский, В.И. Ганопольский. – М.: Химия, 1969. – 168с.
8. Беликов, В.В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидных препаратов / В.В. Беликов, Т.В. Точкова, Н.Г. Колесник // Состояние и перспективы создания новых лекарственных средств и фитохимических препаратов: тез. докл. – Харьков, 1990. – С. 146 – 147.
9. Белопухов, С. Л. Микроэлементный состав льняного масла / С. Л. Белопухов, И. И. Дмитриевская, А. В. Жевнеров, А. Ю. Волков // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 7. – С. 54–56.

10. Беляков, К. В. Методологические подходы к определению биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье спектрофотометрическим методом / К. В. Беляков. – М., 2004. – 325 с.
11. Биохимическое разнообразие льна по жирнокислотному составу семян в генетической коллекции ВИР и влияние условий среды на его проявление / Е. А. Пороховинова, Т. В. Шеленга, Л. А. Косых, А. А. Санин, А. В. Казарина, С. Н. Кутузова, А. В. Павлов, Н. Б. Брач // Генетические основы эволюции экосистем. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 13–27.
12. Бондарев, Н. И. Влияние интенсивности света и фотопериода на накопление стевиол-гликозидов в культурах *Stevia rebaudiana* in vitro / Н. И. Бондарев, О. В. Решетняк, А. М. Носов // Новые нетрадиционные растения и перспективы их использования : материалы VI Междунар. симпозиума / Всероссийский научно - исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур. – М., 2005. – С. 234–236.
13. Бондарев, Н.И., Морфология и ультраструктура трихомов интактных и in vitro растений *Stevia reubadiana* Bertoni в связи с образованием и накоплением стевиол-гликозидов / Н.И. Бондарев, М.А. Суханова, Г.А. Семенова, О.В. Горяева, С.Е. Андреева, А.М. Носов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2010. №1. С. 15-20.
14. Бубенчикова, В.Н. Изучение флавоноидов травы девясила иволистно / В.Н. Бубенчикова, А.В. Азарова // Традиционная медицина / научно-практич.журнал № 5. – 2012. – С.183-185.
15. Бубенчикова, В.Н. Разработка методов анализа растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.Н. Бубенчикова, Т.В. Точкова // Состояние и перспективы развития фармации в Сибири и на Дальнем Востоке: Тез. докл. Научно- практической конференции, посвященной 50- летию фармацевтического факультета 1991 г. – Томск, 1991. – С. 117-118.
16. Верзилина, Н. Д. Биологические особенности роста и развития стевии в условиях умеренного климата / Н. Д. Верзилина, Т. П. Жужжалова,

- М. М. Дубянский // Итоги научно-исследовательских работ агрономического факультета : сб. науч. трудов, посвященный 90-летию со дня рождения агрономического факультета. – Воронеж : ВГАУ, 2004. – С. 26–33.
17. Верзилина, Н. Д. Стевия (*Stevia rebaudiana Bertoni*) в Центральном Черноземье (агробиологические и физиолого-биохимические аспекты культуры) : автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук / Верзилина Н. Д. – Воронеж, 2005. – 44 с.
18. Водопьянова, О.А. Оценка влияния цитофлавина и кардиоксипина на эмоциональный фон крыс с дислипидемией / О.А. Водопьянова, И.Я. Моисеева, О.П. Родина, И.Н. Кустикова, Н.В. Антропова // Журнал Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т.114, №7. – С.53-55
19. Гаврилин, М. В. Валидация аналитических методик (методические указания для аспирантов и студентов) / М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко. – Пятигорск, 2007. – 36 с.
20. Гаврисюк, В. К. Применение Омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в медицине / В. К. Гаврисюк // Укр. пульмон. журн. – 2001. – № 3. – С. 5–10.
21. Галынкин, В. А. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии с основами асептики и биотехнологии / В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, Т. С. Потехина ; под ред. Н. А. Заикиной. – Курск : КГМУ, 2002. – 236 с.
22. Гиляревский, С. Р. Эффективность применения омега-3 полиненасыщенных жирных кислот для первичной и вторичной профилактики сердечнососудистых заболеваний. Современное состояние проблемы / С. Р. Гиляревский // Фарматека. – 2010. – № 20 (213). – С. 11–19.
23. Горбатенко, Л. Е. Стевия – ценное пищевое и лекарственное растение / Л. Е. Горбатенко, О. О. Дзюба // Новые и нетрадиционные растения и

- перспективы их использования : материалы V Междунар. симпозиума. – М., 2003. – Т. 3. – С. 317–319.
24. Гордеева-Морозова, М. А. Статистика в фармацевтическом анализе и биомедицинских исследованиях / М. А. Гордеева-Морозова, В. И. Иванова-Радкевич, Н. А. Паршина. – М. : РУДН, 2010. – 30 с.
 25. ГОСТ 10857–64. Семена масличные метод определения масличности. – М. : Стандартинформ, 2010. – 6 с.
 26. ГОСТ 12042–80. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян. Семена сельскохозяйственных культур. Методы анализа. – М. : Стандартинформ, 2011. – 4 с.
 27. ГОСТ 30418–96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. – М., 1996. – С. 112–115.
 28. ГОСТ 31665–2012. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. – М., 2012.
 29. ГОСТ Р 51483–99. Масла растительные и животные. Определение методом газожидкостной хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот их суммы. – М. : Госстандарт, 1999. – 7 с.
 30. ГОСТ Р ИСО 3961–2010. Введ. 01.01.2012 Жиры и масла животные и растительные. Определение йодного числа. Национальный стандарт российской федерации. – М. : Стандартинформ, 2012. – 28 с.
 31. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12 изд. – М. : Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – Ч. 1. – 704 с.
 32. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.1 / М.- 2015. – 1470 с.
 33. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.2 / М.- 2015. - 1004 с.
 34. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.3 / М.- 2015. - 1294 с.

35. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.2 / М.- 2018. – 3262 с.
36. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.4 / М.- 2018. – 7019 с.
37. Гусева, Д. А. Природный источник ω -3- кислот- льняное масло: его особенности и характер метаболических превращений в организме / Д. А. Гусева // Вопросы питания. – 2010. – № 1. – С. 13–22.
38. Гусева, Д. А. Сравнительный анализ льняного масла трех вариантов холодного отжима / Д. А. Гусева, Н. Н. Прозоровская, М. А. Санжаков, А. В. Широнин // Масложировая промышленность. – 2011. – № 3. – С. 30–32.
39. Диетические продукты с подсластителями стевии / А. Н. Пономарев, А. А. Мерзликина, Т. П. Жужжалова и др. // Молочная промышленность. – 2007. – № 1. – С. 82–83.
40. Дубровкин, И.М. Производная спектрофотометрия / И.М. Дубровкин, В.Г. Беликов. – Ростов: Изд-во Ростовск. ун-та, 1988 - С. 16 – 18.
41. Зайцева, Е.Н. Препараты на основе травы зверобоя как средства коррекции экскреторной функции почек / Е.Н. Зайцева, В.А. Куркин, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2011. - Т. 13. - № 1-8. - С. 1999-2002.
42. Живетин, В. В. Лен и его комплексное использование / В. В. Живетин, Л. Н. Гинзбург, О. М. Ольшанская. – М. : Информ-Знание, 2002. – 400 с.
43. Живетин, В. В. Масличный лен / В. В. Живетин, Л. Н. Гинзбург. – М., 2000. – 94 с.
44. Живеткин, В. В. Масличный лен и его комплексное развитие / В. В. Живеткин, Л. Н. Гинзбург. – М. : ЦНИИЛКА, 2000. – С. 3–38.
45. Жужжалова, Т. П. Изменение химического состава стевии при возделывании в ЦЧР / Т. П. Жужжалова, Г. К. Подпоринова, М. В. Зимин // Интродукция нетрадиционных и редких растений : матер. VI

