

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Филимонова Светлана Михайловна

**Изучение состава и содержания фитостеролов в экстрактах лекарственного
растительного сырья и перспективных видах**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Щепочкина Ольга Юрьевна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Характеристика фитостеролов.....	15
1.1.1 Химическая структура фитостеролов.....	15
1.1.2 Биосинтез фитостеролов.....	17
1.1.3 Растительные источники фитостеролов.....	19
1.1.4 Фармакологические эффекты фитостеролов.....	25
1.2 Методы экстракции фитостеролов из лекарственного растительного сырья.....	27
1.3 Методы анализа фитостеролов.....	30
1.3.1 Пробоподготовка извлечений из лекарственного растительного сырья перед количественным определением.....	31
1.3.2 Качественный анализ фитостеролов.....	32
1.3.3 Количественный анализ фитостеролов, извлеченных из лекарственного растительного сырья.....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.2 Методы исследования.....	43
2.2.1 Качественный анализ фитостеролов методом ТСХ.....	44
2.2.2 Спектрофотометрия в видимой области спектра.....	46
2.2.3 Количественный анализ методом ГХ-МС.....	46
2.3 Изучение стабильности.....	47
2.4 Определение содержания спирта этилового.....	47
2.5 Определение сухого остатка.....	49
2.6 Определение антиамилазной активности спиртовых извлечений и β -ситостерола.....	49

2.7 Статистическая обработка результатов и валидация.....	50
ГЛАВА 3. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФИТОСТЕРОЛОВ.....	51
3.1 Извлечение фитостеролов из лекарственного растительного сырья.....	51
3.2 Качественный анализ спиртовых извлечений из ЛРС методом тонкослойной хроматографии.....	52
3.2.1 Методика хроматографирования.....	53
3.2.2 Выбор способов детектирования фитостеролов.....	54
3.2.3 Идентификация фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС.....	55
ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОСТЕРОЛОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ.....	61
4.1 Разработка и валидация количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол методом спектрофотометрии.....	61
4.1.1 Условия спектрофотометрического определения.....	61
4.1.2 Пробоподготовка.....	62
4.1.3 Количественное определение суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол методом спектрофотометрии.....	64
4.1.4 Валидация методики количественного определения фитостеролов методом спектрофотометрии.....	67
4.2 Количественное определение фитостеролов методом газовой хроматографии.....	70
4.2.1 Подбор оптимальных условий хроматографирования.....	71
4.2.2 Валидация методики ГХ-МС.....	74
4.2.3 Количественный анализ фитостеролов в спиртовых извлечениях из лекарственного растительного сырья.....	77
4.3 Анализ стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья.....	80
ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИАМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФИТОСТЕРОЛОВ.....	90
5.1 Определение антиамилазной активности спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья.....	90

5.2 Идентификация биологически активных соединений, обладающих антиамилазным эффектом.....	93
5.3 Подтверждение антиамилазной активности β -ситостерола методом ГХ-МС.....	96
5.4 Подтверждение антиамилазной активности β -ситостерола методом спектрофотометрии.....	97
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Акты внедрения.....	120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Лекарственное растительное сырье является источником широкого спектра биологически активных соединений, обладающих разнообразными фармакологическими эффектами.

Фитостеролы – это высокомолекулярные соединения растительного происхождения, имеющие структурное сходство с холестерином. Фитостеролы обладают рядом фармакологических свойств. Употребление фитостеролов позволяет снизить содержание холестерина в крови, что является профилактикой сердечно-сосудистых заболеваний. Доказана эффективность [57] и безопасность [25] фитостеролов. Изучена эффективность фитостеролов для облегчения симптомов доброкачественной гиперплазии предстательной железы [115]. Препараты, содержащие спиртовой экстракт плодов пальмы Сереноа или пальмы ползучей (*Serenoa repens Hook.F.*), представлены на российском рынке под торговыми названиями «Простамол уно», «Пермиксон», «Просталлант», «Простагут», «Пальмапрост» и другими. Описаны такие фармакологические эффекты фитостеролов, как: противораковый [130], ангиогенный [69], противовоспалительный [55], анальгетический [159], иммуномодулирующий [79]. Изучение других фармакологических эффектов фитостеролов, например, антиамилазной активности, является актуальной задачей.

Фитостеролы – это важные компоненты питания [163]. Наиболее богатыми источниками фитостеролов являются растительные масла [56], овощи, семена [59, 127], зерновые [35, 106, 116], орехи [149, 150].

В качестве источника фитостеролов используют бобы сои (*Glycine max*) – 0,2-0,3% [62], плоды пальмы Сереноа (*Serenoa repens Hook.F.*) – 0,015-0,05% [132]. Фитостеролы обнаружены в лекарственных растениях из семейств Бобовых, Сложноцветных, Розоцветных и других, во всех органах и морфологических группах сырья. Согласно литературным данным об

отечественных и зарубежных исследованиях, определение содержания фитостеролов было проведено в большом количестве лекарственных растений зарубежной флоры. Однако, удельный вес работ, посвящённых изучению качественного и количественного состава фитостеролов в растениях, произрастающих на территории Российской Федерации, невелик.

Согласно требованиям Европейской фармакопеи, по наличию β -ситостерола стандартизуют такое лекарственное растительное сырьё, как эхинацеи бледной корни (*Echinaceae palliae radix*), сливы африканской кора (*Pruni africanae cortex*), пальмы Сереноа плоды (*Sabalisa serrulatae fructus*), иглицы корневища (*Rusci rhizoma*) (раздел «Подлинность») [40]. Британская фармакопея регламентирует проводить стандартизацию по наличию β -ситостерола таких видов лекарственного сырья, как эхинацеи бледной корни (*Echinaceae palliae radix*), эхинацеи пурпурной корни (*Echinacea purpurea*), сливы африканской кора (*Prunus africana*), витании снотворной кора (*Withania somnifera* L.) (раздел «Подлинность»). По требованиям Государственной Фармакопеи РФ ни одно лекарственное растительное сырьё не стандартизуют по содержанию фитостеролов.

Изучение содержания БАВ группы фитостеролов в сырьё лекарственных растений, произрастающих на территории Российской Федерации, позволит использовать отечественную сырьевую базу для получения биологически активных веществ широкого спектра фармакологической активности. В связи с этим разработка специфических и достоверных методов контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего фитостеролы, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Начало изучения фитостеролов относится к 30 гг XX века. В 1982 г Мэттсон и соавт. впервые описали гипохолестеринемическое действие β -ситостерола [90]. К 1973 г было изучено уже 44 фитостерола, содержащихся в растениях. К 2002 г

описаны основные химические и физические свойства, а также методы анализа соединений данной группы [100]. В настоящее время известно более 250 фитостеролов. Есть данные о многочисленных фармакологических эффектах фитостеролов, например, способности снижать уровень холестерина в крови и облегчать симптомы при гиперплазии простаты, однако, нет подтверждения их антиамилазной активности.

Рядом зарубежных ученых проведены исследования содержания фитостеролов в широком спектре лекарственного растительного сырья (ЛРС), но информация по перспективным видам лекарственных растений, произрастающих на территории Российской Федерации, отсутствует.

Цель исследования

Провести сравнительное фитохимическое изучение лекарственного растительного сырья, содержащего фитостеролы, с использованием современных методов анализа.

Задачи исследования

1. Провести информационно-аналитическое исследование данных научной литературы о фармакологической активности, распространении фитостеролов в лекарственном растительном сырье, способах их экстракции, а также методах качественного и количественного анализа.
2. Экспериментально подобрать оптимальные условия извлечения фитостеролов из ЛРС и разработать методику качественной оценки содержания фитостеролов в извлечениях из ЛРС методом ТСХ.
3. Разработать и валидировать методику количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в извлечениях из ЛРС методом спектрофотометрии.

4. Разработать и валидировать методику количественного определения фитостеролов в извлечениях из ЛРС методом ГХ-МС. Оценить и сравнить количественное содержание фитостеролов в извлечениях из ЛРС с целью выявления наиболее перспективных источников фитостеролов.
5. Провести анализ стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС в течение 6 месяцев в условиях хранения при 20°C.
6. Провести анализ антиамилазной активности спиртовых извлечений (экстрактов) из ЛРС и β -ситостерола с использованием метода спектрофотометрии.

Научная новизна

Проведена сравнительная оценка содержания фитостеролов в ЛРС 12 видов растений, произрастающих на территории Российской Федерации. Для этого разработана методика качественного анализа фитостеролов в ЛРС хроматографическими методами (ТСХ, ГХ-МС) и спектрофотометрическим методом. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС методом спектрофотометрии. Разработана и валидирована методика количественного определения фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом ГХ-МС. Изучена антиамилазная активность спиртовых извлечений, полученных из 12 видов ЛРС. Доказана антиамилазная активность β -ситостерола.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты проведенных исследований расширяют теоретические знания о составе и возможных фармакологических эффектах фармакопейного лекарственного растительного сырья, а также сырья растений перспективных видов, содержащего фитостеролы. Разработанные в ходе диссертационного исследования методики могут являться основой для дальнейшего изучения

содержания фитостеролов в ЛРС и антиамилазной активности биологически активных соединений.

По результатам проведенных испытаний разработаны методики качественной и количественной оценки содержания фитостеролов в лекарственном растительном сырье. Проведено сравнительное фитохимическое изучение 12 видов ЛРС по содержанию суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол. Проведено сравнительное изучение антиамилазной активности спиртовых извлечений (экстрактов) из ЛРС и доказана антиамилазная активность β -ситостерола.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на поиске, систематизации и анализе научных данных о строении, физико-химических и фармакологических свойствах фитостеролов, обосновании выбора методов, способов пробоподготовки и условий хроматографического и спектрофотометрического изучения фитостеролов.

Объектами исследования являлось сырьё лекарственных растений семейства Бобовые (*Fabaceae*) (фармакопейных: солодки корни (*Glycyrrhizae radices*), донника трава (*Meliloti herba*), стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*), сенны листья (*Sennae folia*), термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*), бутоны софоры японской (*Sophora japonica L.*), семейства *Lamiaceae* шалфея лекарственного листья (*Salviae officinalis folia*); и нефармакопейных лекарственных растений семейства Бобовые (*Fabaceae*): трава клевера лугового (*Trifolium pratense L.*), трава козлятника восточного (*Galega orientalis Lam.*), листья солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*), плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus Lindl.*), трава чины луговой (*Lathyrus pratensis L.*). Из сырья получали спиртовые извлечения (экстракты) в соотношении 1:1 (из 1 г сырья получали 1 мл спиртового извлечения).

При выполнении работы нами были использованы методы тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии, ГХ-МС, качественные реакции. Валидацию разработанных методик и статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV [1] и с применением программы Microsoft Excel.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты выбора оптимальных условий проведения качественного исследования фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом тонкослойной хроматографии.
2. Разработанные методики количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС методами спектрофотометрии и ГХ-МС.
3. Результаты количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в 12 видах ЛРС. Экспериментальными данными подтверждено высокое содержание фитостеролов в плодах люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), траве козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) и траве чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), которые являются перспективными растительными источниками изучаемой группы БАВ.
4. Результаты изучения стабильности фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС в условиях хранения при 20°C в течение 6 месяцев.
5. Результаты количественной оценки антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС и β -ситостерола с использованием метода спектрофотометрии.
6. Доказательство антиамилазной активности β -ситостерола.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Степень достоверности результатов диссертационной работы подтверждается применением современных физико-химических методов

фармацевтического анализа (спектрофотометрических, хроматографических); использованием поверенного оборудования и реактивов; обширностью экспериментального материала (объектом исследования послужили 12 видов лекарственного растительного сырья); актами проверки первичной документации; изучением и использованием в качестве теоретической базы трудов зарубежных и отечественных ученых; публикацией материалов исследования в открытой печати и докладах на научно-практических конференциях. Валидацию разработанных аналитических методик проводили согласно требованиям ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV, оценивая предел обнаружения и предел количественного определения, линейность, правильность и прецизионность. Статистическая обработка результатов исследований проводилась согласно требованиям ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ РФ XIV с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

Доклад, посвященный определению антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС и доказательству антиамилазной активности β -ситостерола «Изучение антидиабетического действия экстрактов лекарственных растений семейства Бобовые (Fabaceae)» отмечен дипломом лауреата конкурса научных работ молодых ученых в рамках XXIX Российского Национального конгресса «Человек и лекарство» (2022).

Апробация результатов исследования

Основные положения работы были доложены на конференции «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2021 г.), на 29 Российском Национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2022 г.), конференции ЗКМУ имени Марата Оспанова (Казахстан, 2022 г.). Апробация работы прошла на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина Первого МГМУ

имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (протокол № 2 от 07.09.2022).

Личный вклад автора

Автором под руководством научного руководителя определена тема исследования, поставлена цель и сформулированы задачи. Автором лично был проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных научных источников, разработан план экспериментальной работы, выбраны объекты исследования, произведена заготовка ЛРС на территории Ботанического сада ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (солодки уральской трава, термопсиса ланцетного трава, козлятника восточного трава, донника лекарственного трава) и в Подмосковье (чины трава и люпина многолистного плоды).

В диссертационной работе представлены результаты разработки методики количественного определения фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол методом спектрофотометрии, ТСХ-анализа спиртовых извлечений из ЛРС и анализа антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС и β -ситостерола, полученных автором самостоятельно в научно-образовательной лаборатории кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина (заведующий кафедрой – Раменская Г.В.) ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Разработка методики идентификации и количественного определения фитостеролов в ЛРС методом ГХ-МС были проведены автором совместно с сотрудником центра «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения» ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) к.х.н. Кузнецовым Р.М.

Автором лично была проведена статистическая обработка результатов исследований и валидации аналитических методик, под руководством научного руководителя Щепочкиной О.Ю. написаны главы диссертационной работы и оформлены научные статьи.

Внедрение в практику

Разработанные методики и результаты количественного определения фитостеролов в ЛРС использованы в учебном процессе кафедры фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Методика количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС внедрена в контрольно-аналитической лаборатории ООО «Центр фармацевтической аналитики».

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют п. 2, 3, 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с комплексной научной темой кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств».

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе 3 научных статьи в журналах, включенных в международные, индексируемые базы данных Chemical Abstracts, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 121 страницах, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части в виде 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 23 рисунками, содержит 17 таблиц, библиография включает 164 источника, в том числе 154 зарубежных и 10 отечественных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика фитостеролов

Термин «фитостеролы» был введен в 1994 г., и с тех пор эта группа веществ растительного происхождения является объектом различных исследований.

1.1.1 Химическая структура фитостеролов

Фитостеролы относятся к группе веществ растительного происхождения [100]. Они являются тритерпенами, высокомолекулярными соединениями (ВМС) из группы ненасыщенных спиртов тетрациклического строения и имеют структурное сходство с животным холестерином. К группе фитостеролов относятся такие соединения, как β -ситостерол, стигмастерол, браССикастерол, авенастерол и другие. Фитостеролы имеют циклопентанпергидрофенантеновое ядро и разветвленную углеводородную цепь при C_{17} (Рисунок 1) [47]. Четыре кольца находятся в цис-сочленении и образуют плоскую α -систему, а метильные радикалы при C_{18} и C_{19} находятся над плоскостью, поэтому фитостеролы относятся к β -стереоизомерам. Спиртовой гидроксил при C_3 чаще всего также находится в β -положении. Соединения, имеющие насыщенный стероловый скелет, называют станолами. Фитостеролы могут содержать алкильные заместители при C_4 , различные разветвленные цепи при C_{17} . У растений алкильная группа при C_{24} уникальна – это может быть метильная, этильная или этилиденная группа (Рисунок 2). Метильные группы могут быть как в α -, так и в β -положении. Таким образом, насчитывается более 250 различных фитостеролов [47, 100].

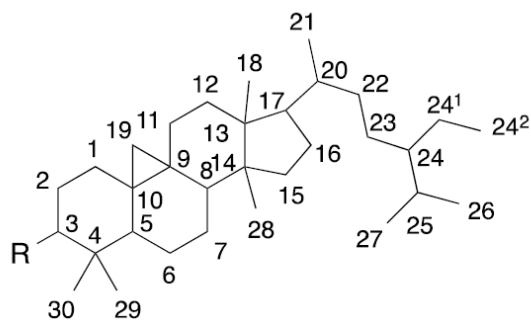


Рисунок 1 – Углеродный скелет стерола, согласно IUPAC, 1989 г.

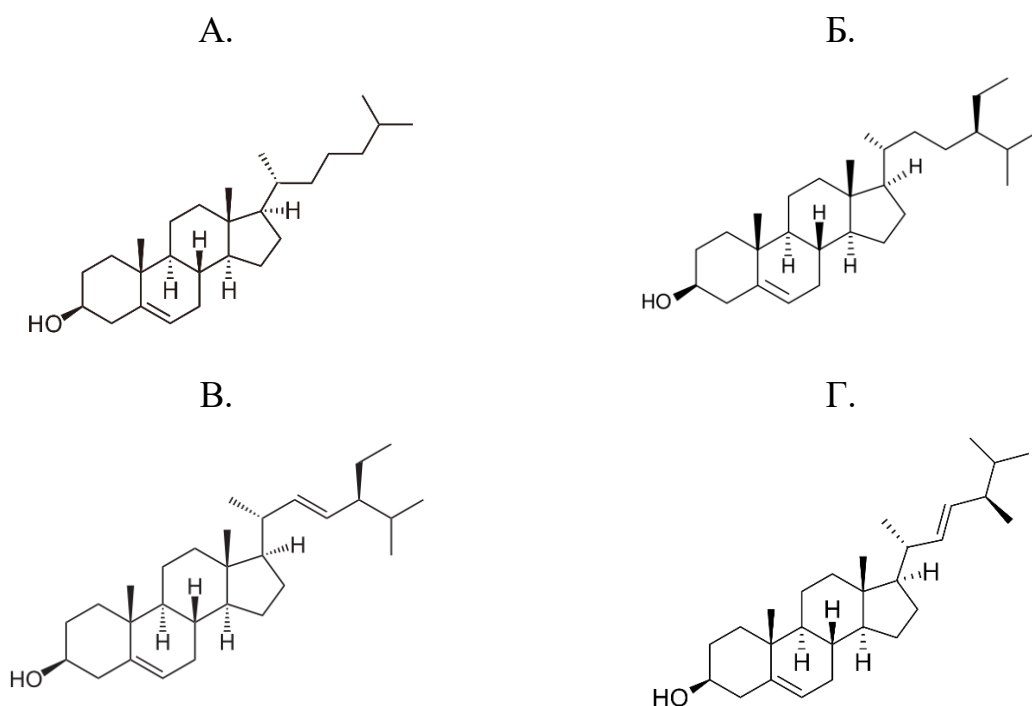


Рисунок 2 – Структурные формулы холестерина (А) и фитостеролов: β -ситостерола (Б), стигмастерола (В), брассикастерола (Г)

Наиболее распространенное процентное содержание фракций фитостеролов в растительных тканях: 30-65% β -ситостерола, 10-40% кампестерола, 0-35% стигмастерола и небольшой процент брассикастерола. В растениях фитостеролы встречаются в пяти формах: в свободном виде, в виде сложных эфиров жирных кислот, гликозидов стеролов, ацилированных гликозидов стеролов и сложных эфиров гидроксидинаминовой кислоты[51].

Также существуют стерилфеноляты – фитостеролы, соединенные с производными фенола[100]: феруловой кислотой [45], кумариновой кислотой, кофеиновой кислотой, синаповой кислотой.

Например, James D Adams и соавт. провели анализ экстракта корней растения *Salvia columbariae* (чия). В извлечении было обнаружено вещество β -ситостерола литоспермат – сложный эфир ситостерола и сальвианолевой кислоты (Рисунок 3) [11].

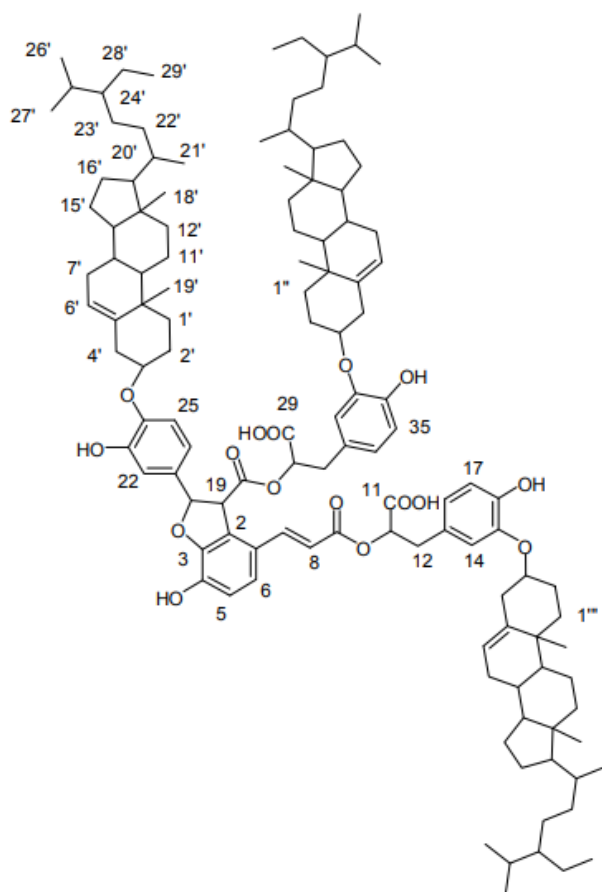


Рисунок 3 – Сложный эфир β -ситостерола и сальвианолевой кислоты

1.1.2 Биосинтез фитостеролов

Биосинтез фитостеролов происходит по изопреноидному пути. Изопреноиды синтезируются из цитоплазматического мевалоната через цепь ферментных реакций. Мевалонат сначала превращается в сквален, затем эпоксируется до оксидосквалена, далее превращается в ланостерол, циклоартенол и другие стеролы (Рисунок 4)[139].

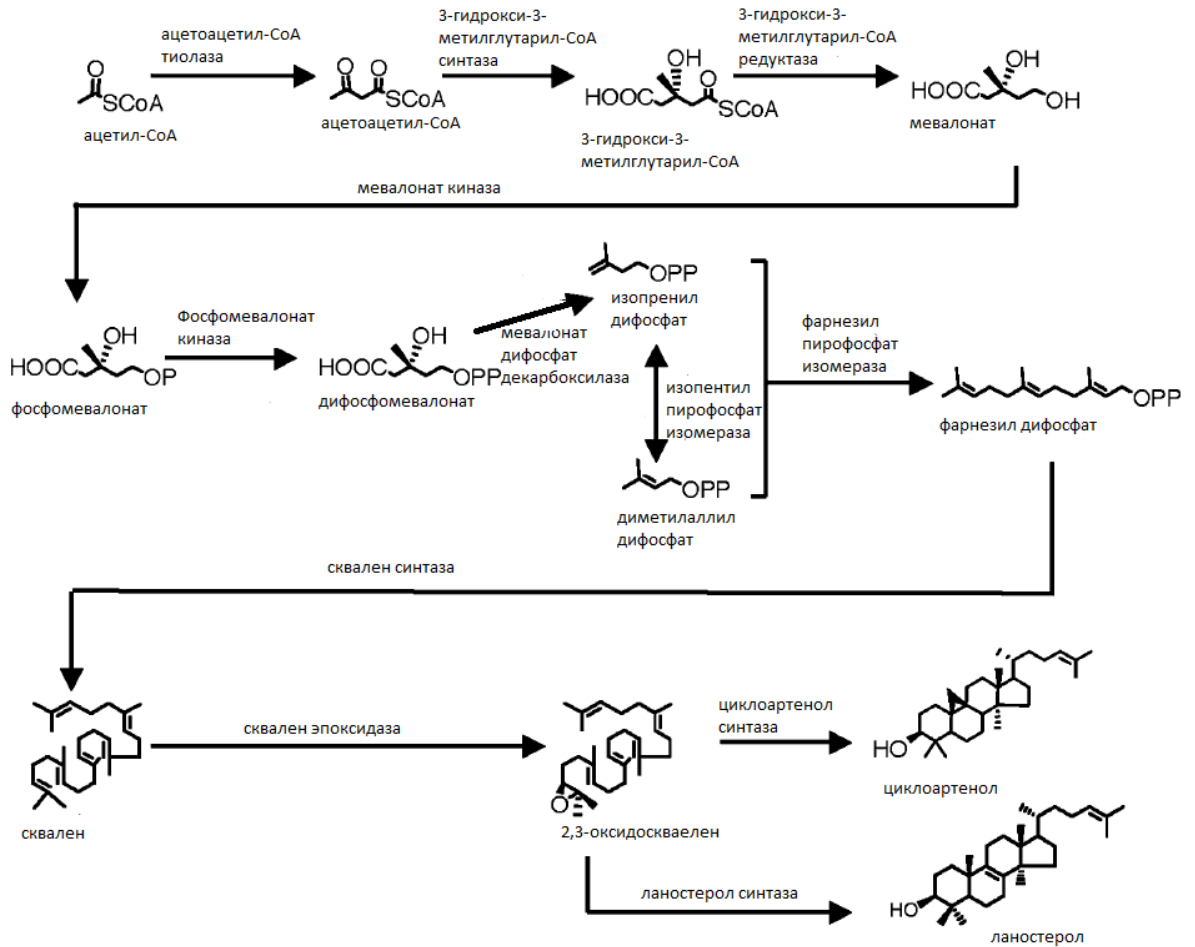


Рисунок 4 – Предполагаемый путь биосинтеза стерола в *Arabidopsis thaliana*. Стрелки обозначают 12 реакций, соответствующих превращению ацетил-CoA в мевалонат и далее в циклоартенол и ланостерол. Ферменты указаны над стрелками[139]

Дисметилстеролы образуются из циклоартенола путем C_{24} -метиляции с помощью ферментов стеролметилтрансферазы и циклопропилстереолизомеразы. Образующие в результате 4,4-диметил- и 4-монометилстеролы являются предшественниками растительных стеролов (Рисунок 5)[37].

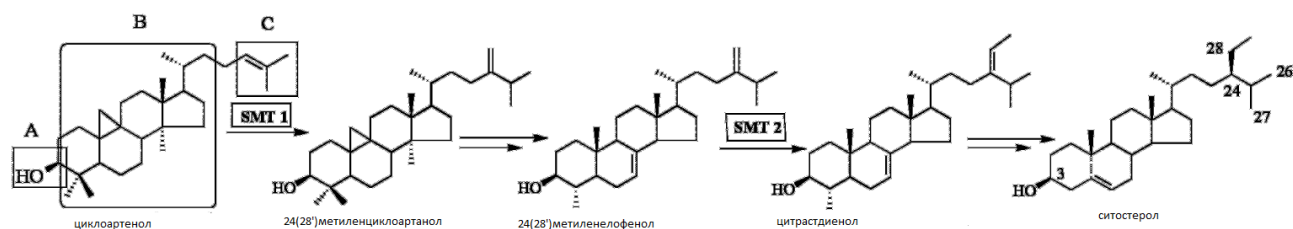


Рисунок 5 – Гипотетический путь превращения циклоартенола в ситостерол. SMT - стеролметилтрансфераза[105]

1.1.3 Растительные источники фитостеролов

Фитостеролы – это важные компоненты питания[163]. Наиболее богатыми источниками данного класса соединений являются растительные масла [156], зерновые [35, 36, 106, 116], овощи, семена [59, 127], орехи [149, 150]. Примерное содержание фитостеролов в продуктах питания [17, 24, 78] приведено в Таблице 1.

Таблица 1 – Содержание фитостеролов в некоторых свежих продуктах питания (мг/кг)

	Кампестерол (мг/кг)	Ситостерол (мг/кг)	Стигмастерол (мг/кг)	Суммарное содержание фитостеролов (мг/кг)
Овощи				
Брокколи	67-69	385-310	8-11	367-390
Брюссельская капуста	71-80	277-340	3-3,8	370-430
Цветная капуста	72-95	216-260	16-37	310-400
Авокадо	41	618	3	752

Продолжение Таблицы 1

Фрукты и ягоды				
Апельсины	30-34	170-200	9-10	228-240
Малина	9	233	Следовые количества	274
Бананы	13-15	84-120	13-18	116-161
Злаки				
Рожь	123-210	138-607	22-37	707-1134
Кукуруза	320	1200	210	1780
Гречневая крупя	200	1640	80	1980

Помимо этого, имеются данные по содержанию фитостеролов в лекарственных растениях множества семейств: Бобовых, Сложноцветных, Розоцветных и других. Фитостеролы обнаружены во всех органах лекарственных растений, как в надземных, так и подземных. В Таблице 2 представлены данные по количественному определению фитостеролов в некоторых видах ЛРС.

Таблица 2 – Содержание фитостеролов в некоторых видах лекарственного растительного сырья

№ п/п	Название растения	Сырье	Экстрагент	Метод	Результаты количественного определения, мг/г сырья	Ссылки
Бобовые						
1	<i>Robinia Pseudoacacia</i> L.	Листья	Этанол 95%	ГХ-МС	β-ситостерола 67,7 мг/г; кампестерола 25,2 мг/г, стигмастерола 22,7 мг/г .	[88]
2	<i>Dalbergia tonkinensis</i> Prain., <i>Dalbergia Mammosa</i> Pierre., <i>Dalbergia entadoides</i> Prain.	Семена	Петролейный эфир	ГХ-МС	β-ситостерола 165,5 – 1878 мг/г, стигмастерола 50,2 – 234,3 мг/г, кампестерола 29,6 – 266,3 мг/г, брассикастерола 7,6 – 38,4 мг/г (в пересчёте на масло, полученного из свежих семян).	[107]
Яснотковые						
3	<i>Ajuga genevensis</i> L. , <i>Ajuga reptans</i> L.	Трава	Хлороформ	ВЭЖХ-МС	β-ситостерола 109,23 мг/г, кампестерола 14,46 мг/г.	[142]
4	<i>Salvia haematodes</i> L.	Трава	Метанол, н-гексан.	ГХ-МС	β-ситостерола 0,26 мг/г, стигмастерола 0,61 мг/г (экстракция в аппарате Сокслета).	[144]

Продолжение Таблицы 2

Сложноцветные						
5	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Семена	Тербутиловый метиловый эфир	ГХ-МС	Суммарное количество стеролов 0,92 мг/г, β -ситостерола 0,4-0,5 мг/г, кампестерола 0,1мг/г, стигмастерола 0,15-0,2 мг/г.	[125]
6	<i>Artemisia apiacea</i> L.	Трава	Метанол	ВЭЖХ -ДМД, ВЭЖХ -МС	Кампестерола 19,5 мг/г, стигмастерола 4 мг/г, даукостерола 2 мг/г.	[81]
7	<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.	Корни	Этанол	спектр офотометрия	Сумма фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол 0,24мг/г.	[20]
Розоцветные						
8	<i>Leucosidea sericea</i> Eckl. & Zeyh	Листья и корни	метанол	ВЭЖХ -МС	Ветки: β -ситостерола 1,01 мг/г, стигмастерола 0,26 мг/г, кампестерола 0,088 мг/г, корни: β -ситостерола 0,37 мг/г, стигмастерола 0,13 мг/г.	[122]

Продолжение Таблицы 2

Зонтичные						
9	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	Стебли и корни	Метанол- муравьиная кислота (95:5)	ГХ-МС	В стеблях: β -ситостерола 1,01 мг/г, стигмастерол 0,26 мг/г, кампестерола 0,088 мг/г. В корнях: β -ситостерола 0,37 мг/г, стигмастерола 0,13 мг/г.	[162]
Паслёновые						
10	<i>Datura stramonium</i> L. <i>Datura metel</i> L. <i>Datura tatula</i> L. <i>Datura innoxia</i> L. <i>Hyoscyamus muticus</i> L. <i>Hyoscyamus niger</i> L.	Семена	Гексан	ГЖХ, ВЭЖХ	β -ситостерола 0,11 – 0,22 мг/г, стигмастерола 0,39 – 0,53 мг/г, кампестерола 0,0046 – 0,0066 мг/г.	[123]
11	<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil.	Плоды	этанол	ГХ-МС	β -ситостерола 0,43 мг/г, стигмастерола 0,15 мг/г.	[99]

Продолжение Таблицы 2

Лоховые						
12	<i>Hipporhae rhamnoides</i> L.	Масло семян	Отжим, CO ₂ – экстракция	ГХ-МС	Суммарное количество фитостеролов 8,79 – 16,4 мг/г в зависимости от типа экстракции (в пересчёте на полученное масло).	[83]

Также фитостеролы добавляют в промышленно переработанную пищу, такую как жировые спреды, заправка для салатов, масла, маргарины, кисломолочные продукты [97, 131] с целью увеличения их пищевой ценности [53, 92]. Включение таких продуктов в рацион рекомендовали людям, страдающим дислипидемией и атеросклерозом, что имело положительные для их здоровья результаты [9].

Фитостеролы и станола, содержащиеся в пище, всасываются в тонком кишечнике. Однако, абсорбируется лишь небольшая часть этих БАВ – 0,4-3,5% фитостеролов и 0,02-0,3% станолов [112]. Для сравнения, поглощение холестерина составляет 35-70%.

Мутации и полиморфизмы в генах ABCG5 и ABCG8 могут повлиять на кишечную абсорбцию фитостеролов и станолов, например, привести к фитостеролемии. Это редкое аутосомно-рецессивное расстройство приводит к накоплению фитостеролов, что повышает риск развития тяжелого атеросклероза в раннем возрасте [26, 86].

Из-за низкой усваиваемости, количество фитостеролов в плазме и тканях очень мало. Содержание фитостеролов в сыворотке крови составляет 0,3 – 1,7 мг/1000 л.

1.1.4 Фармакологические эффекты фитостеролов

Употребление продуктов, содержащих фитостеролы, положительно влияет на здоровье. Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) рекомендует употреблять 1,5-2,4 г фитостеролов и/или станолов в день для снижения уровня холестерина в крови. Также FDA подтверждает эффективность пищевых продуктов, содержащих эфиры фитостеролов, в снижении риска сердечно-сосудистых заболеваний. Рекомендации FDA – 1,3 г фитостеролов 2 раза в день. Употребление обогащенных фитостеролом продуктов питания несколько снижает уровень липофильных каротиноидов в крови, но длительное

употребление таких продуктов не сможет снизить уровень биологически активных каротиноидов [80].

1. Гипохолестеринемическая активность фитостеролов изучена ещё в 60х годах XX века [58]. В ходе недавних эпидемиологических исследований была показана обратная корреляция содержания холестерина в крови и потреблением растительных стеролов у жителей северной Норвегии [72]. Финскими авторами было доказано, что этерифицированные фитостеролы имеют большую биодоступность [4, 70, 158].