- Международ. науч.-практ. конф. (24–27 мая 2006 г.). – Белгород, 2006. – С. 41–43.
46. Жужжалова, Т. П. Особенности интродукции стевии в условиях ЦЧР / Т. П. Жужжалова, Н. Д. Верзилина // Проблемы рационального использования растительных ресурсов / Горс. гос. аграр. университет. – Владикавказ, 2006. – С. 285–286.
47. Зеленцов, Е. В. Количественная и качественная оценка слизей семян масличных сортов *Linum Usitatissimum* L. / С. В. Зеленцов, Е. В. Мошненко // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2012. – № 2. – С. 151–152.
48. Зубцов, В. А. Льняное семя, его состав и свойства / В. А. Зубцов, Л. Л. Осипова, Т. И. Лебедева // Российский химический журнал. – 2002. – Т. 46, № 2. – С. 14–16
49. Иванов, В.В. Флавоноидный состав надземной части рейнотрии сахалинской (*Reynoutria sachalinensis* (F.Schmidt) Nakai)/ В.В. Иванов, М.И. Кодониди, О.Н. Денисенко// Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2011. – Вып. 66. – С. 102 - 103.
50. Ипатова, О. М. Биологическая активность льняного масла как источника омега-3-альфа-линоленовой кислоты / О. М. Ипатова, Н. Н. Прозоровская, В. С. Баранова, Д. А. Гусева // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 1. – С. 25–43.
51. Казаков, Г. Лен масличный – культура ценная и неприхотливая / Г. Казаков, А. Санин, Л. Косых // Агро-Информ. – 2002. – № 12. – С. 21–23.
52. Карпов, Ю. А. Методы пробоотбора и пробоподготовки / Ю. А. Карпов, А. П. Савостин. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2003. – 243 с.

53. Киреева, М. С. Биохимические свойства семян льна различных сортов и линий / М. С. Киреева, Э. Э. Егги // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2013. – № 33. – С. 18–23 .
54. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: пер. с англ; в 2т. / Ю. Кирхнер – М.: Химия, 1981. – Т.1. – 616с.; Т.2. – 535 с.
55. Контроль содержания стевиозида в растительном сырье методом ВЭЖХ и ТСХ / С. А. Кедик, С. В. Федоров, Н. А. Януль, Л. В. Прохорова, Е. В. Смирнова, А. В. Панов // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 10. – С. 19–22.
56. Коренман, Я. И. Оптимизация параметров экстрагирования физиологически ценных компонентов *Stevia rebaudiana* В. / Я. М. Коренман, Е. И. Мельникова, С. И. Нифталиев, С. Е. Боева // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 4.
57. Корулькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина, Г. А. Толстиков. – Новосибирск : Гео, 2007. – 232 с.
58. Косман, В.М. Количественное экстракционно-спектрофото-метрическое определение суммарного содержания фенилпропаноидов в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В.М. Косман, И. Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. – 2001. – Вып. 4. – С. 123-129.
59. Кривенко, А. А. Морфологические особенности стевии *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley в условиях выщелоченного чернозема Ставропольского края / А. А. Кривенко, В. И. Жабина, И. А. Донец, Е. А. Дмитрова // Сборник научных трудов 69-й научно-практической конференции / Ставропольский государственный аграрный университет. – Ставрополь : Агрус, 2006. – С. 88–90.
60. Криштанова, Н. А. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств /

- Н. А. Криштанова, М. Ю. Сафонова, В. У. Болотова // Вестник Воронежского государственного университета. Сер.: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 1. – С. 212–221.
61. Кудашкина, Н. В. Фитохимический анализ / Н. В. Кудашкина, С. Р. Хасанова, С. А. Мещерякова. – Уфа : Изд-во ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВа, 2007. – 281 с.
62. Кузьмичева, Н. А., Морфолого-анатомические особенности стевии ребоди в комнатной культуре / Н. А. Кузьмичева, Д. И. Шевчук // Вестник фармации. 2017. №2 (76). С. 37-42.
63. 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
64. 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.
65. 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
66. 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
67. 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
68. 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
69. Куркин, В.А. Проблемы стандартизации растительного сырья и препаратов, содержащих фенилпропаноиды / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // Фармация. – 2009. - №1. – С. 51-54.
70. Куркина, А. В. Флавоноиды фармакопейных растений : монография / А. В. Куркина. – Самара : Офорт, ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
71. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Куркина Анна Владимировна. – Самара, 2013. – 48 с.
72. Леонтьев, В. Н. Генетический полиморфизм жирнокислотного состава липидов семян масличных культур / В. Н. Леонтьев, И. В. Лайковская, И. Л. Акулович, В. В. Титок // Труды Белорусского государственного технологического университета. Сер. IV: Химия и технология органических веществ. – 2004. – Вып. XII. – 243 с.

73. Лисицин, В. Н. Стевия - источник здоровья и долголетия нации / В. Н. Лисицин, И. П. Ковалев // Пищевая промышленность. – 2000.– № 5. – С. 38–39.
74. Лобанова, А. А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья / А. А. Лобанова, В. В. Будаева, Г. В. Сакович // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.
75. Лурье, А.А. Хроматографические материалы (справочник) / А.А. Лурье. – М.: Химия, 1978. - 434 с.
76. Ляпунов, А. М. Заменители сахара. Стевия / А. М. Ляпунов // Парафармацевтика. – 2004. – № 4-5 (20).
77. Ляховкин, А. Г. Стевия - медовая трава. Растение лекарственное и пищевое в вашем доме / А. Г. Ляховкин, А. П. Николаев, В. Б. Учитель. – СПб. : ЗАО «ВЕСЬ», 1999. – 96 с.
78. Марахова, А. И. Изучение методов управления экстракцией из лекарственного растительного сырья и разработка методик стандартизации настоев / А. И. Марахова, Н. Н. Федоровский // Приложение к журналу «Вестник Российской академии медицинских наук». – 2008. – № 6. – С. 267–268.
79. Мельников, В. Л. Основы микробиологических исследований в медицинской практике : учеб. пособие / В. Л. Мельников, Е. Ф. Семенова, Н. Н. Митрофанова, Е. В. Преснякова ; под ред. д.м.н., профессора А. Н. Митрошина. – Пенза : Инф.-изд. центр ПензГУ, 2009. – 148 с.
80. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» / ООО «Люмэкс- маркетинг». – СПб., 2014. – (Корма, комбикорма и сырье для их производства). – 49 с.
81. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе SPIRULINA PLATENSIS (NORDS.)

- GEILT. / С.В. Первушкин [и др.] // Раст. ресурсы. - 2002. – Т. 38, №1 – С. 112-119.
82. Методические указания по определению биохимических показателей качества масла и семян масличных культур / ВАСХНИЛ, ВНИИ масличных культур. – Краснодар, 1986. – 88 с.
83. Микробиологические исследования семян и плодов лекарственных культур / Е. Ф. Семенова, В. Л. Мельников, Е. В. Преснякова, Н. Г. Жукова, Г. А. Осадча, Т. М. Фадеева, И. А. Вилкова, Н. А. Морозкина, Н. Н. Митрофанова, Н. А. Правосудова, Е. Е. Митина // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2008. – № 2. – С. 26–37.
84. Натуральный подсластитель из стевии / А. Н. Пономарев, Г. К. Подпоринова, Н. Д. Верзилина и др. // Молочная промышленность. – 2005. – № 1. – С. 42.
85. Нечаев, А. П. Пищевая химия / А. Д. Нечаев, С. Е. Траубенберг, А. А. Кочеткова ; под ред. А. П. Нечаева. – СПб. : ГИОРД, 2003. – 640 с.
86. Никандрова, М. Л. Новые сорта льна-долгунца и их характеристика / М. Л. Никандрова, Н. В. Никитина, Т. А. Рысева // Современные проблемы на Северо-Западе РФ. – Псков, 2000. – С. 15–16.
87. Озерова, В. М. Стевия. Медовая трава против диабета / В. М. Озерова. – СПб. : ВЕСЬ, 2005. – 64 с.
88. Оленников, Д. И. Методика количественного определения суммарного содержания полисахаридов в семенах льна / Д. И. Оленников, Л. М. Тахаева // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 85–90.
89. Оленников, Д. Н. Исследование процесса экстракции полисахаридов семян льна (*Linum usitatissimum L.*) / Д. Н. Оленников, Л. М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 79–83.
90. Основы фармакотерапии и клинической фармакологии / под ред. М. Д. Гаевого, В. И. Петрова. – изд. 3-е, испр. и доп. – Ростов-н/Д : Изд. центр МарТ, 2010. – 800 с.