Предложены различные механизмы, объясняющие эффект снижения холестерина в сыворотке крови при употреблении фитостеролов. Во-первых, растительные стеролы и станолы могут вытеснять холестерин из смешанных мицелл, поскольку они более гидрофобны, чем холестерин [93]. Это замещение снижает концентрацию мицеллярного холестерина, что приводит к снижению всасывания холестерина [34]. Во-вторых, фитостеролы и станолы могут снизить скорость этерификации холестерина в энтероците, и, следовательно, количество холестерина, выделяемого через хиломикроны [33].

Также влияние фитостанолов на всасывание холестерина продолжается, по крайней мере, в течение нескольких часов после приема. Это может быть обусловлено тем, что фитостанолы регулируют экспрессию ABC-транспортеров в клетках кишечника, что может привести к увеличению выведения холестерина обратно в просвет кишечника [66, 118].

2. Болезнь Альцгеймера

Эффективность фитостеролов для предотвращения болезни Альцгеймера и деменции связывают с влиянием этих БАВ на липидный обмен. Избыток холестерина участвует в образовании бляшек из β -амилоида в мозге, что характерно для нейродегенеративных заболеваний [30]. Профилактическим и лечебным эффектом в наибольшей степени обладал стигмастерол в опытах на лабораторных животных [113, 136]. Активность фитостеролов, полученных из растения *Polygonum hydropiper* L., проверяли *in vitro* и *in vivo*. В ходе испытания *in vitro* доказана антихолинэстеразная и антиоксидантная активность.

Фитостеролы в достаточной мере проникают в мозг и могут быть потенциальным лекарствами при болезни Альцгеймера [22].

3. Противораковая активность

В последние годы все больше исследований направлены на изучение противораковых свойств фитостеролов [153]. Сообщается о способности ингибировать выработку канцерогенов [87, 148], рост раковых клеток [21], их инвазию и образование метастазов, вызывать апоптоз раковых клеток. Исследования показывают, что употребление фитостеролов способствуют профилактике и лечению рака легких [95], желудка [131], яичников [91], эстрогензависимого рака груди [54, 67] и др [18, 28, 65].

4. β -ситостерол, входящий в состав экстракта плодов пальмы Сереноа или пальмы ползучей (*Serenoa repens* Hook.F.), оказывает положительное влияние на течение болезни доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Данное явление было показано как на лабораторных животных [138], так и в ходе клинических исследований [135]. Данный эффект связывают с антиандрогенным, проапоптотическим и противовоспалительным механизмами действия фитостеролов и других компонентов, входящих в состав экстракта [77].

5. Имеются данные об антидиабетическом действии фитостеролов. Употребление фитостеролов улучшало состояние тканей печени крыс, больных диабетом [52]. Также исследования *in-vitro* указывают на возможную способность стигмастерола ингибировать пищеварительный фермент α -амилазу [14].

Различными авторами проводились *in vitro* и *in vivo* исследования, доказывающие ангиогенный [69], противовоспалительный [55], анальгетический [159], иммуномодулирующий [79, 161] эффекты.

1.2 Методы экстракции фитостеролов из лекарственного растительного сырья

Существует широкий спектр методов экстракции биологически активных соединений из ЛРС. Выбор метода и экстрагента зависит от химической природы

целевого продукта и особенностей сырья. Предпочтение отдают методам, в ходе которых используют нетоксичные растворители. К традиционным методам экстракции относят мацерацию и извлечение в аппарате Сокслета [134]. Также существуют модифицированные методы экстракции, позволяющие снизить количество экстрагента и повысить выход биологически активных соединений: микроволновая [46], ферментативная [128], ультразвуковая экстракция [32], экстрагирование под действием импульсного электрического поля [76], экстракция жидкостью под давлением [94] и сверхкритическая флюидная экстракция [64, 114].

Фитостеролы из ЛРС извлекают метанолом, этанолом [64], гексаном [29], хлороформом [74], этилацетатом, ацетоном [96], петролейным эфиром [27], дихлорметаном [13], метиленхлоридом. В связи с высокой липофильностью ($\log P = 9,3$), использование водно-спиртовых растворов для экстракции не оправдано.

Согласно Европейской Фармакопее, для стандартизации ЛРС по содержанию фитостеролов, извлечение проводят метиленхлоридом [40].

Экстракция в аппарате Сокслета

Экстракция в аппарате Сокслета была разработана для извлечения липидной фракции из ЛРС [74]. Этот метод сопряжен с нагреванием и использованием таких органических растворителей, как н-гексан, петролейный эфир, этанол и метиленхлорид. Процесс экстракции занимает длительное время и требует большого количества органических экстрагентов, которые могут быть опасны для здоровья и окружающей среды [104, 121].

Мацерация

Мацерация – это простой и недорогой метод извлечения биологически активных веществ из ЛРС [161]. Его применяют как в экспериментальных, так и для промышленных целей. Измельченное сырье заливают подходящим

растворителем и оставляют в закрытом сосуде при комнатной температуре. Экстракция считается завершенной, когда концентрация БАВ в ЛРС и в растворе уравнивается. Процесс может продолжаться в течение нескольких часов или суток. Перемешивание может ускорить экстракцию. Дробная мацерация способствует более полному извлечению биологически активных веществ из сырья. После экстракции жидкость отделяют от растительного материала (жома), извлечение фильтруют или центрифугируют для удаления механических примесей.

Однако данный метод экстракции обладает некоторыми ограничениями – это продолжительность процесса, необходимость использования растворителей высокой чистоты в больших количествах, низкая селективность экстракции, невозможность использования нагрева, поскольку термочувствительные вещества могут быть подвергнуты деструкции. Для преодоления данных ограничений разработан ряд методов экстракции. Наибольший интерес представляют микроволновая экстракция, ферментативная экстракция, ультразвуковая экстракция, экстрагирование под действием импульсного электрического поля, гидротропная экстракция, экстракция жидкостью под давлением и сверхкритическая флюидная экстракция. Сверхкритическая флюидная экстракция, экстракция жидкостью под давлением, ферментативная экстракция и микроволновая экстракция [42] как правило используются для извлечения стеролов из растительных источников [145].

Ферментативная экстракция основана на способности ряда ферментов – целлюлазы, гемицеллюлазы, α -амилазы и пектиназы, разрушать клеточную стенку растений и таким образом оптимизировать высвобождение биологически активных веществ. Этот метод был представлен для более эффективной водной экстракции и холодного отжима масел [103].

Ультразвуковая экстракция. В ходе данного метода для улучшения извлечения БАВ из ЛРС используют ультразвуковые волны частотой от 20КГц до 100МГц. Поскольку под действием ультразвука в растворе образуются и

схлопываются пузырьки-кавитации, это способствует разрушению клеточных стенок растений [89, 145].

Экстрагирование под действием импульсного электрического поля признано перспективным в пищевой промышленности. Под действием импульсного поля, которое используется в данном методе экстракции, происходит открытие клеточных пор, что облегчает выход содержимого клеток [101, 117].

Экстракция жидкостью под давлением или экстракция субкритическим растворителем заключается в извлечении БАВ из ЛРС экстрагентом под высоким давлением (от 4 до 20 мПа) и при повышенной температуре [130].

Сверхкритическая флюидная экстракция. Сверхкритический флюид – это состояние субстанции при критической температуре и давлении [43]. Он имеет свойства и жидкости, и газа. Чаще всего экстракцию фитостеролов осуществляют сверхкритическим флюидом диоксида углерода CO₂ [63, 138, 145].

1.3 Методы анализа фитостеролов

Поскольку фитостеролы существуют как в свободном виде, так и в виде сложных эфиров, стерилгликозидов и ацетилированных стерилгликозидов, это необходимо учитывать на стадии пробоподготовки [37]. Извлечения, полученные с использованием различных способов экстракции, анализируют разнообразными хроматографическими методами, такими как газовая хроматография [82], колоночная хроматография [119], высокоэффективная жидкостная хроматография [68] и капиллярная электрохроматография [19]. Для предварительного качественного и количественного анализа используют тонкослойную хроматографию [155].

В настоящее время для определения фитостеролов наиболее часто используют газовую и высокоэффективную жидкостную хроматографию. Определение методом ВЭЖХ возможно при давлении ниже 40 мПа. Также существует метод сверхэффективной жидкостной хроматографии, которая

проводится при давлении до 100 мПа [31]. Детектирование фитостеролов можно проводить с помощью пламенно-ионизационного детектора [126], ядерно-магнитного резонанса [154], ИК-спектрометрии [85], УФ-спектрометрии [84], испарительной нефелометрической детекции [133] и масс-спектрометрии [50].

Индивидуальные фитостеролы анализируют с применением нескольких последовательных шагов: экстракция липидов, омыление и/или кислотный гидролиз, окончательная очистка и количественное определение. Различные хроматографические методы требуют предварительного омыления экстракта перед анализом фитостеролов.

1.3.1 Пробоподготовка извлечений из лекарственного растительного сырья перед количественным определением

Омыление обычно позволяет получить концентрированную фракцию фитостеролов, что упрощает анализ суммарного содержания и индивидуальных соединений. В растительных экстрактах фитостеролы могут быть представлены как в свободном виде, так и в виде сложных эфиров и гликозидов. В ходе омыления сложноэфирные связи будут разрушаться, гликозидные же устойчивы при действии щелочи. Сочетание щелочного и кислотного гидролиза даёт более полную картину количественного содержания фитостеролов в экстракте [39].

Омыление проводят кипячением с раствором калия гидроксида в спирте. Неомыляемую фракцию многократно извлекают диэтиловым эфиром, петролейным эфиром или гексаном с дальнейшим выпариванием при низких температурах.

Также возможна очистка фитостеролов методом препаративной колоночной хроматографии.

Перед омылением к экстракту добавляют внутренние стандарты (бетулин, холестан и др.), чтобы уменьшить аналитическую ошибку, поскольку в ходе омыления и очистки некоторое количество целевых веществ может быть утеряно.

1.3.2 Качественный анализ фитостеролов

Для идентификации фитостеролов использую качественные реакции и ТСХ-анализ.

Качественные реакции

Реакция Салковски.

К раствору ситостерола в хлороформе добавляют несколько капель кислоты серной концентрированной. Верхний хлороформный слой окрашивался в красноватый цвет [41].

Реакция Либермана-Бурхарда.

Несколько кристаллов ситостерола растворяют в хлороформе и добавляют несколько капель уксусного ангидрида и кислоты серной концентрированной. Хлороформный слой окрашивается сначала в фиолетово-синий, а затем в зеленый цвет [49]. Данная реакция также может лежать в основе фотоэлектроколориметрического определения стеролов [12].

Тонкослойная хроматография

Качественный анализ также возможен методом тонкослойной хроматографии [155]. Для разделения извлечения подбирают сочетание таких растворителей, как н-гексан, этилацетат, толуол с добавлением небольшого количества уксусной или муравьиной кислоты [146]. В качестве детектора пластинку опрыскивают серноокислым раствором ванилина [7] или анисового альдегида с последующим нагреванием до 100-105°C – пятна окрашиваются в пурпурный цвет[6]. Другой вариант детекции – спиртовой раствор кислоты серной концентрированной, пятна окрашиваются в красный цвет и флуоресцируют в УФ-свете при длине волны 254 нм [120].

Также возможно полуколичественное определение фитостеролов методом денситометрии. Экстракт разделяют методом тонкослойной хроматографии, детектируют пятна биологически активных веществ, а затем проводят

количественное определение с помощью денситометра и соответствующего программного обеспечения. Количество фитостеролов оценивают, исходя из площади пика стандарта [14].

1.3.3 Количественный анализ фитостеролов, извлеченных из лекарственного растительного сырья

Для количественного определения фитостеролов разработан широкий спектр хроматографических методик.

Газовая хроматография (ГХ)

Газовая хроматография – это наиболее часто и широко используемый метод для определения стеролов. Наличие капиллярной колонки имеет потенциальное преимущество [56], поскольку уменьшается время анализа, улучшается разделение пиков компонентов и предполагает более высокую термостабильность по сравнению с наполненной колонкой. Для большинства фитостеролов разработаны методики определения методом ГХ с неполярной неподвижной фазой. Неподвижная фаза в большинстве случаев содержит поперечно-сшитые молекулы полисилоксаны [73]. Было показано, что неподвижная фаза с низкой полярностью, содержащая 5% дифенил- и 95% диметилполисилоксан, обладает высокой термоустойчивостью и обеспечивает лучшее разделение пиков индивидуальных фитостеролов. Перед анализом полученные экстракцией фитостеролы подвергают дериватизации с триметилсилилом [143]. Без дериватизации сложно улучшить форму пиков и разделение индивидуальных фитостеролов и фитостанолов. В качестве дериватизирующих агентов обычно используют N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид в безводном пиридине и бис-(триметилсилил)-трифторацетамид с 1% триметилхлоросиланом [98]. Также для дериватизации используют гексаметилдисилазан с безводным пиридином и триметилхлоросилан [10]. Рутинный анализ фитостеролов проводят методом ГХ с

пламенно-ионизационным детектором, определяя время удерживания [160]. ГХ-МС используют для идентификации пиков, соответствующих индивидуальным фитостеролам и оценки их количества [48, 50].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Жидкостная хроматография, в особенности ВЭЖХ, имеет некоторые преимущества перед ГХ. ВЭЖХ проводят при низких температурах колонки и есть возможность анализировать и собирать очищенные формы фитостеролов, поскольку они не разрушаются в процессе хроматографирования. ВЭЖХ используют для оценки фитостеролов как в аналитических целях, так и в ходе пробоподготовки. ВЭЖХ наилучшим образом подходит для анализа термочувствительных фитостеролов. Если в простой форме присутствуют липиды, то фитостеролы можно определить напрямую методом ВЭЖХ без потери образца. Нормофазную ВЭЖХ используют для разделения и количественной оценки пяти основных классов фитостеролов (сложных эфиров стеролов, свободных стеролов, стерилгликозидов, ацилированных стерилгликозидов и стерилферуллатов). Обращеннофазная ВЭЖХ с добавлением к воде нелетучих полярных органических растворителей обеспечивает быструю установку равновесия между привитым силикагелем неподвижной фазы и растворителями подвижной фазы, по сравнению с нормафазной ВЭЖХ. Для анализа фитостеролов широко используют колонки с октадецилсиликагелем (C_{18}). Для отделения фитостеролов методом ВЭЖХ используют различные органические растворители, например, ацетонитрил, метанол, изопропанол, тетрагидрофуран и уксусная кислота. Для детектирования фитостеролов используют УФ-спектроскопию в диапазоне от 200 до 210 нм [110], испарительный детектор светорассеяния [151], рефрактометрическое детектирование и масс-спектрометрию [140].

Анализ методом ВЭЖХ – ЯМР

Метод ВЭЖХ – ЯМР используют для анализа фитостеролов в растительных экстрактах, полученных с помощью сверхкритического CO₂. Чувствительный к структуре детектор, такой как ¹H-ЯМР, может компенсировать отсутствие стандартного образца. Для большинства свободных фитостеролов методом ¹H-ЯМР были обнаружены схожие сигналы – «отпечатки пальцев» [75]. Конъюгаты фитостеролов показывают похожие сигналы – «отпечатки пальцев» и дополнительные сигналы, соответствующие заместителям у C-3. Для анализа фитостеролов методом ЯМР-ВЭЖХ в качестве подвижной фазы используют дейтерированный хлороформ и ацетонитрил [129].

Анализ методом ВЭЖХ-МС

Для анализа фитостеролов также используют метод ВЭЖХ-МС. Причем для анализа фитостеролов из натуральных источников был использован метод химической ионизации при атмосферном давлении в сочетании с жидкостной хроматографией с масс-детекцией. Поскольку фитостеролы высоко липофильны, но имеют полярные функциональные группы, их сложно ионизировать с помощью метода электроспрей. Результативными альтернативными методами ионизации липофильных соединений являются методы электронной ионизации и фотоионизации при атмосферном давлении [50, 157].

Анализ методом капиллярной жидкостной хроматографии

Возросло значение использования капиллярной жидкостной хроматографии и нано-жидкостной хроматографии в аналитической области. Анализ фитостеролов также проводят методом сверхкритической флюидной хроматографии, где в качестве подвижной фазы используют сверхкритический CO₂. Сверхкритическая флюидная экстракция в сочетании со сверхкритической

флюидной хроматографией имеет преимущество одной операции, включающей экстракцию, предварительную концентрацию, фракционирование и количественное определение фитостеролов [56, 145].

Также возможно гравиметрическое определение полученных фитостеролов методом экстракции и колоночной очистки с последующим подтверждением структуры с помощью ЯМР-спектроскопии [129].

Спектрофотометрическое определение

С помощью метода спектрофотометрии в УФ-области можно определить суммарное содержание стеролов в растительном экстракте[5]. К упаренному на $\frac{3}{4}$ от объема спиртовому экстракту прибавляют хлороформ, кислоту серную концентрированную и ангидрид уксусный (реакция Либермана-Бурхарда). Измеряют интенсивность поглощения полученного продукта при длине волны около 625 нм. Концентрацию определяют, используя метод калибровочного графика [8, 109].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Фитостеролы – природные высокомолекулярные соединения из группы тритерпеноидов тетрациклического строения, имеют структурное сходство с животным холестерином. Насчитывается более 250 различных фитостеролов. Наиболее распространённые – β -ситостерол, кампестерол, стигмастерол.
2. Фитостеролы содержатся как в лекарственных растениях, так и в продуктах питания (растительных маслах, орехах, овощах, ягодах, фруктах, злаках).
3. Фитостеролы применяют в качестве гипохолестеринемического средства. Помимо этого, препараты, содержащие фитостеролы, используют для лечения доброкачественной гиперплазии простаты. Имеются сведения о противораковой, ангиогенной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, противодиабетической активности фитостеролов.

4. Существует ряд методов, которые используют для экстракции фитостеролов: мацерация, извлечение в аппарате Сокслета, микроволновая, ферментивная, ультразвуковая экстракции и другие. Фитостеролы наилучшим образом экстрагируются с помощью неполярных растворителей: гексаном, этилацетатом, петролейным эфиром, а также спиртами.
5. Для качественного анализа фитостеролов используют тонкослойную хроматографию и качественные реакции.
6. Количественное определение фитостеролов проводят методами хроматографии (ГХ, ВЭЖХ), спектрофотометрии. Наиболее специфичным и точным методом анализа фитостеролов является ГХ-МС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлось лекарственное растительное сырье растений семейства бобовые (*Fabaceae*) и яснотковые (*Lamiaceae*), качество которого регламентируется Государственной Фармакопеей РФ XIV изд. (ГФ XIV)[1]:

- Солодки корни (*Glycyrrhizae radices*),
- Донника трава (*Meliloti herba*),
- Стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*),
- Сенны листья (*Sennae folia*),
- Термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*),
- Софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*),
- Шалфея лекарственного листья (*Salviae officinalis folia*), сем. *Lamiaceae*.

Данные по ЛРС представлены в Таблице 3.

Также для исследования использовали сырье растений семейства бобовые (*Fabaceae*), качество которого регламентируется зарубежными фармакопеями или лекарственные свойства которого описаны в литературных источниках:

- Трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.),
- Трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.),
- Листья солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.),
- Плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.),
- Трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.).

Данные по ЛРС представлены в Таблице 4.

Таблица 3 – Лекарственное растительное сырье, качество которого регламентируется ГФ

Сырье	Производящее растение	Основная группа БАВ	Ссылки	Лекарственные препараты (согласно ГРЛС) [2]
Солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	Солодка голая – <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. и солодка уральская <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	Согласно ГФ, Фармакопее США, Фармакопее Японии, стандартизация по содержанию глицирризиновой кислоты. Согласно Европейской Фармакопее, Британской Фармакопее, Индийской Фармакопее, стандартизация по содержанию 18β-глицирризиновой кислоты.	[1, 40, 61, 137, 141]	Экстракт сухой и экстракт густой.
Донника трава (<i>Meliloti herba</i>)	Донника лекарственный – <i>Melilotus officinalis</i> (L.) Desr. и донник рослый – <i>Melilotus altissimus</i> Thuil.	Согласно ГФ, стандартизация по содержанию кумаринов. Согласно Европейской Фармакопее, Британской Фармакопее стандартизация по содержанию кумарина.	[1, 40, 141]	Сырье в пачках

Продолжение Таблицы 3

Стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	Стальник полевой (пашенный) – <i>Ononis arvensis</i> L.	Согласно ГФ, стандартизация по сумме изофлавоноидов в пересчете на ононин.	[1]	-
Сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	Кассия остролистная (сенна) – <i>Cassia acutifolia</i> Del. (<i>C. senna</i> L.) и кассия узколистная – <i>Cassia angustifolia</i> Vahl.	Согласно ГФ, стандартизация по сумме агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту. Согласно Европейской Фармакопее, стандартизация по сумме гликозидов гидроксиантрацена ряда в пересчете на сеннозид В. Согласно Индийской Фармакопее, стандартизация по сумме сеннозидов в пересчёте на сеннозид кальция. Согласно Фармакопее США, стандартизация по содержанию сеннозидов. Согласно Фармакопее Японии, стандартизация по содержанию сеннозидов А и Б.	[1, 40]	Сухой экстракт

Продолжение Таблицы 3

Термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsisidis lanceolatae herba</i>)	Термопсис ланцетный – <i>Thermopsis lanceolata</i> R. Br.	Согласно ГФ, стандартизация по сумме алколоидов в пересчёте на термопсин.	[1]	Экстракт жидкий и экстракт сухой
Бутоны софоры японской (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	Софора японская – <i>Sophora japonica</i> L.	Согласно ВФС 42-341-74 стандартизация по сумме флавоноидов в пересчёте на рутин. Согласно Европейской Фармакопее, стандартизация по содержанию рутина. Согласно Британской Фармакопее, стандартизация по сумме флавоноидов в пересчёте на рутозид.	[3, 40, 141]	-
Шалфея лекарственног о листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	Шалфей лекарственный (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Согласно ГФ, стандартизация по содержанию эфирного масла, дубильных веществ в пересчёте на танин, экстрактивных веществ, извлекаемых 50% спиртом. Согласно Европейской Фармакопее, Британской Фармакопее, стандартизация по содержанию эфирного масла.	[1, 40, 141]	Экстракт сухой

Таблица 4 – Лекарственное растительное сырье, качество которого не регламентируется ГФ

Сырье	Производящее растение	Основная группа БАВ	Ссылки
Трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	Клевер луговой (<i>Trifolium pratense</i> L.)	Согласно Фармакопее США, стандартизация по содержанию изофлавонов биоханина А, генистеина, даидзеина и формонетина	[38, 102, 164]
Трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	Козлятник восточный (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	Флавоноиды, аскорбиновая кислота, полифенольные соединения.	[23, 147]
Листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	Солодки уральская (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	Стильбены, флавоноиды	[44]
Плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	Люпин многолистный (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	Белки, жиры, фенольные соединения, изофлавоны, алколоиды.	[15, 108, 146]
Трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	Чина луговая (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	Флавоноиды, токоферол, органические кислоты.	[60, 124]

Идентификацию растений и сырья проводили с использованием Государственной Фармакопеи РФ [1], Европейской Фармакопеи [40] и определителей растений [148].

Сырье было приобретено в аптечных сетях г. Москвы:

- Солодки корни (ФармаЦвет («Красногорсклексредства»),
- Сенны листья (ФармаЦвет («Красногорсклексредства»),
- Стальника лугового корни («Русские корни»),
- Софоры японской бутоны (СОиК),
- Клевера лугового трава («Русские корни»)
- Шалфея лекарственного листья (Красногорсклексредства)

и заготовлено самостоятельно от растений, произрастающих на территории Ботанического сада ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (солодки уральской трава, термопсиса ланцетного трава, козлятника восточного трава, донника лекарственного трава) и в Подмосковье (Чины трава и Люпина многолистного плоды). Травы собирали в период цветения и плодоношения, плоды – в период плодоношения.

Сырье, заготовленное самостоятельно, засушивали воздушно-теневым способом.

Влажность сырья определяли согласно ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Высушенное сырье измельчали до размера частиц 1-5 мм.

2.2 Методы исследования

Извлечение из ЛРС содержит не только целевой продукт, но и широкий спектр других биологических активных веществ (БАВ). Для идентификации и количественного анализа одного из компонентов необходимо предварительное разделение смеси БАВ, исходя из их свойств. Поэтому необходимо разработать

методику пробоподготовки или использовать методы, включающие в себя разделение компонентов. Хроматографические методы позволяют проводить разделение, идентификацию и количественное определение компонентов извлечений из ЛРС. Спектрофотометрическое определение позволяет определить сумму биологически активных веществ, кроме того, он более доступен.

Для анализа фитостеролов использовали такие методы, как:

- ТСХ
- ГХ-МС
- Спектрофотометрия

2.2.1 Качественный анализ фитостеролов методом ТСХ

Метод тонкослойной хроматографии рекомендован для контроля качества лекарственного растительного сырья как Государственной Фармакопеей XIV [1], так и Европейской Фармакопеей [40]. Данный метод имеет высокую точность и селективность, а также он дешев, доступен.

Для тонкослойной хроматографии использовали растворители и реагенты аналитической чистоты:

- Этилацетат, Химмед, Россия;
- Гексан, 95%, Купавнахимреактив, Россия;
- Хлороформ Химмед, Россия;
- Ванилин Acros Organics, Бельгия, CAS N 121-33-5;
- Кислота серная, Сигма Тек, Россия;
- Стандарт β -ситостерола Fluka, Швеция, CAS N 83-46-5.

Растворы готовили согласно методикам, указанным в ГФ XIV [1] и Европейской Фармакопее (8 изд.) [40].

Стандартный раствор β -ситостерола (1мг/мл)

Точную навеску 10 мг β -ситостерола помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 2 мл хлороформа, доводили раствор до метки 95% спиртом. Раствор хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Раствор ванилина сернокислого 1%

1,0 г ванилина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили спиртом этиловым 96% до метки, затем добавляли по каплям 2 мл кислоты концентрированной. Срок годности 48 часов. Бесцветный раствор хранили в холодильнике (в случае появления окрашивания раствор необходимо заменить на свежий).

Раствор кислоты серной спиртовой 10%

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 5,5 мл серной кислоты концентрированной прибавляли к 60 мл спирта 96%, охлаждали и доводили объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Определение фитостеролов проводили согласно ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография». [147]

Для ТСХ анализа использовали:

- пластинки для тонкослойной хроматографии Kiesergel 60 F254 20x20 cm, MERCK, Дармштадт, Германия,
- хроматографические камеры вертикального элюирования Сорбфил, Россия,
- шприц для нанесения проб Хроматэк, Россия,
- пульверизатор для опрыскивания пластинок детектором Сорбфил, Россия,
- пластинки рассматривали в УФ-свете с помощью денситометра Сорбфил, Россия.

2.2.2 Спектрофотометрия в видимой области спектра

Количественное определение суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол проводили с использованием спектрофотометра Agilent Cary 100 UV-Vis, кювет с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Анализ спектров поглощения, построение калибровочной прямой и количественное определение проводили с помощью пакета программ Cary WinUV.

Помимо этого, для проведения анализа использовали растворы стандарта β -ситостерола (Fluka, Швеция), ванилина (Acros Organics, Бельгия), приготовленные как описано в п. 2.3.1, кислоту серную концентрированную (Сигма Тек, Россия), гексан (Купавнахимреактив, Россия), кислоту ледяную уксусную 99,5% (PanReac Applichem, Испания). Растворы нагревали на водяной бане Stegler WB.

2.2.3 Количественный анализ методом ГХ-МС

За последние десятилетия произошло активное развитие хроматографических методов. Метод газовой хроматографии с масс-детекцией является точным и надежным для количественной оценки фитостеролов в извлечениях из растительного сырья.

Хроматографическое разделение и МС-детектирование проводили с использованием приборов:

- газовый хроматограф фирмы 7820A Agilent Technologies, США,
- колонка HP-5MS, 30м×0,25мм×0,25мкм
- масс-селективный детектор 5977 с квадрупольным масс-анализатором
- автодозатор модели G4513.

Пробоподготовка

- ультрацентрифуга Eppendorf 5427 (Германия)

Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение ChemStationE 02.00. Идентификацию фитостеролов проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-14.

2.3 Изучение стабильности

Для изучения стабильности фитостеролов в спиртовых извлечениях исследуемые образцы помещали в герметично закупоренные флаконы объемом 15 мл. Флаконы хранили в термостате ТС 1/20 СПУ (Россия) при температуре 20°C. Контроль таких параметров, как содержание фитостеролов, спирта, органолептические свойства, сухой остаток проводили в трех временных точках: исходное, через 3 месяца и 6 месяцев хранения.

2.4 Определение содержания спирта этилового

Для количественного определения этанола в спиртовых извлечениях методом газовой хроматографии использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 7890A, оснащенный пламенно-ионизационным детектором.

Условия хроматографирования:

Газ-носитель – гелий.

Колонка: Supelcowax длиной 60 м, внутренним диаметром 530 мкм, толщина пленки фазы 1 мкм.

Объем ввода 2 мкл.

Температурный режим: 78°C – 2 мин., подъем до 110°C по 3°C/мин., 110°C – 2 мин., подъем до 220°C по 30°C/мин., 220°C – 10 мин.

Режим постоянной скорости потока – 2,8 мл/мин.

Режим деления потока в инжекторе - 40:1.

Приготовление стандартного образца и расчет коэффициента k

К навеске раствора этанола с известной концентрацией 200 мг (здесь и далее ± 10 мг, навеска с точностью до 0,1 мг) добавляли 9,9 г воды дистиллированной (раствор 1), перемешивали. К 200 мг раствора 1 добавляли 100 мг раствора бутанола (внутренний стандарт, 0,8% раствор), добавляли 9,8 г воды

дистиллированной, перемешивали (раствор 2). Отбирали 1 мл полученного раствора, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 7 минут. Отбирали 800 мкл надосадочной жидкости в виалу для анализа методом ГЖХ. Расчет коэффициента k проводили по формуле:

$$k = \frac{S_{\text{этанол}} \cdot \omega_{\text{бутанол}}}{S_{\text{бутанол}} \cdot \omega_{\text{этанол}}}$$

где:

$S_{\text{этанол}}$ – площадь пика этанола при анализе стандартного образца;

$S_{\text{бутанол}}$ – площадь пика бутанола при анализе стандартного образца;

$\omega_{\text{этанол}}$ – массовая доля этанола в растворе 2, %.

$\omega_{\text{бутанол}}$ – массовая доля бутанола в растворе 2, %.

Приготовление испытуемого образца

К навеске образца 200 мг добавляли 9,9 г воды дистиллированной (раствор 1), перемешивали. К 200 мг раствора 1 добавляли 100 мг раствора бутанола (внутренний стандарт, 0,8% раствор), добавляли 9,8 г воды дистиллированной, перемешивали (раствор 2). Отбирали 1 мл полученного раствора, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 7 минут. Отбирали 800 мкл раствора в виалу для анализа методом ГЖХ. Расчет массовой доли спирта в образце проводили по формуле:

$$\omega = \frac{S_{\text{этанол}} \cdot \omega_{\text{бутанол}} \cdot m_{\text{раств.2}} \cdot m_{\text{раств.1}}}{S_{\text{бутанол}} \cdot k \cdot m_{\text{аликвоты раств.1}} \cdot m_{\text{нав.}}}$$

где:

$S_{\text{этанол}}$ – площадь пика этанола;

$S_{\text{бутанол}}$ – площадь пика бутанола;

$\omega_{\text{бутанол}}$ – массовая доля бутанола в растворе 2, %.

$m_{\text{раств.1}}$ – масса раствора 1, г;

$m_{\text{раств.2}}$ – масса раствора 2, г;

k – коэффициент определяемый по формуле 1;

$m_{\text{аликвоты раств.1}}$ – масса раствора 1, отобранная для приготовления раствора 2, г;

$m_{\text{нав.}}$ – масса навески образца, г.

Каждое определение проводили пятикратно.

2.5 Определение сухого остатка

Для определения сухого остатка использовали сушильный шкаф СПУ ШС-80-01, силикагель индикаторный (ГОСТ 8984-75).

Методика: сухой остаток определяли, выпаривая 5,0 мл спиртового извлечения на водяной бане досуха в предварительно высушенной и точно взвешенной фарфоровой чашке. Затем чашки сушили в сушильном шкафу в течение 3 часов при температуре 100-102°, охлаждали в эксикаторе над безводным силикагелем в течение 3 минут и взвешивали. Содержание сухого остатка (%) рассчитывали по формуле:

$$X(\%) = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{5}$$

где:

m_1 – масса чашки, г;

m_2 – масса чашки с сухим остатком, г;

5 – объем спиртового извлечения, мл.

2.6 Определение антиамилазной активности спиртовых извлечений и β -ситостерола

Реактивы:

- Амилаза производства Алфалад (не менее 2000 ед/мл),
- фиксоналы для приготовления фосфатного буфера, рН = 6,86 (Metroholm),
- крахмал растворимый (Ленреактив),
- вода дистиллированная,
- динитросалициловая кислота (PanReac),
- натрия гидроксид ХЧ (Химмед),

- натрия, калия тартрат ХЧ (Химмед).

1% раствор реактива динитросалициловой кислоты (ДНС-реактив) готовили согласно методике ГОСТ 31662-2012:

10,0 г динитросалициловой кислоты (ДНС) добавляли к 400 мл дистиллированной воды и перемешивали, добавляя 150 мл 10,7% раствора натрия гидроксида и 300 г виннокислого калия-натрия.

Раствор крахмала готовили, основываясь на методике ГОСТ Р 54330-2011.

1,0 г или 0,5 г крахмала помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 30 мл дистиллированной воды и перемешивали. Помещали колбу на кипящую водяную баню и нагревали в течение 10 мин при перемешивании. После охлаждения содержимого колбы к нему добавляли 10 мл фосфатного буферного раствора 6,86, объем жидкости доводили водой очищенной до метки при температуре 20°. Для полученного раствора была характерна легкая опалесценция. Раствор хранили при 4°C в течение 2 дней.

Растворы инкубировали в термостате ТС – 1/20, спектрофотометрическое определение проводили на спектрофотометре Agilent Cary 100 UV-Vis.

2.7 Статистическая обработка результатов и валидация

Статистическую обработку результатов анализа количественного содержания фитостеролов проводили согласно требованиям ГФ XIV, ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического опыта» [1], с помощью программы Microsoft Excel.

Валидацию аналитической методики количественного определения фитостеролов в спиртовых извлечениях проводили согласно требованиям ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [1]. Оценивали такие параметры, как линейность, прецизионность, правильность, специфичность, предел количественного определения.