91. Остапко, И. Н. Интродукция *Stevia rebaudiana* Bertoni Hemsley в Донбассе / И. Н. Остапко, З. С. Горлачева // Проблемы рационального использования растительных ресурсов / Горс. гос. аграр. универс. – Владикавказ, 2006. – С. 109–111.
92. Пащенко, Л. П. Функциональные свойства семени масличного льна / Л. П. Пащенко, Л. А. Коваль, В. Л. Пащенко // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 10. – С. 98–99.
93. Подпоринова, Г. К. Особенности аминокислотного состава вегетативных органов стевии / Г. К. Подпоринова, Т. П. Жужжалова, Н. Д. Верзилина, К. К. Полянский // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2007. – № 3. – С. 91–92.
94. Подпоринова, Г. К. Прогрессивные способы извлечения дитерпеновых гликозидов из стевии / Г. К. Подпоринова, К. К. Полянский, Н. Д. Верзилина // Пищевая промышленность. – 2004. – № 12. – С. 61.
95. Подпоринова, Г. К. Химический состав растительного сырья стевии / Г. К. Подпоринова, Н. Д. Верзилина, К. К. Полянский // Известия вузов. Пищевая технология. – 2005. – № 4. – С. 74–75.
96. Полянский, К. К. Стевия в продуктах целебно-профилактического назначения / К. К. Полянский, Г. К. Подпоринова, Д. М. Богомоллов // Пищевая промышленность. – 2005. – № 5. – С. 58.
97. Потанина, О. Г. Количественное определение компонентов сборов микроскопическим методом / О. Г. Потанина, И. А. Самылина // Фармация. – 2003. – № 6. – С. 14–16.
98. Потанина, О. Г. Оценка доброкачественности лекарственного растительного сырья с учетом диагностически значимых признаков / О. Г. Потанина, И. А. Самылина // Фармация. – 2003. – № 4. – С. 12–14.
99. Пругло, Г. Ф. Оптические методы анализа : учеб.-метод. пособие / Г. Ф. Пругло, А. А. Комиссаренков, В. А. Фёдоров. – СПб. : СПбГТУРП, 2010. – 52 с.

100. Рассохина Л. М. Церебропротекторное, ноотропное и антидепрессивное действие отечественных производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты при экспериментальном сахарном диабете: автореферат дис. ... доктора медицинских наук: 14.03.06 / Рассохина Любовь Михайловна. - Челябинск, 2014. - 46 с.
101. Рудаков, О. Б. Контроль стевиозида в сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / О. Б. Рудаков, Н. Д. Верзилина, С. В. Федоров, К. К. Полянский // Молочная промышленность. – 2004. – № 7. – С. 54–55.
102. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
103. Рушковский, С.В. Методика химических исследований при селекции масличных растений / С.В. Рушковский. – М.: Пищепромиздат, 1947. – 99 с.
104. Самылина, И. А. Фармакогнозия. Атлас / И. А. Самылина, О. Г. Аносова. – М. : Изд. группа ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т. 1. – 187 с.
105. Сапонины и их определение в корневищах Аралии маньчжурской в условиях Белгородской области / Д. И. Писарев, Н. А. Мартынова, Н. Н. Нетребенко и др. // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 197 – 198.
106. Сборник методических рекомендаций по стандартизации лекарственных средств. – М. : Пеликан, 2006. – С. 293–309.
107. 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
108. Семенова, Е. Ф. К вопросу комплексного изучения растительного сырья стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*) / Е. Ф. Семенова, А. С. Веденева //

- Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. / под ред. М. В. Гаврилина. – Пятигорск : Пятигорская ГФА, 2010. – Вып. 65. – С. 107–109.
109. Семенова, Е. Ф. Скрининг антимикробной активности жидких экстрактов стевии Ребо (*Stevia rebaudiana Bertoni*) / Е. Ф. Семенова, А. С. Веденева, Т. П. Жужжалова // Вестник Воронежского государственного университета. Сер.: Химия. Биология. Фармация. – 2010. – № 1. – С. 121–126.
110. Семенова, Е. Ф. Фармакогностическое исследование стевии *Stevia rebaudiana Bertoni* / Е. Ф. Семенова, Е. В. Преснякова // Сборник научных трудов к 90-летию ВНИИСС. – Воронеж – Рамонь, 2012. – С. 185–193
111. Семенова, Е. Ф. Фармакологическая и пищевая ценность семян льна культурного *Linum usitatissimum* L. / Е. Ф. Семенова, Т. М. Фадеева, Е. В. Преснякова // Человек и его здоровье. – 2013. – № 2. – С. 117–124
112. 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
113. 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.
114. Семенова, Н. А. Стевия – растение XXI века / Н. А. Семенова. – СПб. : ДИЛЯ, 2005. – 160 с.

115. Сикорская, С. Б. Биолого-морфологические особенности стевии (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) при интродукции в условиях ЦЧЗ России : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.05 / Сикорская С. Б. – Курск, 2004. – 20 с.
116. Ситничук, И. Ю. Разработка эффективного способа выделения суммы дитерпеновых гликозидов из *Stevia rebaudiana* Bertoni / И. Ю. Ситничук, Е. Н. Стрижева, А. А. Ефремов, Г. Г. Первышина // Химия растительного сырья. – 2002. – № 3. – С. 73–75.
117. Сливкин, А. И. Контроль качества экстенпоральных лекарственных форм / А. И. Сливкин. Н. П. Садчикова. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2003. – 264 с.
118. Сливкин, А. И. Физико-химические и биологические методы оценки качества лекарственных средств / А. И. Сливкин, В. Ф. Селеменов, Е. А. Суховерхова ; под ред. В. Г. Артюхова, А. И. Сливкина. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 1999. – 368 с.
119. Содержание сладких гликозидов в листьях стевии на разных фонах минерального удобрения в условиях выщелоченного чернозема Центрального Предкавказья / В. И. Трухачев, А. А.Кривенко, Г. П. Стародубцева, В. И. Жабина, С. И. Любая // Современные направления теоретических и прикладных исследований : Междунар науч.-практ. конф. (г. Одесса, 15-25 марта 2007 г.). – Одесса, 2007. – С. 14–17.
120. Сорокина А.А. Методы фармакогностического анализа / А.А. Сорокина//Фармация. – 2002. – Т.51, №5. – С. 29-30.
121. Сорокина, А. А. Сравнительный анализ качества настоев из растительного сырья, резанного и фасованного в фильтр-пакеты / А. А. Сорокина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения : матер. 4-го Междунар. съезда. – Великий Новгород, 2000. – С. 320–322.
122. Состав жирных кислот семян льна / А. В. Поляков, О. Ф. Чикризова, Л. В. Никитина и др. // Интродукция нетрадиционных и редких