ГЛАВА 3. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФИТОСТЕРОЛОВ

3.1 Извлечение фитостеролов из лекарственного растительного сырья

Подбор экстрагента проводили, исходя из свойств фитостеролов. Поскольку данный класс соединений обладает высокой липофильностью, для их извлечения используют органические растворители: гексан, этилацетат, хлороформ, метилхлорид, петролейный эфир, метанол и этанол. Этанол был выбран нами, т.к. он не характеризуется высокой токсичностью и менее летуч, чем другие растворители.

Выбор концентрации спирта был обоснован экспериментально. Для этого экстракцию биологически активных веществ из ЛРС проводили 40%, 70% и 95% спиртом. Извлечения из сырья шалфея лекарственного листа (*Salviae officinalis folia*) готовили методом противоточной периодической экстракции пятикратно и проводили качественное определение фитостеролов в полученных извлечениях методом тонкослойной хроматографии. Использовали следующие условия хроматографирования: подвижная фаза – смесь гексан : этилацетат (3:1), в качестве детектора использовали сернокислый раствор ванилина с последующим нагреванием до 100-102°C, наличие фитостеролов устанавливали по наличию пятна, Rf которого совпадал с Rf пятна раствора стандартного образца β -ситостерола. В Таблице 5 приведены результаты качественной оценки фитостеролов в спиртовых извлечениях.

Таблица – 5 Идентификация фитостеролов в листьях шалфея лекарственного с использованием различных экстрагентов (n=5)

Экстрагент	Идентификация фитостеролов методом тонкослойной хроматографии
40% этиловый спирт	не обнаружены
70% этиловый спирт	не обнаружены
95% этиловый спирт	обнаружены

Фитостеролы методом ТСХ были обнаружены только в извлечении, полученном с использованием 95% этанола. Таким образом, наиболее полная экстракция фитостеролов из ЛРС возможна с использованием 95% спирта, что объясняется липофильностью данной группы БАВ.

Спиртовые извлечения готовили методом противоточной периодической экстракции. Для этого использовали 3 экстрактора, в которые загружали сырье в равных долях. На первом этапе сырье в первом экстракторе заливали небольшим количеством экстрагента и оставляли для набухания, затем до «зеркала» (чтобы уровень экстрагента находился выше уровня сырья на 2-3 мм). Сырье оставляли при комнатной температуре в течение 12 часов. Затем полученное извлечение сливали из первого экстрактора и переливали во второй. В первый же экстрактор заливали чистый экстрагент до «зеркала». По прошествии 12 часов извлечение из второго экстрактора переливали в третий экстрактор, из первого экстрактора – во второй, в первый экстрактор заливали чистый экстрагент. Циклы повторяли необходимое количество раз. На завершающем этапе подачу чистого экстрагента в первый экстрактор прекращали, но принцип переноса извлечений сохраняли. В результате получали спиртовое извлечение в соотношении 1:1 (из 1 массовой части сырья получали 1 объемную часть извлечения).

Полученные спиртовые извлечения хранили при температуре 4°C до дальнейшего изучения.

3.2 Качественный анализ спиртовых извлечений из ЛРС методом тонкослойной хроматографии

Разработка методики идентификации фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом ТСХ подразумевала подбор подвижной фазы и условий хроматографирования. Поскольку извлечение из ЛРС является многокомпонентной смесью, подвижная фаза должна быть подобрана таким образом, чтобы разделять целевые вещества от сопутствующих родственных

соединений, которые извлекаются из ЛРС и элюируются при сходных условиях. Подбор способа детектирования также позволяет более достоверно оценивать основные группы БАВ.

Подбор состава подвижной фазы основывался на анализе литературных источников [127; 104] и химических свойствах фитостеролов. Наилучшим образом фитостеролы разделяются в системах:

- 1) смесь гексан : этилацетат (3:1);
- 2) смесь гексан : этилацетат : уксусная кислота ледяная (20:9:1).

Обе системы растворителей позволяет удовлетворительно разделить фитостеролы и сопутствующие вещества. R_f β -ситостерола в случае использования первой системы растворителей составлял около 0,55; второй системы – 0,8.

Фитостеролы являются липофильными соединениями, поэтому при повышении полярности подвижной фазы, например, при увеличении доли этилацетата или добавлении уксусной или муравьиной кислоты, они активно элюируются и обнаруживаются в области линии финиша.

3.2.1 Методика хроматографирования

Использовали метод восходящей хроматографии. Хроматографическую камеру предварительно насыщали парами подвижной фазы в течение 20-30 минут.

Перед анализом пластинку активировали, помещали в камеру с подвижной фазой и после того, как фронт растворителей поднимался более чем на 70% пластинку вынимали и сушили при 100-110°C 3-5 мин.

На линию старта пластинки наносили 10 мкл извлечения и 10 мкл раствора стандарта β -ситостерола (1 мг/мл) (стандартный образец) в виде пятен радиусом 1-2 мм и расстоянием 10 мм друг от друга. Пластинку подсушивали на столе с электроподогревом. Далее хроматографировали восходящим способом в системе растворителей 1 до тех пор, пока фронт растворителей пройдет три четверти

длины пластинки. Пластинку вынимали из хроматографической камеры и подсушивали в вытяжном шкафу. После этого проводили детекцию.

3.2.2 Выбор способов детектирования фитостеролов

Поскольку β -ситостерол является тетрациклическим тритерпеноидом и имеет свободное α -положение относительно гидроксильной группы, для него характерна реакция с ароматическими альдегидами, например, с ванилином, в сернокислой среде. На хроматографической пластинке пятно β -ситостерола после обработки сернокислым раствором ванилина и нагревания окрашивалось в пурпурный цвет при дневном свете.

Также β -ситостерол имеет циклопентапергидрофенантеновое ядро и кислота серная концентрированная является общегрупповым реактивом для подобных соединений. После обработки пластинки спиртовым раствором кислоты серной и нагревании пятно β -ситостерола окрашивалось в красный цвет, флуоресцирующий в УФ-свете.

Таким образом, для детектирования пятен фитостеролов использовали три методики:

- 1) Спиртовой раствор ванилина сернокислого [40] с последующим нагреванием до 100-105°C.
- 2) 10% раствор серной кислоты в спирте с последующим нагреванием до 100-105°C.
- 3) УФ-свет при длине волны 254 нм после обработки пластинки 10% раствором серной кислоты в спирте.

Значение R_f для β -ситостерола составило около 0,55 (Рисунок 7) в системе растворителей 1 (гексан : этилацетат 3:1), что представляется оптимальным. Система 2 может быть использована в качестве альтернативной.

Предел обнаружения β -ситостерола при детектировании раствором ванилина сернокислым составляет 3 мкг, раствором кислоты серной спиртовым – 0,5 мкг.

3.2.3 Идентификация фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС

Идентификацию фитостеролов проводили во всех приготовленных извлечениях лекарственных растений с использованием разработанной методики хроматографирования и трёх способов детекции. Результаты испытаний в виде хроматограмм представлены на Рисунках 6 – 9.

Компоненты спиртового извлечения удовлетворительно разделяются от β -ситостерола в данной системе для всех извлечений, кроме извлечения из листьев солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).

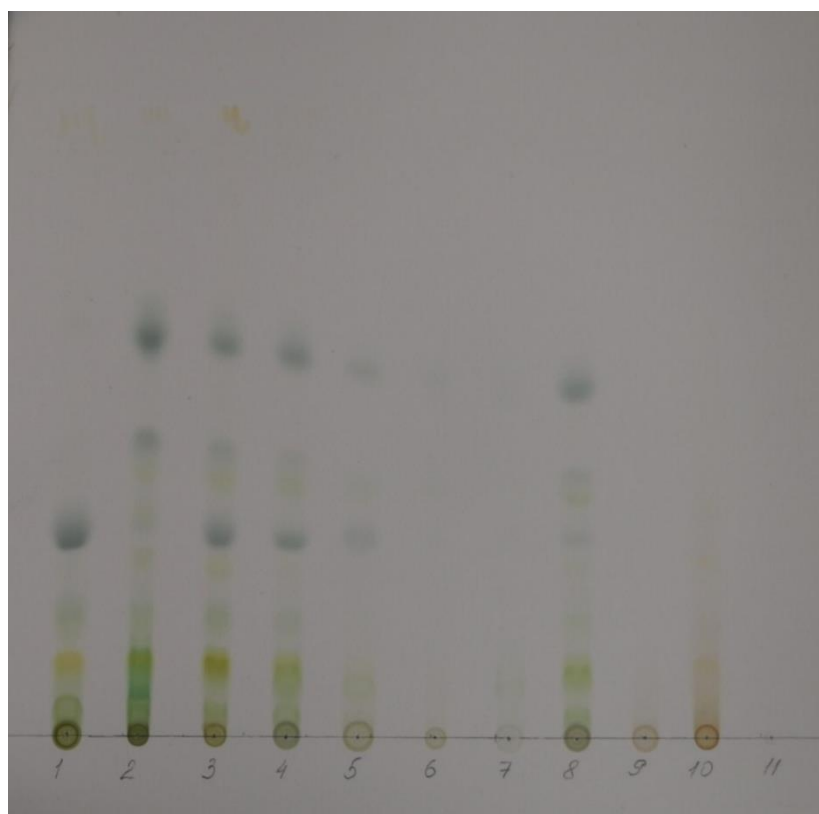


Рисунок 6 – Хроматограмма, полученная методом ТСХ, спиртовых извлечений в системе растворителей гексан : этилацетат (3:1)

1 –софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*), 2 – трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), 3 – сенны листья (*Sennae folia*), 4 – трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), 5 – термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*), 6 – плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), 7 – донника трава (*Meliloti herba*), 8 – трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), 9 – стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*), 10 – солодки корни (*Glycyrrhizae radices*); 11 – раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл).

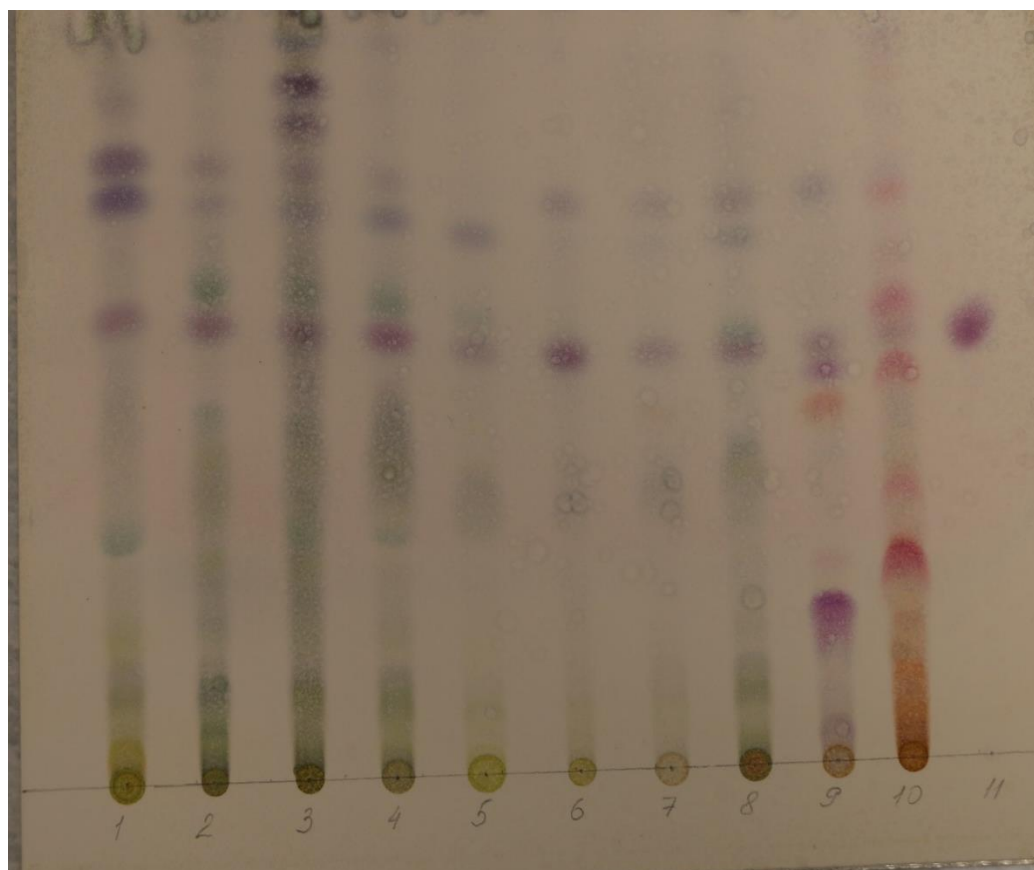


Рисунок 7 – Хроматограмма, полученная методом ТСХ, спиртовых извлечений после детектирования серноокислым раствором ванилина

1 –софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*), 2 – трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), 3 – сенны листья (*Sennae folia*), 4 – трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), 5 – термопсиса ланцетного трава (*Thermopsideis lanceolatae herba*), 6 – плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), 7 – донника трава (*Meliloti herba*), 8 – трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), 9 – стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*), 10 – солодки корни (*Glycyrrhizae radices*);

11 – раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл).

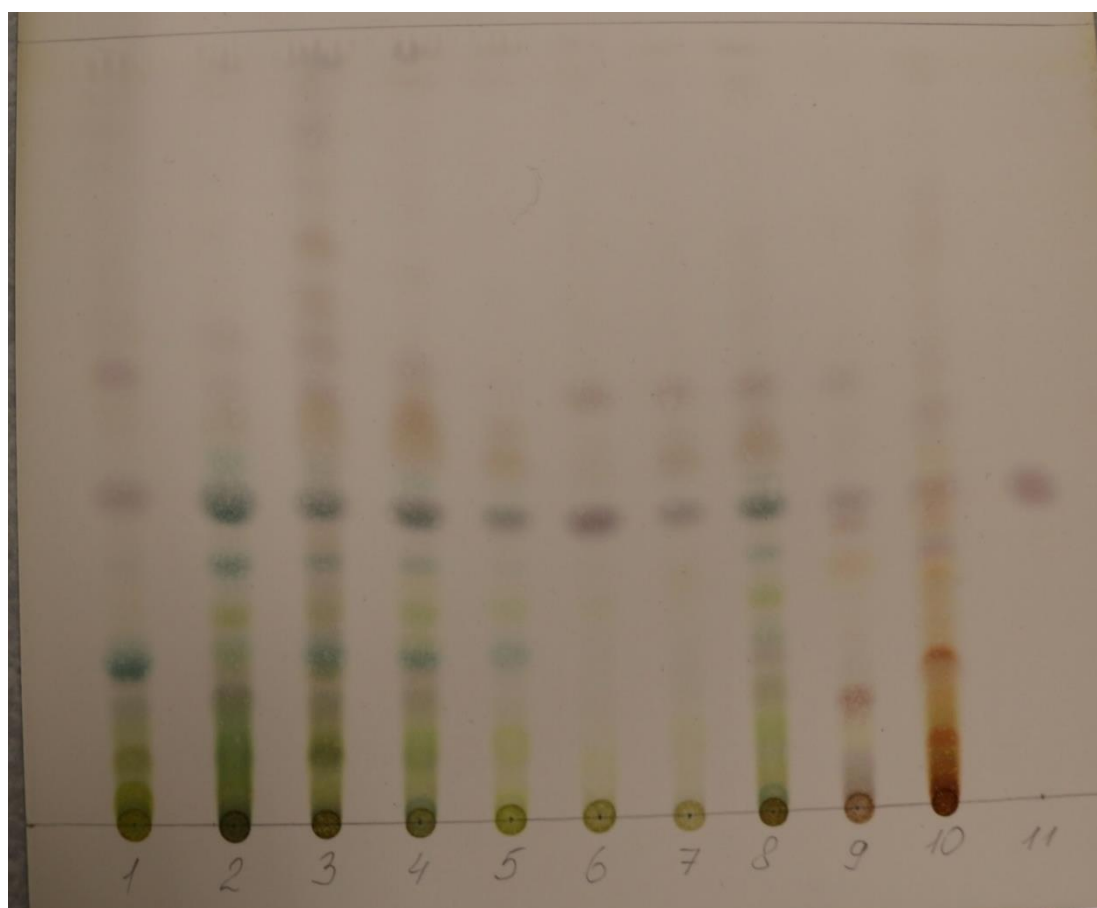


Рисунок 8 – Хроматограмма, полученная методом ТСХ, спиртовых извлечений после детектирования раствором кислоты серной спиртовым в дневном свете

1 – софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*), 2 – трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), 3 – сенны листья (*Sennae folia*), 4 – трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), 5 – термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*), 6 – плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), 7 – донника трава (*Meliloti herba*), 8 – трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), 9 – стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*), 10 – солодки корни (*Glycyrrhizae radices*);

11 – раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл).

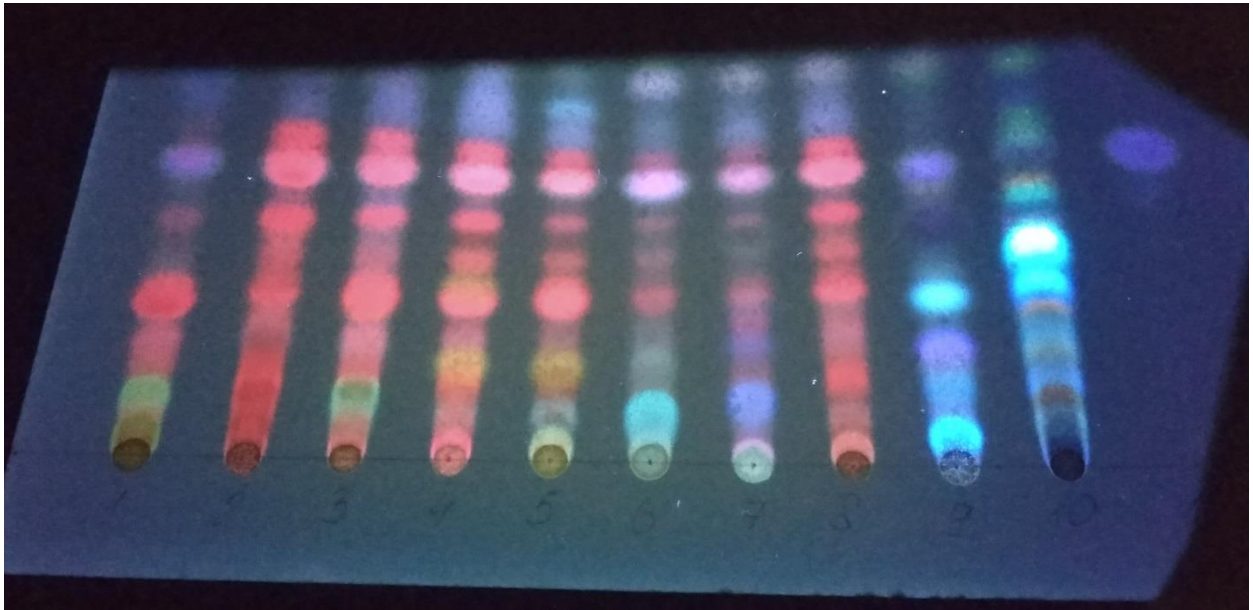


Рисунок 9 – Хроматограмма, полученная методом ТСХ, спиртовых извлечений после детектирования раствором кислоты серной спиртовым в УФ-свете

1 –софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*), 2 – трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), 3 – сенны листья (*Sennae folia*), 4 – трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), 5 – термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*), 6 – плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), 7 – донника трава (*Meliloti herba*), 8 – трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), 9 – стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*), 10 – солодки корни (*Glycyrrhizae radices*);
11 – раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл).

В случае хроматорграммы извлечения из листьев солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) пятно фитостерола замаскировано другим БАВ, после вертикального хроматографирования проводили разделение по ширине пластинки в системе растворителей гексан : этилацетат : уксусная кислота ледяная (20:9:1). Детекцию проводили серноокислым раствором ванилина.

Хроматограмма извлечения из листьев солодки представлена на Рисунке 10.

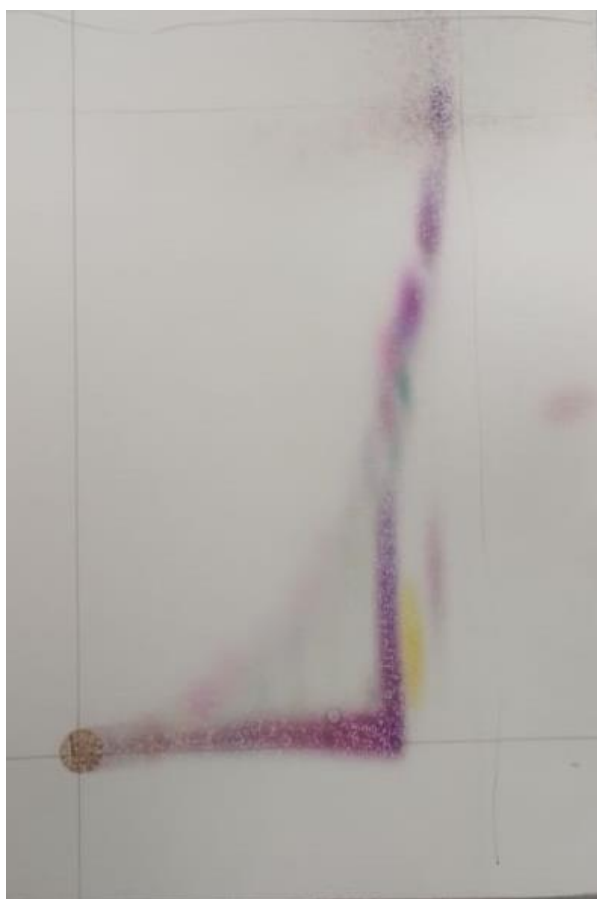


Рисунок 10 – ТСХ хроматограмма спиртового извлечения листьев солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) после детекции раствором ванилина серноокислого

Время анализа составляло 15 минут.

Таким образом, β -ситостерол был обнаружен в спиртовых извлечениях всех изучаемых видов ЛРС.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Подобран оптимальный экстрагент для извлечения фитостеролов из ЛРС – 95% спирт.
2. Подобраны условия для качественного анализа фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом ТСХ. Значение R_f для β -ситостерола составило около 0,55.
3. Выбраны наиболее селективные (специфические) способы детектирования фитостеролов на хроматографической пластинке.

4. Разработана дополнительная методика качественного анализа фитостеролов методом ТСХ (на примере листьев солодки уральской) с использованием двух подвижных фаз.

ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОСТЕРОЛОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

4.1 Разработка и валидация количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол методом спектрофотометрии

Количественное определение суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол проводили методом спектрофотометрии в видимой области спектра. Методика основана на реакции с ароматическим альдегидом – ванилином, в присутствии серной кислоты концентрированной. Для разработки методики необходимо подобрать условия пробоподготовки, условия определения, а затем провести валидацию.

4.1.1 Условия спектрофотометрического определения

Количественное определение фитостеролов методом спектрофотометрии в видимой области спектра возможно проводить после получения окрашенного продукта. Для этого проводили реакцию с ванилином в сернокислой среде, в результате которой образуется окрашенное соединение, устойчивое в среде ледяной уксусной кислоты.

К 0,5 мл раствора стандарта β -ситостерола (1 мг/мл) и спирта (раствор сравнения) прибавляли 1,5 мл 1% раствора ванилина спиртового и 5 мл кислоты серной концентрированной. Смесь нагревали на водяной бане при 60°C в течение 30 минут. Раствор охлаждали в течение 30 минут на ледяной бане, добавляли 25 мл кислоты уксусной ледяной и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Спектр поглощения полученного раствора в видимой области длин волн (от 400 до 800 нм) представлен на Рисунке 11. Длина волны максимума поглощения раствора составляет около 545 ± 2 нм.

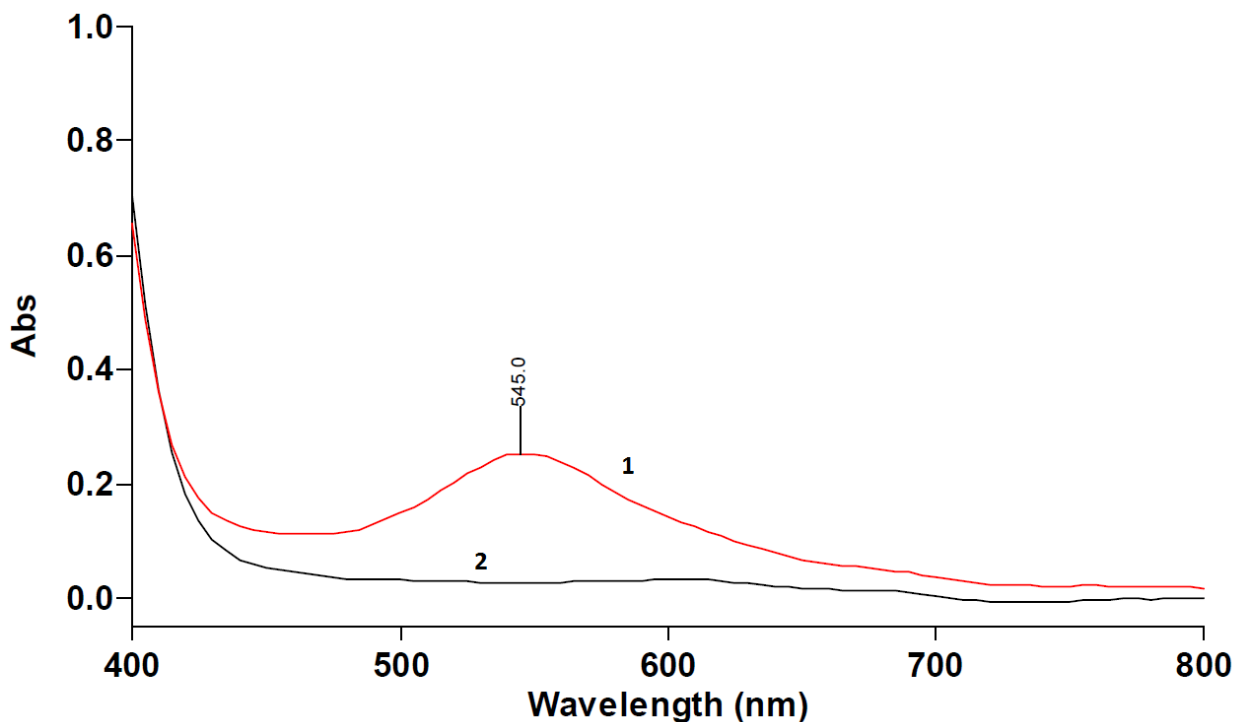


Рисунок 11- Спектр поглощения раствора стандарта β -ситостерола 1,0 мг/мл с ванилином (1) и раствора сравнения (2)

4.1.2 Пробоподготовка

Поскольку спиртовое извлечение из ЛРС – это многокомпонентная смесь, содержащая ряд разнообразных биологически активных соединений, которые также могут вступать в реакцию с ванилином, целесообразно подобрать такие условия пробоподготовки, при которых из извлечения было бы удалено наибольшее количество сопутствующих веществ. Фитостеролы обладают высокой липофильностью, поэтому они полностью переходят в растворитель с меньшей полярностью, чем спирт этиловый.

В качестве испытуемого раствора использовали спиртовое извлечение из ЛРС. К 200 мкл спиртового раствора стандарта β -ситостерола (1 мг/мл) добавляли 100 мкл воды дистиллированной и 200 мкл гексана, встряхивали 2 минуты для разделения фаз центрифугировали при 20000 об/мин в течение 5 минут. Для контроля состава водно-спиртовой и гексановой фаз использовали метод ТСХ. На пластинку наносили по 50 мкл водно-спиртовой и гексановой фазы,

хроматографировали в системе гексан:этилацетат (3:1) как описано в главе 3.1.1. Детекцию проводили раствором ванилина сернокислым 1%. На хроматограмме раствора стандарта β -ситостерола наблюдали пятно β -ситостерола в гексановом растворе и отсутствие пятен в водно-спиртовом растворе. Таким образом, в ходе эксперимента определили, что β -ситостерол переходит из спиртового раствора в гексан.

После описанной пробоподготовки спиртовых извлечений, проводили контроль состава гексановой фазы методом ТСХ и наблюдали на хроматограммах большое количество пятен. Для удаления сопутствующих компонентов ввели стадию гидролиза. В качестве гидролизующих веществ использовали водные растворы кислоты хлористоводородной (1 М), натрия гидроксида (1 М, 10%) и раствор калия гидроксида спиртовой 10%. Также устанавливали оптимальную продолжительность гидролиза (5, 10, 15, 30 минут).

Наиболее полный гидролиз наблюдали при добавлении к спиртовым извлечениям раствора калия гидроксида спиртового 10% при 50°C в течение 30 минут. Однако полностью удалить все сопутствующие вещества не удалось. Контроль состава гексановой фазы проводили методом ТСХ.

На хроматограммах гексановых фаз наблюдали наличие не только пятна, соответствующего по R_f стандарту β -ситостерола, но и ряд сопутствующих веществ (Рисунок 12).

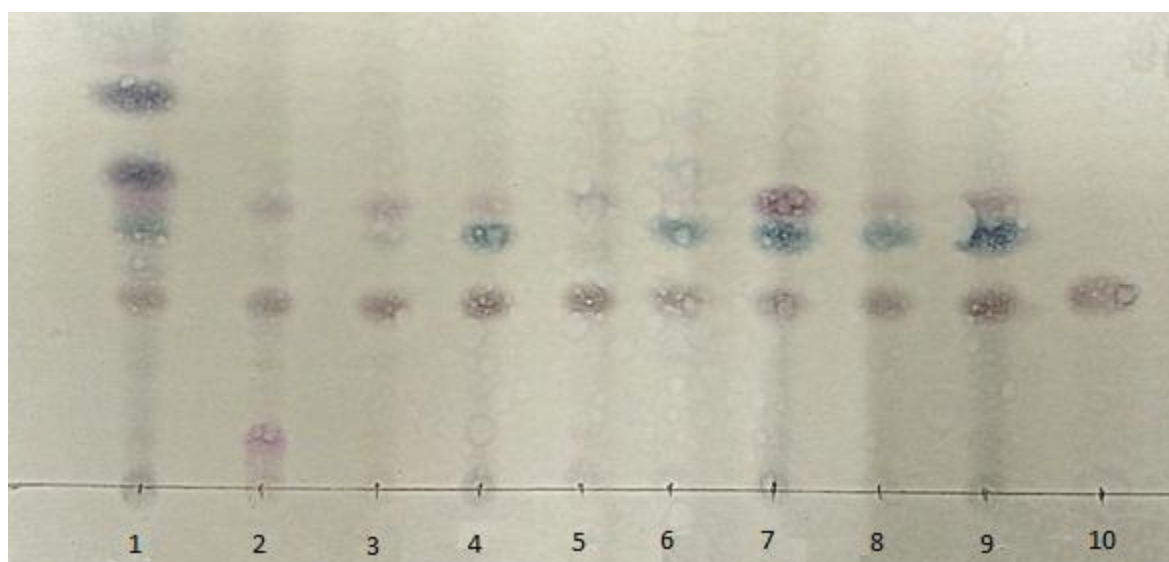


Рисунок 12 – ТСХ хроматограмма гексанового слоя, полученного из ЛРС, после детекции раствором ванилина сернокислового

1 –шалфея лекарственного листа (*Salviae officinalis folia*), 2 – стальника полевого корня (*Ononis arvensis radices*), 3 – плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), 4 – трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), 5 - солодки корня (*Glycyrrhizae radices*), 6 – термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*), 7 – софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*), 8 – трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), 9 – трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), 10 – раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл).

4.1.3 Количественное определение суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол методом спектрофотометрии

Количественное определение проводили с использованием калибровочного графика. Для его построения готовили стандартные растворы с различной концентрацией β -ситостерола.

Объем стандартного раствора, этанола и масса стандарта β -ситостерола представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Приготовление стандартных растворов для построения калибровочного графика

Концентрация β-ситостерола, мг/мл	Объем раствора стандарта β-ситостерола (1 мг/мл), мкл	Объем этанола, мкл
0 (раствор сравнения)	0	200
0,2	20	180
0,4	40	160
0,8	80	120
1,2	120	80
1,6	160	40
2,0	200	0

Далее проводили реакцию с ванилином, как указано в п. 4.1.1 и определяли интенсивность поглощения при длине волны около 545 нм.

Извлечения разбавляли этанолом – к 50 мкл извлечения добавляли 150 мкл спирта. Далее проводили гидролиз, добавляя 200 мкл 10% раствора калия гидроксида спиртового и нагревали при 50°C в течение 30 минут. Растворы оставляли при комнатной температуре до охлаждения. Добавляли по 200 мкл гексана и воды очищенной, встряхивали в течение 2 минут и центрифугировали при 20000 об/мин в течение 5 минут. Отбирали по 50 мкл гексанового слоя, добавляли к нему по 150 мкл спирта. Далее проводили реакцию с ванилином, как указано в п. 4.1.1 и определяли интенсивность поглощения при длине волны около 545 нм.

Содержание фитостеролов в ЛРС (мг/г) в пересчете на β-ситостерол рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{\bar{c} \cdot 200 \cdot 200}{50 \cdot 50}, \text{ где}$$

\bar{c} – среднее значение концентрации, полученное в результате пяти измерений и рассчитанное по калибровочному графику.

Результаты количественного определения суммы фитостеролов в 1 г сырья в пересчете на β -ситостерол представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Результаты количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в ЛРС

Сырье	Содержание фитостеролов, мг/г	RSD, %
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	$3,42 \pm 0,23$	6,83
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	$21,07 \pm 0,49$	6,3
стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	$4,36 \pm 0,23$	5,42
сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	$15,03 \pm 0,45$	2,98
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsis lanceolatae herba</i>)	$4,25 \pm 0,09$	2,16
софоры японской бутоны (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	$8,44 \pm 0,55$	6,56
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	$19,78 \pm 0,89$	4,49
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	$6,44 \pm 0,23$	3,67
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	$12,24 \pm 0,77$	6,31
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	$2,74 \pm 0,12$	4,43
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	$10,21 \pm 0,47$	4,59
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	$7,51 \pm 0,28$	3,74

4.1.4 Валидация методики количественного определения фитостеролов методом спектрофотометрии

Валидацию методики проводили по разделам «Специфичность», «Предел обнаружения», «Предел количественного определения», «Линейность», «Правильность», «Прецизионность».

Специфичность

Специфичность методики оценивали путем сравнения поглощения стандартного раствора и исследуемых растворов после реакции с ванилином. Спектры поглощения раствора стандарта и одного из исследуемых растворов (извлечение из корней стальника) представлены на Рисунке 13 в качестве примера.