- сельскохозяйственных растений : матер. III Междунар. науч.-практ. конф. (14–19 мая 2000 г.). – Пенза, 2000. – С. 10–11.
123. Технический регламент Таможенного союза «Технический регламент на масложировую продукцию» (ТР ТС) : принят решением комиссии Таможенного союза № 883 от 9 октября 2011 г. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902320571>
124. Тикунова, И. В. Справочное руководство по аналитической химии и физико-химическим методам анализа : учеб. пособие / И. В. Тикунова, Н. В. Дробницкая, А. И. Артеменко. – М. : Высшая школа, 2009. – 413 с.
125. Толкачев, О. Н. Биологически активные вещества льна: использование в медицине и питании (обзор) / О. Н. Толкачев, А. А. Жученко // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – № 7. – С. 34–36.
126. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учеб. пособие для послевуз. проф. образования врачей / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е издание, переработанное и дополненное. – М.: Медицина, 2005. – С. 829.
127. Хасанова, С. Р. Исследования по разработке метода стандартизации растительного сбора / С. Р. Хасанова, А. П. Потанина, Н. В. Кудашкина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. – Пятигорск, 2010. – Вып. 65. – С. 418–419.
128. Хроматографический анализ жирнокислотного состава липидов – метод идентификации биологических объектов / В. Н. Леонтьев[и др. // Труды Белорусского государственного технологического университета. Сер. IV, Химия и технология орган. веществ. – 2005. – Вып. XIII. – С. 100–101.
129. Шадыро, О. И. Окислительная устойчивость льняного масла при хранении / О. И. Шадыро, А. А. Сосновская, И. П. Едимечева, Н. И. Островская // Масложировая промышленность. – 2010. – № 5. – С. 26–28.
130. Шаповалова, Е. Н. Хроматографические методы анализа / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов. – М. : МГУ, 2010. – 109 с.

131. Шафферт, Е. Морфо-анатомическая характеристика стевии [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.] в связи с интродукцией на Южном берегу Крыма / Е. Шафферт, А. Чеботарь, В. Новикова. - Цитолого-эмбриологические исследования высших растений: Тр. Никитского бот. сада. Т. 113. Ялта, 1992. С. 25—37.
132. Щербаков, Н. А. Стевия / Н. А. Щербаков, П. Р. Покхрел, И. Ю. Щербакова, И. Д. Щербаков. – Славянск-на-Кубани : АЛЕВ, 2010. – 32 с.
133. Abou-Arab, A. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertoni plant / A. Abou-Arab and M. F. Abu-Salem // African Journal of Food Science. – 2010. – Vol. 4. – P. 269–281.
134. Alekseeva, R. I. Effects of a diet including linseed oil on clinical and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus / R. I. Alekseeva et al. // VoprPitan. – 2000. – Vol. 69 (6). – P. 32–50.
135. Amzad-Hossain, M. Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves / M. Amzad-Hossain, A. Siddique, S. Mizanur-Rahman and M. Amzad Hossain // Asian Journal of Traditional Medicines. – 2010. – Vol. 5. – P. 56–61.
136. Antibacterial and antifungal activities of *Linum usitatissimum* (Flax seeds) / B. Raja-Narender, S. Tejaswini, M. Sarika, N. Karuna, R. Shirisha and S. Priyanka // Int. J. Pharma. Educ. Res. – 2016. – Vol. 3 (2). – P. 4–8.
137. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats / R. S. Kujur, V. Singh, H. N. Yadava, K. K. Singh, S. Kumari & B. K. Roy // Pharmacognosy Research. – 2010. – Vol. 2 (4). – P. 258–263.
138. Basavaraj, M. Potential Benefits of Flaxseed in Health and Disease – A Perspective / M. Basavaraj // Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS). – 2009. – Vol. 67–72.

139. Bekal, M. Preliminary phytochemical screening of flax seed and assessment / M. Bekal, S. Kumari and K. P. Sharmila // *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. – 2015. – Vol. 4, iss. 08. – P. 952–958.
140. Bioavailability of alpha-linolenic acid in subjects after ingestion of three different forms of flaxseed / J. A. Austria, M. N. Richard, M. N. Chahine, A. L. Edel, L. J. Malcolmson, C. M. Dupasquier et al. // *Journal of the American College of Nutrition*. – 2008. – Vol. 27. – P. 214–221.
141. Bloedon, L. T. Flaxseed and cardiovascular risk / L. T. Bloedon and P. O. Szapary // *Nutr. Rev.* – 2004. – Vol. 62. – P. 18–27.
142. Brandle, J. E. Steviol glycoside biosynthesis / J. E. Brandle, P. G. Telmer // *Phytochemistry*. – 2007. – № 68. – P. 1855–1863.
143. Caligiuri, S. P. Flaxseed consumption reduces blood pressure in patients with hypertension by altering circulating oxylipins via an α -linolenic acid-induced inhibition of soluble epoxide hydrolase / S. P. Caligiuri, H. M. Aukema, A. Ravandi, R. Guzman, E. Dibrov, G. N. Pierce // *Hypertension*. – 2014. – Vol. 64. – P. 53–59.
144. Carakostas, M. C. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages / M. C. Carakostas, L. L. Curry, A. C. Boileau, D. J. Brusick // *Food and Chemical Toxicology*. – 2008. – Vol. 46. – P. S1–S10.
145. Characteristics of high alpha-linolenic acid accumulation in seed oils / S. Rao, M. Abdel-Reheem, R. Bhella, C. McCracken, D. Hildebrand // *Lipids*. – 2008. – Vol. 43. – P. 749–755.
146. Chatsudthipong, V. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness / V. Chatsudthipong and C. Muanprasat // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2009. – Vol. 121. – P. 41–54.
147. Daun, J. Structure, composition, and variety development of flaxseed. dans: *Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition* / J. Daun, V. Barthet, T. Chornick, S. Duguid ; eds: Thompson L. U. and Cunnane, S. C. – Illinois, USA, AOCS Press, Champaign, 2003. – P. 1–40.

148. Diederichsen, A. Seed colour, seed weight and seed oil content in flax (*Linum usitatissimum* L.) accessions held by Plant Gene Resources of Canada / A. Diederichsen, J. P. Raney // Plant Breed. – 2006. – Vol. 125. – P. 372–377.
149. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects / W. Zhang, X. Wang, Y. Liu, H. Tian, B. Flickinger, M.W. Empie et al. // Br J Nutr. – 2008. – Vol. 99. – P. 1301–1309.
150. Dugani, A. Effects of the oil and mucilage from flaxseed (*linum usitatissimum*) on gastric lesions induced by ethanol in rats / A. Dugani, A. Auzzi, F. Naas, S. Megwez // Libyan Journal of Med. – 2008. – Vol. 3. – P. 166–169.
151. El-Beltagi, H. S. Evaluation of fatty acids profile and the content of some secondary metabolites in seeds of different flax cultivars (*Linum usitatissimum* L.) / H. S. El-Beltagi, Z. A. Salama, D. M. El-Hariri // General Applied Plant Physiology. – 2007. – Vol. 33(3-4). – P. 187–202.
152. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications / edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. – Boca Raton ; London ; New York : CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. – 1197 p.
153. Flaxseed and Human Health: Reviewing Benefits and Adverse Effects / J. C. Cardoso Carraro, M. De Souza Dantas, A. C. Rocha Espescht, H. Duarte Martino, S. H. Rocha Ribeiro // Food Rev Int. – 2012. – Vol. 28. – P. 203–230.
154. Flaxseed as a source of functional Ingredients / M. Rubilar, C. Gutierrez, M. Verdugo, C. Shene, J. Sineiro // J Soil Sci Plant Nutr. – 2010. – Vol. 10. – P. 373–377.
155. Geuns, J. M. C. Molecules of interest stevioside / J. M. C. Geuns // Phytochemistry. – 2003. – P. 913–921.
156. Ghanta, S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener / S.