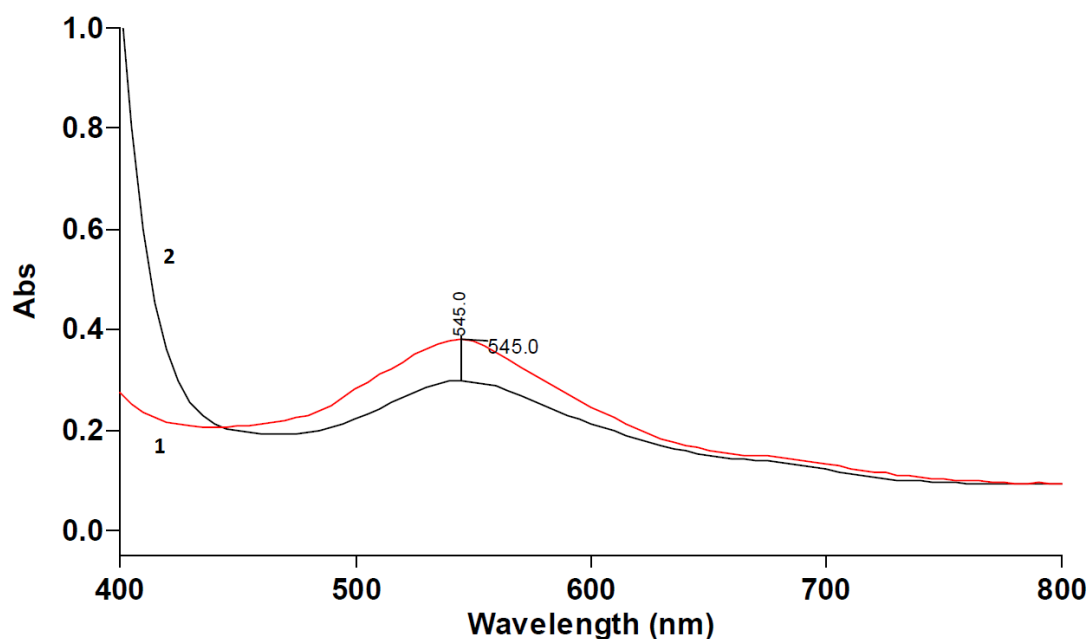


Рисунок 13 – Спектры поглощения раствора стандарта β -ситостерола (1 мг/мл) (1) и гексановой фазы извлечения из корней стальника (2)

Помимо этого, контроль специфичности проводили методом ТСХ. Методика проведения анализа описана в п. 3.1.1. На Рисунке 12 представлена

хроматограмма гексановых фаз извлечений, которая показывает, что в извлечениях содержатся не только фитостеролы (пятна со значением R_f около 0,55), но и пятна других соединений, которые тоже имеют липофильный характер, не подвергаются гидролизу раствором щелочи и реагируют с ванилином. Большое количество таких соединений наблюдается на хроматограммах извлечений из шалфея листьев, софоры бутонов, стальника корней. Возможно, это эфирные масла, сапонины или другие липофильные терпеноиды.

Таким образом, количественное определение фитостеролов с помощью разработанной методики характеризуется недостаточной специфичностью. При этом возможно определение суммы липофильных тритерпеноидов.

Предел обнаружения и предел количественного определения

Предел обнаружения определяли по формуле: $ПО = 3,3 \cdot S/b$, предел количественного определения определяли по формуле: $ПКО = 10 \cdot S/b$,

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала, b – тангенс угла наклона калибровочной кривой.

Вычисленные предел обнаружения и предел количественного определения составили 0,08 мкг/мл и 0,24 мкг/мл.

Линейность

Для определения линейности рассчитывали коэффициент корреляции r калибровочной кривой.

Калибровочную кривую строили, исходя из значений поглощения растворов, полученных разведением раствора стандарта β -ситостерола, как указано в п. 4.1.2. На Рисунке 14 представлен график калибровочной кривой.

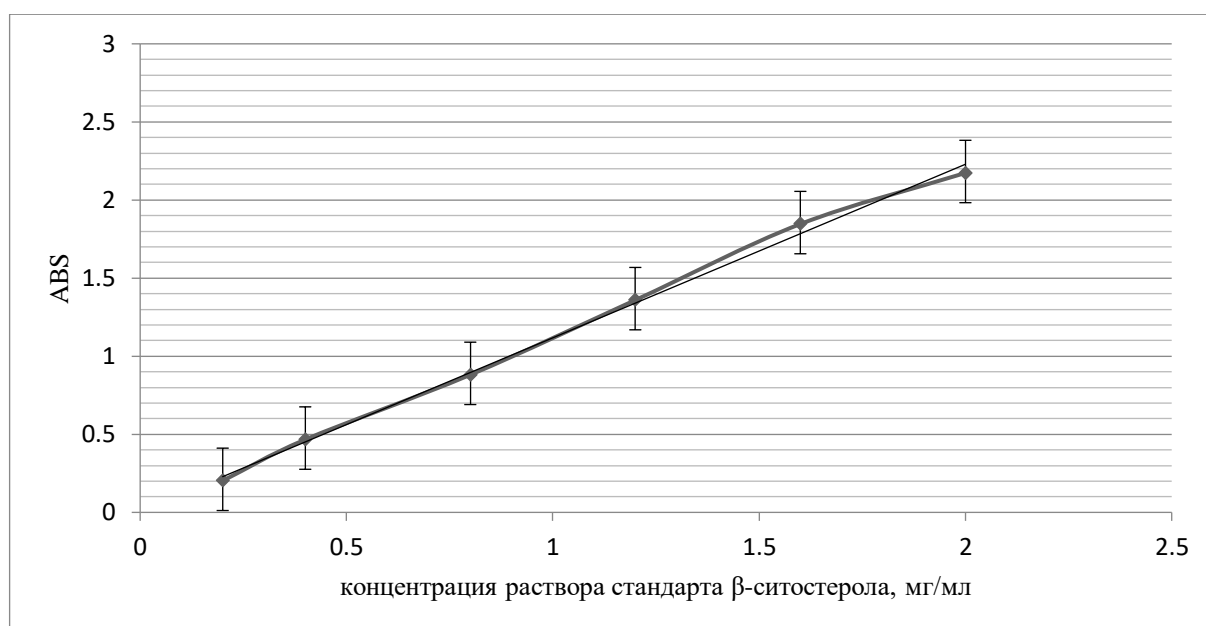


Рисунок 14 – График калибровочной кривой количественного определения β-ситостерола методом спектрофотометрии

Уравнение сглаживающей прямой имеет вид $y = 1,0951 \cdot x + 0,0031$

Коэффициент корреляции r составил 0,9975, что соответствует требованию ГФ XIV ($|r| \geq 0,99$) [1].

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности анализировали 3 раствора стандарта β-ситостерола, содержащие 0,2 мг/мл, 0,8 мг/мл, 2,0 мг/мл, как описано в п. 4.1.2. В Таблице 8 представлены результаты измерений и статистической обработки.

Таблица 8 – Исследование прецизионности и правильности методики количественного определения фитостеролов методом спектрофотометрии

Теоретическая концентрация, мг/мл	Среднее значение определенной концентрации, мг/мл (n=5)	RSD, % (n = 5)	Относительная ошибка ε, %
0,2	0,2023	5,11	1,137
0,8	0,8053	4,57	0,66
2,0	1,5830	6,41	26,34

Таким образом, методика является прецизионной во всем диапазоне концентраций. Правильность доказана для значений 0,2 мг/мл и 0,8 мг/мл, при значении 2,0 мг/мл наблюдали снижение определяемой концентрации.

Для определения диапазона, в котором результаты измерений будут правильными, анализировали растворы стандарта, содержащие 1,0, 1,5 и 1,8 мг/мл. Результаты измерений представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Определение диапазона концентраций для доказательства прецизионности и правильности методики

Теоретическая концентрация, мг/мл	Среднее значение определенной концентрации, мг/мл (n=5)	RSD, % (n = 5)	Относительная ошибка ϵ, %
1,0	1,042803	3,69	4,1
1,5	1,5492	2,33	3,2
1,8	1,7732	3,35	-1,51

Экспериментально доказаны правильность и прецизионность методики в диапазоне концентраций от 0,2 до 1,8 мг/мл.

4.2 Количественное определение фитостеролов методом газовой хроматографии

Для разделения, идентификации и количественного определения фитостеролов наиболее часто используют метод газовой хроматографии. Данный метод применяют как для анализа содержания фитостеролов в маслах, продуктах питания, так и в растительных извлечениях. Он основан на способности компонентов улетучиваться с инертным газом-носителем и взаимодействии аналитов с неподвижной фазой колонки.

4.2.1 Подбор оптимальных условий хроматографирования

Колонка

На основе литературных данных была выбрана капиллярная колонка. Капиллярные колонки по сравнению с насадочными позволяют уменьшить время анализа фитостеролов, избежать интерференции пиков, улучшить разделение компонентов, эти колонки более термически стабильны.

Поскольку фитостеролы являются гидрофобными молекулами, для их определения используют колонку, содержащую неполярный наполнитель, например, 100% полисилоксан. Однако, использование колонки с 5% фенил- и 95%-метилполисилоксаном позволило добиться лучшего разделения, но увеличило время анализа (30 мин и 35 мин соответственно).

Использовали колонку HP-5MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина плёнки неподвижной фазы, содержащей 5% фенил, 95% метилполисилоксана, 0,25 мкм (Agilent Technologies). Газ носитель – гелий.

В качестве испытуемого раствора использовали спиртовое извлечение из ЛРС. Пробоподготовка заключалась в центрифугировании в течение 5 минут со скоростью 20000 об/мин на ультрацентрифуге Eppendorf 5427 (Германия).

Выбор температурной программы хроматографирования

В целях предотвращения совместной элюции фитостеролов с другими биологически активными веществами, была подобрана температурная программа, которая представлена в Таблице 10. Наличие гидроксильной группы в фитостеролах делает их менее летучими, поэтому на первом этапе при 150°C на хроматограмме наблюдаются пики посторонних БАВ, а на втором этапе температура повышается до 280°C и на хроматограмме появляются пики фитостеролов.

Таблица 10 – Температурная программа хроматографирования

(Начало)	50 °С
Время выдержки	2 мин
После цикла	50 °С
Программа	
#1 Скорость	10 °С/мин
#1 Значение	150 °С
#1 Время выдержки	0 мин
#2 Скорость	15 °С/мин
#2 Значение	280 °С
#2 Время выдержки	39,333 мин

Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Режим введения пробы с делением потока с соотношением 1:20. Температура : 280°С.

Газ носитель: гелий, скорость потока 0,8 мл/мин. Температура: 280°С.

Масс-детекция фитостеролов

Использовали масс-селективное детектирование.

Ионизацию проводили методом электронного удара, температура источника ионов 230°С, температура квадруполя 150°С. Массы определяемых ионов находились в диапазон от 29 до 550 m/z.

Ионизация методом электронного удара является распространенным методом получения ионов для последующей детекции разделяемых веществ. Ионизация достигается высоковольтной электронной бомбардировкой. Существует библиотека масс-спектров, которая позволяет производить идентификацию соединений даже при отсутствии стандартных образцов.

В качестве стандарта использовали раствор β -ситостерола (1 мг/мл). Его масс-спектр представлен на Рисунке 15. Возможная схема фрагментации молекулы β -ситостерола приведена на Рисунке 16.

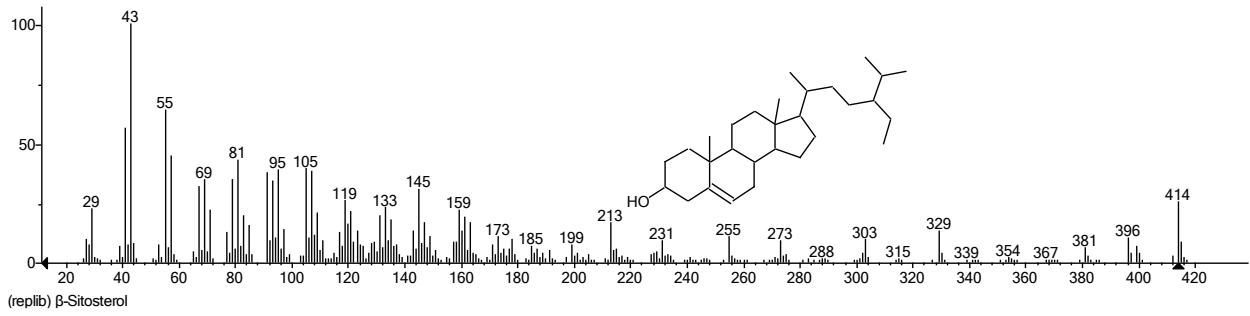


Рисунок 15 – Масс-спектр β -ситостерола

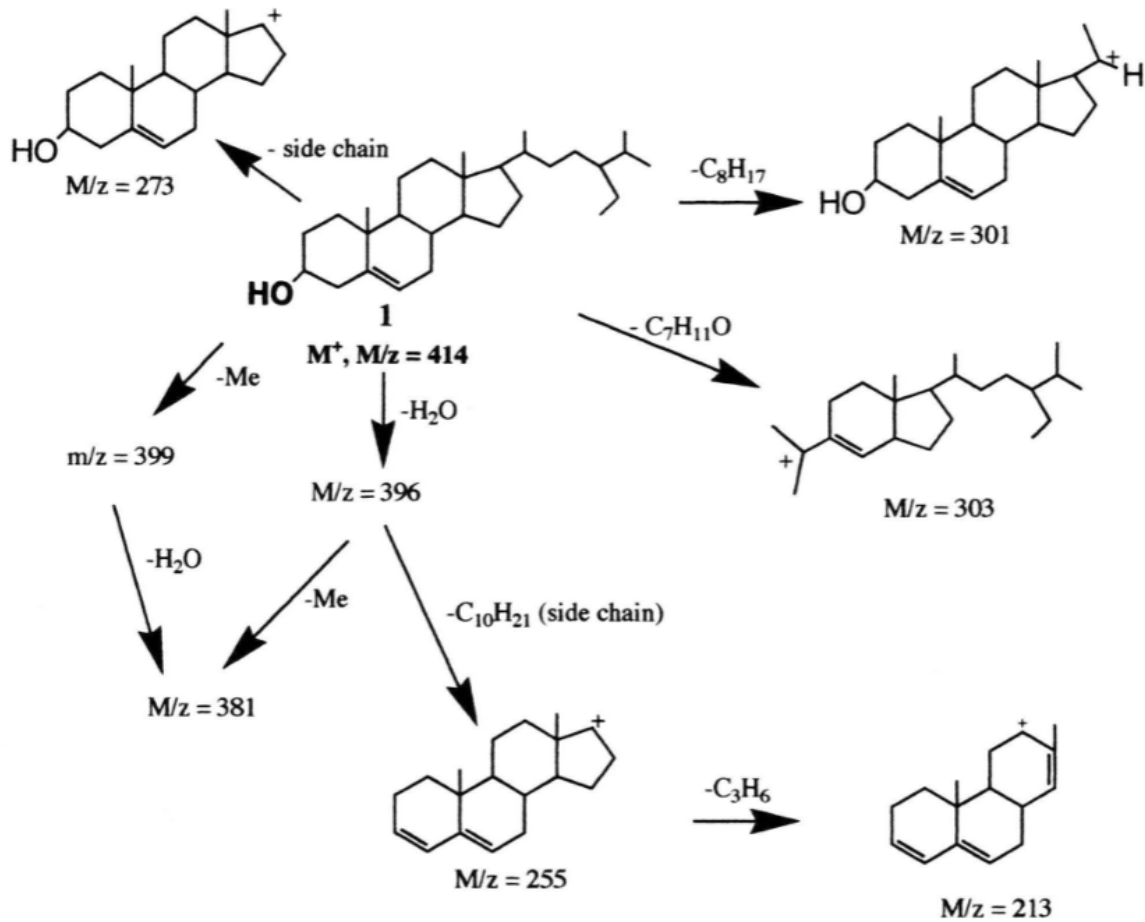


Рисунок 16 – Схема фрагментации молекулы β -ситостерола с образованием соответствующих фрагментов, показанных на Рисунке 15 [71]

Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ChemStationE 02.00. Помимо β -ситостерола в извлечениях были обнаружены кампестерол и стигмастерол. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-14 и соответствующим значениям линейных хроматографических индексов Ковача.

Поскольку время удерживания напрямую зависит от молекулярной массы стеролов, кампестерол (М.м. 400,68) и стигмастерол (М.м. 412,69) предшествуют β -ситостеролу (М.м. 414,71) (Рисунок 17).