- Ghanta, A. Banerjee, A. Poddar and S. Chattopadhyay // J Agric Food Chem. – 2007. – Vol. 55. – P. 10962–10967.
157. Ghosh, S. Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens / S. Ghosh, E. Subudhi and S. Nayak // International Journal of Integrative Biology. – 2008. – Vol. 2. – P. 27–31.
158. Gupta, E. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A Review / E. Gupta, S. Purwar, S. Sundaram, & G. K. Rai // Journal of Medicinal Plants Research. – 2013. – Vol. 7 (46). – P. 3343–3353.
159. Halligudi, N. Pharmacological properties of flax seeds: a Review / N. Halligudi // Hygeia. J. D. Med. – 2012. – Vol. 4 (2). – P. 70–77.
160. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside / J. L. Adolphe, S. J. Whiting, B. H. Juurlink, L. U. Thorpe, J. Alcorn // British Journal of Nutrition. – 2010. – Vol. 103. – P. 929–938.
161. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity / L. Mira, M. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. Florêncio, K. Jennings // Free Radic Res. – 2002. – Vol. 36. – P. 1199–208.
162. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener / N. W. Megeji, J. K. Kumar, V. Singh, V. K. Kaul, & P. S. Ahuja // Current Science. – 2005. – Vol. 88. – P. 801–804.
163. Jayaraman, S. *In-vitro* antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts / S. Jayaraman, M. S. Manonharan and S. Illanchezian // Trop. J. Pharm. Res. – 2008. – Vol. 7. – P. 1143–1149.
164. Jeppesen, P. B. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats / P. B. Jeppesen, S. Gregersen, K. K. Alstrup, K. Hermansen // Phytomedicine. – 2002. – Vol. 9. – P. 9–14.
165. Jhala, A. J. Flax (*Linum usitatissimum* L.): current uses and future applications / A. J. Jhala, L. M. Hall // Aust. J. Appl. Sci. – 2010. – Vol. 4. – P. 4304–4312.

166. Kaithwas, G. Evaluation of antiulcer and antisecretory potential of *Linum usitatissimum* fixed oil and possible mechanism of action / G. Kaithwas, D. K. Majumdar // *Inflammopharmacology*. – 2010. – Vol. 18. – P 137–145.
167. Kinghom, A. D. Overview In: Kinghom, A. D. *Stevia, the genus Stevia* / A. D. Kinghom. – N. Y. : Taylor and Francis, 2002. – P. 1–17.
168. Makapugay, H. C. Improved high performance liquid chromatographic separation of *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycoside using linear gradient elution / H. C. Makapugay, N. P. Nanayakkara and A. Kinghorn // *J. of Chromatography*. – 1984. – Vol. 283. – P. 390–395.
169. Manish, B. *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Stevia Rebaudiana* Bertoni Leaves / B. Manish, Tadhani and S. Rema // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2006. – Vol. 5. – P. 557–560.
170. Monica, S. J. Phytochemical screening of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) / S. J. Monica and M. Joseph // *Int. J. Sci.Res.* – 2016. – Vol. 5(3). – P. 218–220.
171. Muanda, F. N. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* leaves / F. N. Muanda, R. Soulimani, B. Diop and A. Dicko // *LWT- Food Sc. Technol.* – 2011. – Vol. 3. – P. 1–8.
172. Nykter, M. Quality characteristics of edible linseed oil / M. Nykter, H. R. Kymäläinen // *Agricultural and Food Science*. – 2006. – Vol. 15. – P. 402–413.
173. Oomah, B. D. Flaxseed as a functional food source / B. D. Oomah // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2001. – Vol. 81. – P. 889–894.
174. Pól, J. Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry / J. Pól, B. Hohnová and T. Hyötyläinen // *J. Chromatogr A*. – 2007. – Vol. 1150. – P. 85–92.
175. Pop, G. Researches regarding skin antiphotaging effect of *Linum usitatissimum* L. oil by using an in vivo skin imagistic dermatologic evaluation

- / G. Pop, A. Laza, A. Dragomirescu, I. Radulov, D. Pop // *Planta Medica*. – 2011. – Vol. 77. – PK6.
176. Preethi, D. Studies on antibacterial activity, phytochemical analysis of *Stevia rebaudiana* (Bert.) – An important calorie free biosweetner / D. Preethi, T. M. Sridhar, P. Josthna and C. V. Naidu // *Journal of Ecobiotechnology*. – 2011. – Vol. 3 (7). – P. 05–10.
177. Rodriguez-Leyva, D. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid / D. Rodriguez-Leyva, C. M. Dupasquier, R. McCullough, G. N. Pierce // *The Canadian journal of cardiology*. – 2010. – Vol. 26. – P. 489–496.
178. Saxena, S. Evaluation of flaxseed formulation as a potential therapeutic agent in mitigation of dyslipidemia / S. Saxena, C. Katare // *Biomedical Journal*. – 2014. – Vol. 37, № 6. – P. 386 – 391.
179. Semenova E. Use of Physicochemical Method for Evaluation of Mucilage Producing Ability of the *Linum Usitatissimum* L. Seeds / E. Semenova. E. Kurdyukov, N. Mezhenaya, V. Presnyakova, E. Presnyakova, D. Goncharov, I. Moiseeva, S. Kolesnikova, Y. Moiseev // in *The 2nd International Symposium on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine, KnE Energy & Physics*. – 2018. – P. 462–469.
180. Simopoulos, A. P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases / A. P. Simopoulos // *Food Review International*. – 2004. – Vol. 1, № 1. – P. 77–90.
181. Simopoulos, A. P. The importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids / A. P. Simopoulos // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2002. – Vol. 56. –P. 365–379.
182. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – A Review / S. Madan, S. Ahmad, G. N. Singh, K. Kohli, Y. Kumar, R. Singh et al. // *Indian Journal of Natural Products and Resources*. – 2010. – Vol. 1 (3). – P. 267–286.
183. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisdica* / G. Ozkan, O. Sagdic, R. S. Gokturk, O. Unal

- and S. Albayrak // Food Science and Technology. – 2010. – Vol. 43. – P. 186–190.
184. Sumit, G. Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens / G. Sumit, E. Subudhi & N. Sanghamitra // Journal of Natural Products. – 2008. – Vol. 2 (1). – P. 27–31.
185. Tadhani, M. B. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves / M. B. Tadhani, V. H. Patel and R. Subhash // J. Food Comp. Anal. – 2007. – Vol. 20. – P. 323–329.
186. Tadhani, M. Preliminary Studies on *Stevia rebaudiana* Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening / M. Tadhani and R. Subhash // Journal of Medical Sciences. – 2006. – Vol. 6. – P. 321–326.
187. Virendra, V. P. Assessment of *Stevia (Stevia rebaudiana)*-natural sweetener: A review / V. P. Virendra and P. Kalpagam // J. Food Sci Technol. – 2008. – Vol. 45. – P. 467–473.
188. Wallin, H. Steviol glycosides. 63rd Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) / H. Wallin // Chemical and Technical Assessment (CTA). – 2007. – Vol. 1-7.
189. Zimmermann, B. F. Separation of Steviol Glycosides by Hydrophilic Liquid Interaction Chromatography / B. F. Zimmermann, U. Woelwer-Rieck, M. Papagiannopoulos // Food Analytical Methods. – 2012. – Vol. 5, № 2. – P. 266–271.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

Проект фармакопейной статьи «Стевии листья»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

«Утверждаю»

«Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»

Генеральный директор

_____ А.Н. Миронов

« ____ » _____ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Стевии листья

ФС 42 – XXXXX –

Steviae folia

Срок введения установлен

с « ____ » _____ г.

Срок действия

до « ____ » _____ г.

Собранные в фазу цветения высушенные листья культивируемого травянистого растения Стевия Ребо - *Stevia rebaudiana* семейства астровых — *Asteraceae*, цельные, измельченные, используемые для производства лекарственных средств.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье исследуется невооруженным глазом, с помощью лупы (x10) или стереомикроскопа (8x, 16x, 20x, 40x) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIII).

Цельное сырье. Различной формы кусочки листьев, стеблей, реже цветков и бутонов, размером 10 мм и более. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что лист простой, сидячий, 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. Прикорневые листья обратнояйцевидные, имеют большие размеры до 9 см.

Цвет листьев зеленый, у прикорневых - он более насыщенный. Поверхность гладкая. Вкус приторно сладкий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок, с ясно заметными жилками и мелкими прижатыми волосками с одной стороны; черешки, реже встречаются элементы чашечки и венчика;

Цвет измельченного сырья зелёный, вкус приторно-сладкий.

Порошок. Смесь кусочков листьев, стеблей, редко – цветков и бутонов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: фрагменты листовых пластинок, черешков, стеблей, реже встречаются

элементы чашечки и венчика. На поверхности листовой пластинки видны жилки, снизу по жилкам могут располагаться слегка прижатые волоски беловатого цвета; кусочки черешков и стеблей зеленого цвета, на фрагментах стеблей волоски немногочисленные.

Цвет порошка зеленый, светло-зеленый или коричневато-зеленый; Запах слабый, вкус приторно-сладкий.

Микроскопические признаки. Сырье исследуется с помощью микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIII издания).

Цельное сырье, измельченное сырье. Характер кутикулы лучисто-морщинистый – выступы в виде прямых или волнистых ребер, которые расходятся в виде лучей от устьиц, волосков, железок, их мест прикрепления (рис. 1а). Устьица имеют круглую форму. Тип устьиц (по уровню расположения относительно поверхности эпидермиса): погруженные устьица (для листьев растений открытого грунта). Напротив, у образцов, выращенных в закрытом грунте, устьица расположены в одной плоскости с эпидермисом (рис. 1б). Устьичный аппарат аномоцитный - замыкающие клетки не имеют ярко выраженных околоустьичных клеток. Тип устьичных клеток - чечевицевидный - 2 одинаковые клетки полулунной формы расположены симметрично. На фронтальной плоскости утолщение оболочки почти равномерное. Щель веретеновидная. Волоски простые многоклеточные однорядные конусовидные и остроконусовидные. Характер утолщенности клеточных стенок волосков: большинство волосков тонкостенные. Покрывающая кутикула волосков имеет гладкую поверхность. Особенностью мест присоединения волосков является многоклеточное основание (рис. 1в).

Структура листа имеет дорсовентральный тип – палисадная паренхима расположена с одной стороны листа, а губчатая паренхима расположена с другой стороны листа. Клетки палисадной паренхимы имеют цилиндрическую форму, плотно сомкнуты и располагаются в листьях

перпендикулярно верхнему эпидермису, образуют один-два слоя. Клетки губчатой паренхимы изодиаметрической формы, с выраженными межклетниками. На поверхности листа, кроме волосков, находятся также сидячие желёзки округлой формы.

Характер проводящей системы: 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. 1г,д). Наличие механической ткани: колленхима в листьях отсутствует.

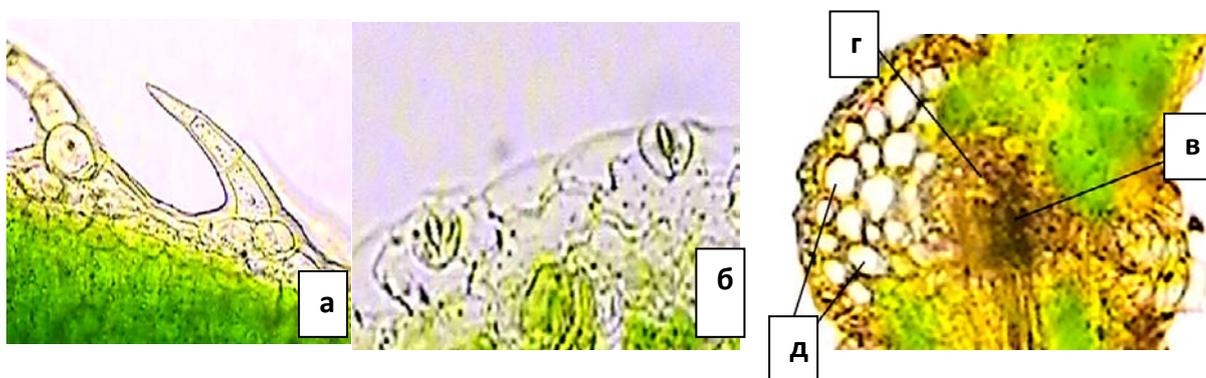


Рисунок 1 - Микроморфология стевии листьев (x 400):

а – кутикула, эпидермис, основание волоска, б – устьица с чечевицевидными клетками, в – сосуды и трахеиды, г – волокна, д – ситовидные трубки.

Клетки эпидермиса округло-овальные со слабоизвилистыми равномерно утолщенными стенками, кутикула имеет лучисто-морщинистый характер – выступы в виде прямых или волнистых ребер, которые расходятся в виде лучей от устьиц, волосков, железок, их мест прикрепления, устьица аномоцитного типа, устьичные клетки чечевицевидной формы, волоски крупные или мелкие многоклеточные, сидячие железки округлой формы, идиобласты рассеяны неравномерно среди клеток других тканей и имеют одно или несколько включений (рис. 2).

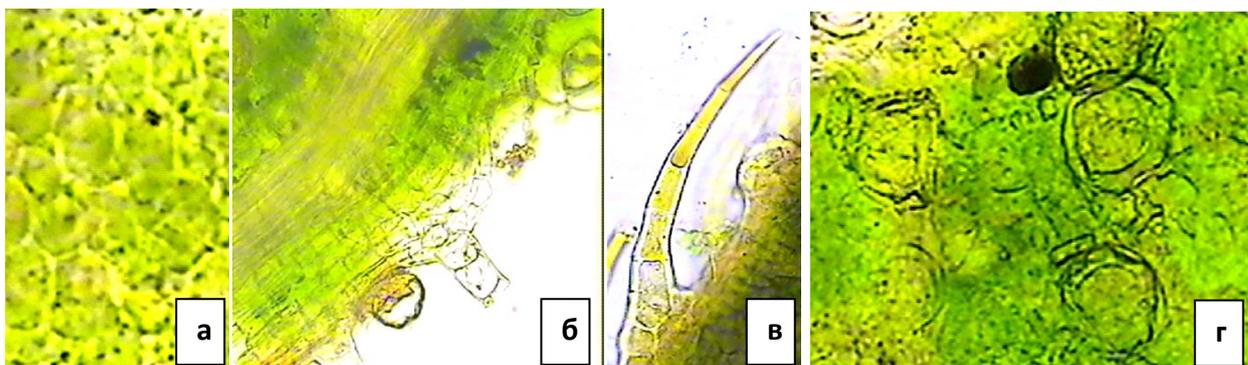


Рисунок 2 - Микроморфология измельчённых стевии листьев (x100):

а – клетки эпидермиса, б – сидячие желёзки, в – многоклеточный конусовидный волосок, г – идиобласты (x400)

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны: сидячая железка, округло-овальные клетки эпидермиса округло-овальные со слабоизвилистыми равномерно утолщенными стенками, чечевицевидные устьица. Иногда встречаются волоски простые многоклеточные однорядные конусовидные и остроконусовидные.

Определение основных групп биологически активных веществ.

1. К 1 мл полученного извлечения (раствор А, см. раздел «Количественное определение») прибавляют цинк металлический (1 таблетка) или 0,1 г порошка магния, после прибавляют 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты; постепенно появляется розовое окрашивание (флавоноиды).

2. Ультрафиолетовый спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») в области от 100 нм до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны $330 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$, а также «плечо» в области $290 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (гидроксикоричные кислоты) (рис.3).

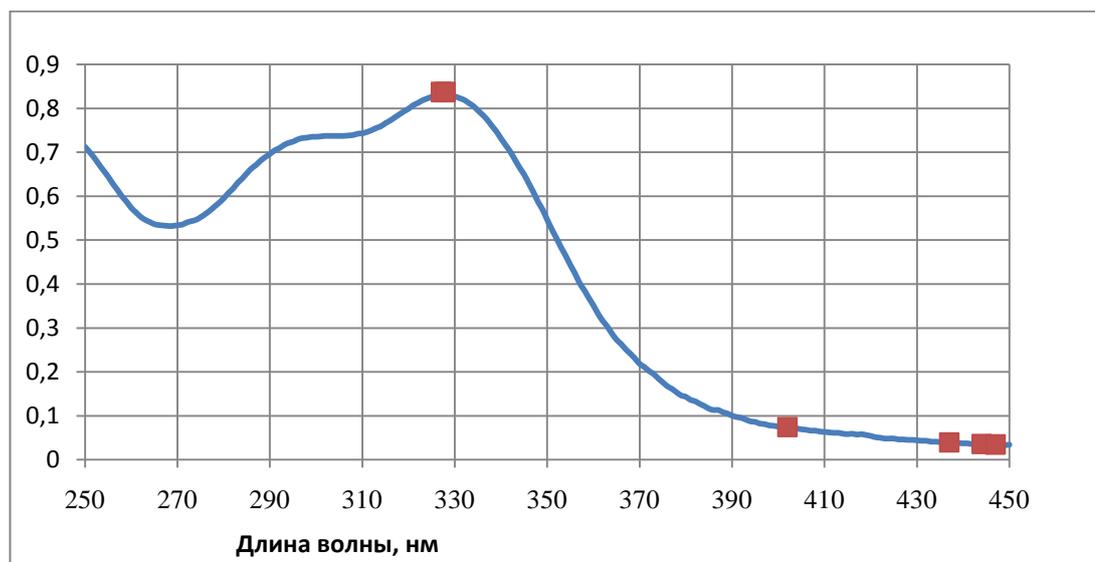


Рисунок 3 - УФ-спектр спиртового экстракта стевии.

3. 1,0 г (точная навеска) помещают в термостойкую коническую колбу на 100 мл и добавляли 50 мл спирта этилового 70%. Колбу взвешивают вместе с содержимым, после чего подсоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч после закипания экстрагента. Через 2 часа колбы остужают, взвешивают, доводят массу содержимого до первоначального значения. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр во флакон темного стекла. Данное извлечение наносят на хроматографические пластинки. Хроматографирование восходящим способом в камере с системой растворителей: в системе хлороформ – этиловый спирт 70 % – вода (26:16:3) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ». После того как фронт растворителей пройдет 8 см, пластинку вынимают из камеры и высушивают на воздухе в течение 30 мин. На хроматограмме обнаруживается зона доминирующего вещества с $R_f = 0,55$, соответствующее хлорогеновой кислоте. В извлечении из листьев стевии обнаруживаются вещества, совпадающие по подвижности с цинарозидом ($R_f = 0,64$).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 6 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси.

Листья, изменившие окраску (потемневшие и почерневшие). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Стебли. *Цельное сырье* – не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

Цельное сырье: суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту – не менее 5,0 %; суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид – не менее 1,0 %. *Измельченное сырье:* суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту – не менее 5,0 %; суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид – не менее 1,0 %. *Порошок:* суммы фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту – не менее 5,0 %; суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид – не менее 1,0 %

Сумма фенилпропаноидов.

Аналитическую пробу сырья, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане при $t - 90^{\circ}\text{C}$ в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

Измеряют оптическую плотность извлечения стевии. Раствор готовят по методике: 0,5 мл помещают в мерную колбу на 25 мл, растворяют в 15 мл спирта этилового 70%, объем доводят до метки тем же спиртом. В качестве раствора сравнения используют раствор спирта 70% .

УФ-спектр раствора Б в области от 250 до 450 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 330 нм и плечо при длине волны 290 нм.

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

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

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.

Сумма флавоноидов.

Аналитическую пробу сырья, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане при $t - 90^\circ\text{C}$ в течение 45 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 3% в спирте 70% и через 10 мин 2 капли разведенной кислоты уксусной. Объем раствора доводят спиртом этиловым 70% до метки и оставляют на 30 минут (раствор Б).

Оптическую плотность полученного раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя раствор сравнения для испытуемого раствора.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 2 \times 1 \times 50 \times 25 \times (100 \times W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина;

m_0 – масса ГСО цинарозида, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

2) С использованием удельного показателя поглощения цинарозида.

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

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

где: A – оптическая плотность раствора;

350 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.**Проект ФС растительного сбора «Стелинол»
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

«Утверждаю»

«Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»

Генеральный директор

_____ А.Н. Миронов

« ____ » _____ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ
проект****Сбор «Стелинол»***Species «Stelinol»***ФС 42 – XXXXX –**

Срок введения установлен

с « ____ » _____ г.

Срок действия

до « ____ » _____ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на растительный сбор «Стелинол». Состав: семена льна (99%) – 99 ч, листья стевии (1%) – 1 ч.

**СПЕЦИФИКАЦИЯ
СБОР «СТЕЛИНОЛЬ»**

| Показатели | Методы | Нормы |
|---|---|--|
| Внешние признаки | ГФ XIII (ОФС 1.5.3.0004.15) | Цельные семен льна от желтого до коричневого цвета, с измельченными частицами листьев стевии зеленого цвета |
| Микроскопия | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0003.15) | Микроскопия фрагментов сбора |
| Качественные реакции | Осаждение слизи этанолом из водного извлечения. УФ-спектроскопия | Образование хлопьев, а при стоянии осадка. максимум поглощения при длине волны 330 нм ± 2 нм, а также «плечо» в области 290 нм ± 2 нм |
| Влажность | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0007.15) | Не более 13,0% |
| Зола общая | ГФ XIV (ОФС.1.2.2.2.0013.15) | Не более 8,0% |
| Зола не растворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0005.15) | Не более 5,0% |
| Частиц не проходящих сквозь сито с отверстиями d=7 мм | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0004.15) | Не более 12,0% |
| Частиц проходящих сквозь сито с отверстиями d=0,5 мм | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0004.15) | Не более 6,0% |
| Органическая примесь | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0004.15) | Не более 3,0% |
| Минеральная примесь | ГФ XIV (ОФС 1.5.3.0004.15) | Не более 2,0% |
| Микробиологическая чистота | ГФ XIV (ОФС.1.2.4.0002.18) | Категория 4А |

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сбор измельченный. С цельными семенами льна от желтого до коричневого цвета, с измельченными частицами листьев стевии зеленого цвета. Запах слабый. Вкус сладковатый.

Микроскопия. При рассмотрений микропрепаратов сбора под микроскопом видны: кожура в виде темно-бурой полосы, эндосперм и

зародыш. При большом увеличении ясно различаются слои семенной кожуры. Клетки эпидермиса округло-овальные со слабоизвилистыми равномерно утолщенными стенками, кутикула имеет лучисто-морщинистый характер – выступы в виде прямых или волнистых ребер, которые расходятся в виде лучей от устьиц, волосков, железок, их мест прикрепления, устьица аномоцитного типа, устьичные клетки чечевицевидной формы, волоски крупные или мелкие простые многоклеточные однорядные конусовидные и остроконусовидные, сидячие железки округлой формы, клетки палисадной паренхимы цилиндрической формы, клетки губчатой паренхимы изодиаметрической формы.

Качественные реакции.

5 мл водного извлечения и 20 мл 95% спирта этилового, нагревание 1-2 минуты на водяной бане. Образование хлопьев, а при стоянии осадка.

Ультрафиолетовый спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») в области от 100 нм до 550 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 330 нм \pm 2 нм, а также «плечо» в области 290 нм \pm 2 нм (гидроксикоричные кислоты) (рис.1).

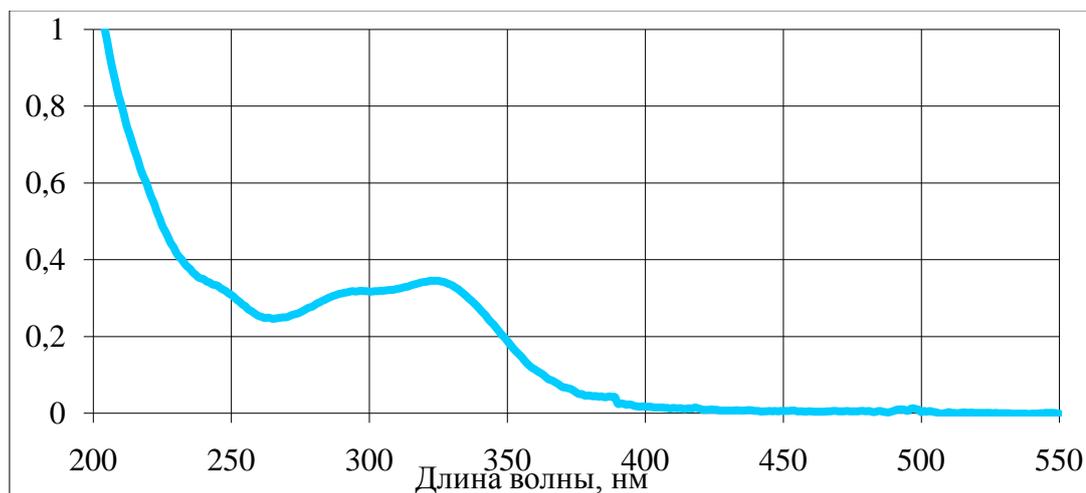


Рисунок 1 - УФ-спектр извлечения из растительного сбора «Стелинол»

Числовые показатели. Потери в массе при высушивании не более 10,0 %, золы общей не более 8,0%, золы не растворимой в 10,0% растворе хлористоводородной кислоты, влажности не более 10,0%, частиц не проходящих сквозь сито 5 мм не более 12,0 %, проходящих сквозь сито 0,5 мм

не более 6,0 %, диагностически значимых признаков не менее 40,0 %, органическая примесь - не более 3,0 %, минеральная примесь - не более 2,0 %, сумма фенилпропаноидов – не менее 5,0 %, сумма полисахаридов – не менее 12,0 %.

Количественное определение.

Методика 1. Около 20,0 г (точная навеска) растительного сбора, помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 100 мл дистиллированной воды и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу нагревают на кипящей водяной бане при температуре 90°C в течение 15 минут, периодически встряхивают для смывания частиц сырья со стенок, настаивали в течение 45 минут. Извлечение фильтруют через двойной слой марли (раствор А).

Измеряют оптическую плотность собственного поглощения извлечения из сбора. Раствор готовят по методике: 2,0 мл помещают в мерную колбу на 25 мл, растворяют в 15 мл дистиллированной воды, объем доводят до метки той же водой. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду.

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

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

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.

Методика 2. Аналитическую пробу измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу

присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяют еще 2 раза: первый раз 200 мл воды, второй раз 100 мл воды. Водные извлечения объединяют, охлаждают до комнатной температуры, фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм и предварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А). 25,0 мл раствора А помещают в стакан вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин. Через 1 ч содержимое стакана переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют со скоростью 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100-105 °С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 20 мл этилацетата. Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100-105 °С до постоянной массы [40,94].

Содержание суммы полисахаридов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{a \times 25 \times (100 - W)}$$

где m_1 — масса фильтра, г;

m_2 — масса фильтра с осадком, г;

a — навеска сырья, г;

W — влажность сырья, %.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Не более 10 %.

Зола общая. Не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Сбор измельченный - не более 5 %.

Измельченность. Сбор измельченный: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, не более 12 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - не более 6 %.

Посторонние примеси

Органическая примесь. Сбор измельченный - не более 3 %.

Минеральная примесь. Сбор измельченный - не более 2 %.

Зараженность вредителями запасов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Масса содержимого упаковки. В соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

***Остаточные количества пестицидов.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

*Контроль по показателю качества «Остаточные количества пестицидов» проводят на стадии производственного процесса.

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты о внедрении результатов диссертационной работы

«Утверждаю»

Проректор по учебной работе ФГБОУ ВО
"Национальный исследовательский
Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарёва"
профессор А.Ю. Маслова
« 4 » декабря 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Курдюкова Евгения Евгеньевича «Фармакогностическое исследование семян льна и листьев стевии как компонентов растительного сбора «Стелинол» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии ФГБОУ ВО "МГУ им. Н. П. Огарёва" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

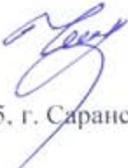
Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии: зав. кафедрой, д.м.н., профессора В.И. Инчина, профессора, д.м.н. А.В. Сипрова, доцента, к.м.н. О.А. Куликова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Курдюкова Е.Е. посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и растительного сбора на основе семян льна и листьев стевии, содержащих жирные кислоты, аминокислоты, полисахариды, дитерпеновые гликозиды и флавоноиды в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего жирные кислоты, аминокислоты, полисахариды, дитерпеновые гликозиды и флавоноиды.

Внедренные результаты применяются при изучении вопросов качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья и при разработке методов стандартизации лекарственного растительного сырья и средств растительного происхождения.

Зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, д.м.н., профессор

 В.И. Инчина

Зам. директора по учебной работе
Медицинского института

 Л.В. Чегодаева

430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68

«Утверждаю»

Ректор ФГБОУ ВО "Пензенский
государственный университет"

А.Д. Гуляков

« 5 » ноября 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Курдюкова Евгения Евгеньевича «Фармакогностическое исследование семян льна и листьев стевии как компонентов растительного сбора «Стелинол» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре «Общая и клиническая фармакология» медицинского института ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Комиссия в составе сотрудников кафедры «Общая и клиническая фармакология» лечебного факультета, зав. кафедрой «ОиКФ» лечебного факультета профессора, д.м.н. И.Я. Моисеевой, доцента, к.м.н. О.П. Родиной, доцента, к.х.н. А.В. Кузнецовой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Курдюкова Е.Е., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов на основе семян льна и листьев стевии, содержащих полисахариды, дитерпеновые гликозиды и флавоноиды в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего полисахариды, дитерпеновые гликозиды и флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют разработке объективных методик диагностики и определения качества сырья стевии Ребо, повышению объективности стандартизации лекарственных растительных препаратов на его основе, обосновывают целесообразность использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе листьев стевии.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой «ОиКФ», д.м.н., профессор  И.Я. МОИСЕЕВАДоцент кафедры «ОиКФ», к.м.н.  О.П. РОДИНАДоцент кафедры «ОиКФ», к. х. н.  А.В. КУЗНЕЦОВА

440026, г. Пенза, ул. Красная, 40