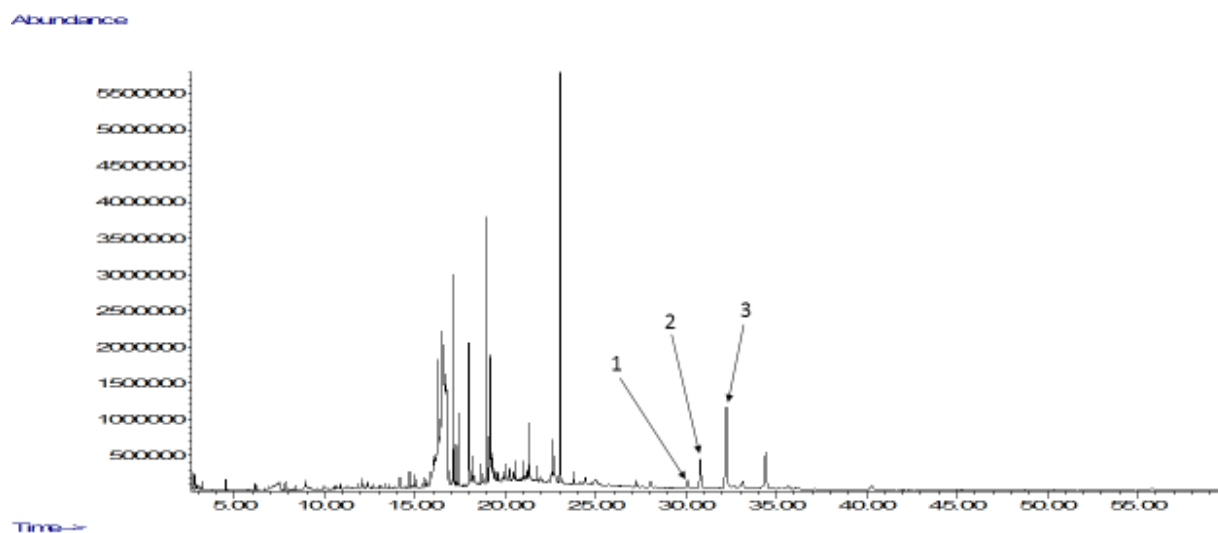


Рисунок 17 – ГХ-МС хроматограмма спиртового извлечения из травы козлятника восточного. 1 – кампестерол, время удерживания 30.089 мин; 2 – стигмастерол, время удерживания 30.797 мин; 3 - β -ситостерол, время удерживания 32.237 мин

Относительное содержание компонентов смеси (количественный анализ) определяли вычислением соотношения площадей хроматографических пиков (методом внутренней нормализации).

4.2.2 Валидация методики ГХ-МС

Валидацию методики проводили согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения.

Специфичность

Подобранные условия хроматографирования позволяют удовлетворительно разделить пики анализируемых веществ и наиболее близкие элюируемые примеси.

Время удерживания стандартного раствора β -ситостерола 32,171 мин совпадает с временами удерживания β -ситостерола в извлечениях из ЛРС.

Предел количественного определения

Предел количественного определения проводили по соотношению сигнал-шум. Пик β -ситостерола при анализе стандартного раствора с концентрацией 0,1 мкг/мл превышает шум базовой линии более чем в 10 раз. Таким образом, предел количественного определения составляет не менее 0,1 нг.

Линейность

Диапазона линейности определяли оценкой аналитических сигналов пяти стандартных растворов β -ситостерола в разных концентрациях. Диапазон линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации анализируемого вещества составил 0,05 мг/мл / 50,00 мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,9928, уравнение сглаживающей прямой $y = 22635x + 610,2$. (Таблица 11)

На Рисунке 18 представлена зависимость площади пика от концентрации стандартного раствора β -ситостерола (мг/мл).

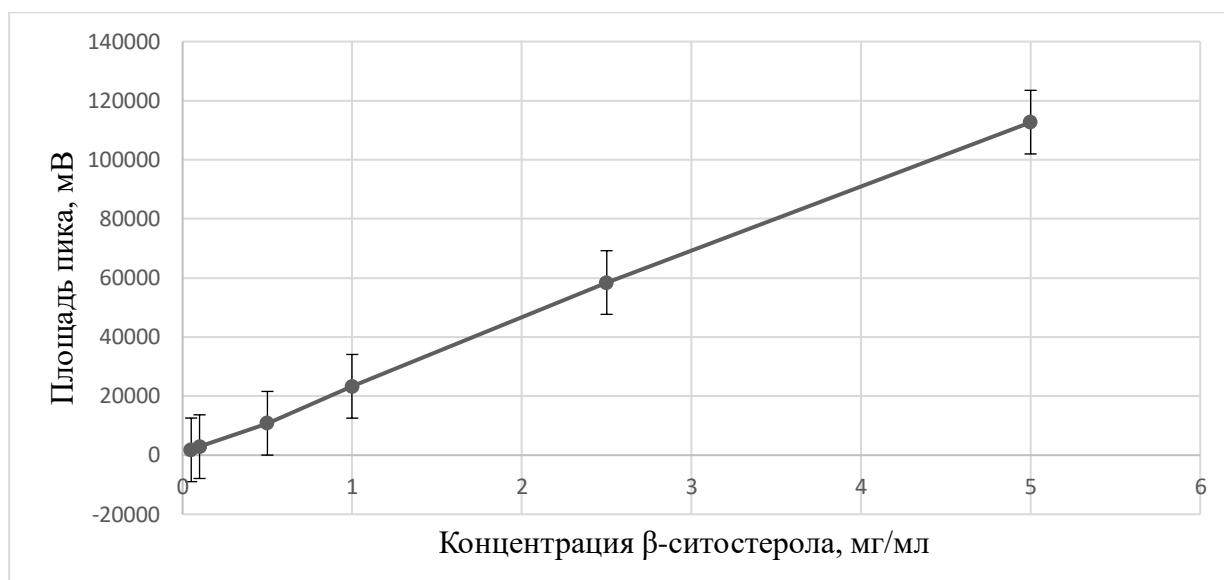


Рисунок 18 – График зависимости площади пика (мВ) от концентрации стандарта β-ситостерола (мг/мл)

Таблица 11 – Параметры количественного определения БАВ

Соединение	Диапазон линейных концентраций, мг/мл	Параметры линейной регрессии	
		Уравнение сглаживающей прямой	Коэффициент корреляции
β-ситостерол	0,05 – 50,0	$y = 22635x + 610,2$	0,9928

Правильность и прецизионность (воспроизводимость)

Для определения правильности и прецизионности методики анализировали стандартные растворы β-ситостерола с концентрациями 0,05 мг/мл, 5,0 мг/мл и 50,0 мг/мл. Каждый анализ проводили пятикратно. Полученные значения подвергали статистической обработке, рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD, %) и относительную погрешность (ε,%). Результаты исследования представлены в Таблице 12.

Таблица 12 – Оценка правильности и прецизионности методики ГХ-МС

Введено раствора стандарта β-ситостерола (мг/мл)	Найдено (мг/мл), среднее значение (n=5)	RSD, % (n = 5)	ϵ, %
0,05	0,048	0,002	3,80
5,0	4,95	0,05	0,94
50,0	49,49	0,51	1,01

Исходя из данных таблицы, относительная ошибка определения не превышает 3,80%.

4.2.3 Количественный анализ фитостеролов в спиртовых извлечениях из лекарственного растительного сырья

Разработанный метод ГХ-МС использовали для подтверждения идентификации и количественного определения фитостеролов в спиртовых извлечениях (экстрактах) 12 видов ЛРС. Результаты количественного анализа представлены в Таблице 13 и на Рисунке 19.

Таблица 13 – Времена удерживания и количественное содержание (мг/г) фитостеролов в ЛРС

Сырье	β-ситостерол		Стигмастерол		Кампестерол		Суммарное содержание фитостеролов, мг/г (n=5)
	RT, мин	мг/г (n=5)	RT, мин	мг/г (n=5)	RT, мин	мг/г (n=5)	
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	32,211	2,64 ± 0,03	30,799	0,499 ± 0,02	-	-	3,14 ± 0,04
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	32,175	1,29 ± 0,01	30,773	0,306 ± 0,01	30,067	0,193 ± 0,02	1,79 ± 0,01
стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	32,185	2,04 ± 0,14	30,779	0,731 ± 0,09	30,072	0,334 ± 0,09	3,10 ± 0,13
сенны листьев (<i>Sennae folia</i>)	32,218	2,90 ± 0,13	30,804	1,499 ± 0,11	30,093	0,601	5,00 ± 0,12
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsideis lanceolatae herba</i>)	32,184	0,74 ± 0,15	30,790	0,63 ± 0,14	30,075	0,33 ± 0,10	1,69 ± 0,14
софоры японской бутоны (<i>Sophora japonica L.</i>)	32,244	2,79 ± 0,13	-	-	-	-	2,79 ± 0,13
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	32,219	1,331 ± 0,04	-	-	-	-	1,33 ± 0,04

Продолжение Таблицы 13

Сырье	β-ситостерол		Стигмастерол		Кампестерол		Суммарное содержание фитостеролов, мг/г (n=5)
	RT, мин	мг/г (n=5)	RT, мин	мг/г (n=5)	RT, мин	мг/г (n=5)	
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	32,236	3,50 ± 0,15	30,794	0,58 ± 0,14	30,089	0,53 ± 0,09	4,62 ± 0,15
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	32,237	6,65 ± 0,15	30,797	2,17 ± 0,10	30,089	0,610 ± 0,15	9,43 ± 0,14
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	32.250	2,06 ± 0,13	30,833	0,334 ± 0,10	-	-	2,380 ± 0,12
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	32,222	4,34 ± 0,14	30,797	1,72 ± 0,10	30,092	2,04 ± 0,13	8,10 ± 0,14
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	32,204	5,61 ± 0,22	-	-	-	-	5,61 ± 0,22



Рисунок 19 – Содержание основных фитостеролов в пересчёте на β-ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС

Исходя из полученных данных ГХ/МС анализа (Таблица 13) лекарственное растительное сырье: трава козлятника восточного, плоды люпина многолистного и трава чины луговой являются наиболее перспективными объектами в качестве источника β-ситостерола. Помимо этого, извлечения из травы козлятника восточного, плодов люпина и листьев сенны содержат заметное количество стигмастерола.

4.3 Анализ стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья

Фитостеролы относятся к термически нестабильным веществам. Поэтому целесообразно проведение изучения стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС в условиях хранения при комнатной температуре (20°C), в защищённом от света месте. Количественное определение фитостеролов проводили методом ГХ-МС, описанным в п. 3.2. во временных точках 0 – после приготовления, 3 месяца и 6 месяцев. Помимо содержания фитостеролов

проводили контроль таких параметров спиртовых извлечений как внешний вид, содержание спирта этилового, содержание сухого остатка.

Органолептические свойства экстрактов изменились следующим образом: в процессе изучения стабильности во всех экстрактах за исключением экстракта корней солодки наблюдалось образование небольшого количества осадка. Цвет экстрактов листьев шалфея, травы чины, травы козлятника восточного, травы солодки уральской, бутонов софоры японской, травы донника лекарственного, травы термопсиса ланцетного, травы клевера лугового, листьев сенны в процессе хранения переходит из зеленого в коричневато-зеленый. Запах не изменялся.

Содержание фитостеролов практически не изменялось в течение хранения. Небольшое уменьшение количества фитостеролов возможно обусловлено образованием небольшого осадка, в состав которого могли входить данные БАВ.

Содержание спирта и содержание сухого остатка в процессе хранения практически не изменилось.

Результаты изучения стабильности представлены в Таблицах 14 и 15.

Таблица 14 – Изучение органолептических свойств спиртовых извлечений из ЛРС

Сырье	Временные точки	Органолептические свойства		
		Цвет	Прозрачность	Запах
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	после приготовления	Темно-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный
	3 месяца	Темно-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный
	6 месяцев	Темно-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Характерный
стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	после приготовления	Оранжево-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный
	3 месяца	Оранжево-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный
	6 месяцев	Оранжево-коричневый	Наблюдается легкая опалесценция	Сильный, характерный
сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Характерный

Продолжение Таблицы 14

Сырье	Временные точки	Органолептические свойства		
		Цвет	Прозрачность	Запах
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsis lanceolatae herba</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Характерный
софоры японской бутоны (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Сильный, характерный
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense L.</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический

Продолжение Таблицы 14

Сырье	Временные точки	Органолептические свойства		
		Цвет	Прозрачность	Запах
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i>)	после приготовления	Коричневатый	Прозрачный	Слабый специфический
	3 месяца	Коричневатый	Прозрачный	Слабый специфический
	6 месяцев	Коричневатый	Прозрачный	Слабый специфический
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Сильный, характерный

Таблица 15 – Изучение стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС

Сырье	Временные точки	Содержание суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол, мг/мл (n=5) метод – ГХ-МС	Содержание спирта, % (n=5)	Сухой остаток, % (n=5)
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	после приготовления	3,140 \pm 0,04	79,58 \pm 0,97	5,76 \pm 0,15
	3 месяца	3,021 \pm 0,17	75,35 \pm 1,01	6,27 \pm 0,07
	6 месяцев	3,010 \pm 0,09	71,21 \pm 0,97	6,92 \pm 0,21
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	после приготовления	1,793 \pm 0,01	80,66 \pm 1,9	2,90 \pm 0,12
	3 месяца	1,755 \pm 0,03	75,19 \pm 1,54	3,46 \pm 0,09
	6 месяцев	1,776 \pm 0,01	72,42 \pm 1,15	4,08 \pm 0,17
стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	после приготовления	3,103 \pm 0,13	77,86 \pm 1,17	4,53 \pm 0,52
	3 месяца	3,100 \pm 0,09	73,48 \pm 1,52	4,95 \pm 0,21
	6 месяцев	3,097 \pm 0,04	70,01 \pm 1,65	5,03 \pm 0,09
сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	после приготовления	5,004 \pm 0,12	78,04 \pm 1,53	7,69 \pm 0,07
	3 месяца	5,000 \pm 0,10	74,61 \pm 1,79	8,26 \pm 0,15
	6 месяцев	4,991 \pm 0,17	70,97 \pm 1,73	8,83 \pm 0,10
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsisidis lanceolatae herba</i>)	после приготовления	1,697 \pm 0,14	81,43 \pm 1,67	4,68 \pm 0,13
	3 месяца	1,683 \pm 0,05	77,42 \pm 1,90	5,94 \pm 0,18
	6 месяцев	1,680 \pm 0,06	72,21 \pm 0,96	6,17 \pm 0,22

Продолжение Таблицы 15

Сырье	Временные точки	Содержание суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол, мг/мл (n=5) метод – ГХ-МС	Содержание спирта, % (n=5)	Сухой остаток, % (n=5)
софоры японской бутоны (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	после приготовления	2,790 \pm 0,13	79,76 \pm 1,80	5,58 \pm 0,24
	3 месяца	2,790 \pm 0,13	71,02 \pm 1,66	6,15 \pm 0,18
	6 месяцев	2,789 \pm 0,14	78,32 \pm 1,17	7,03 \pm 0,20
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	после приготовления	1,331 \pm 0,04	75,58 \pm 1,65	7,25 \pm 0,16
	3 месяца	1,299 \pm 0,09	73,55 \pm 1,02	7,90 \pm 0,07
	6 месяцев	1,300 \pm 0,40	71,27 \pm 1,64	8,35 \pm 0,21
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	после приготовления	4,620 \pm 0,15	79,73 \pm 1,71	4,79 \pm 0,19
	3 месяца	4,610 \pm 0,10	72,19 \pm 1,69	5,27 \pm 0,09
	6 месяцев	4,612 \pm 0,12	68,32 \pm 1,57	5,93 \pm 0,18
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	после приготовления	9,431 \pm 0,14	80,15 \pm 1,53	5,01 \pm 0,11
	3 месяца	9,412 \pm 0,22	77,23 \pm 1,03	6,81 \pm 0,07
	6 месяцев	9,400 \pm 0,14	71,51 \pm 0,99	7,18 \pm 0,16
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	после приготовления	2,380 \pm 0,12	84,54 \pm 1,02	2,83 \pm 0,13
	3 месяца	2,375 \pm 0,20	82,83 \pm 1,82	3,19 \pm 0,17
	6 месяцев	2,354 \pm 0,03	79,29 \pm 1,65	3,93 \pm 0,12

Продолжение Таблицы 15

Сырье	Временные точки	Содержание суммы фитостеролов в пересчёте на β-ситостерол, мг/мл (n=5) метод – ГХ-МС	Содержание спирта, % (n=5)	Сухой остаток, % (n=5)
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	после приготовления	8,102 \pm 0,14	76,42 \pm 1,55	3,23 \pm 0,20
	3 месяца	8,100 \pm 0,15	71,54 \pm 1,46	4,16 \pm 0,13
	6 месяцев	7,991 \pm 0,19	68,54 \pm 1,28	4,89 \pm 0,10
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	после приготовления	5,605 \pm 0,22	78,68 \pm 1,66	5,51 \pm 0,20
	3 месяца	5,581 \pm 0,18	73,56 \pm 1,22	6,85 \pm 0,19
	6 месяцев	5,580 \pm 0,17	70,03 \pm 1,02	7,00 \pm 0,17

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Подобраны условия для количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в ЛРС методом спектрофотометрии. Пробоподготовка включает в себя щелочной гидролиз спиртовых извлечений из ЛРС и экстракцию липофильных соединений гексаном.
2. Проведена валидация разработанной спектрофотометрической методики количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол. Предел обнаружения составил 0,08 мкг/мл, предел количественного определения – 0,24 мкг/мл. Доказаны линейность, прецизионность и правильность методики в диапазоне концентраций 0,2 – 1,8 мкг/мл. Данная методика проводится с использованием доступного оборудования, однако не обладает высокой специфичностью.
3. Разработана методика количественного анализа фитостеролов в ЛРС в пересчёте на β -ситостерол методом ГХ-МС.
4. Проведена валидация разработанной аналитической методики количественного определения фитостеролов методом ГХ-МС. Данная методика является специфичной, т.к. даёт возможность качественно и количественно определить как сумму фитостеролов, так и провести количественное определение отдельных фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол. Предел количественного определения составил 0,1 нг. Доказана прецизионность и правильность методики в диапазоне 0,05 – 50,00 мкг/мл.
5. Проведена идентификация фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом ГХ-МС. Во всех видах изучаемого ЛРС был обнаружен β -ситостерол. В траве козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), плодах люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), траве донника лекарственного (*Meliloti herba*), траве клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), листьях сенны (*Sennae folia*), корнях стальника полевого (*Ononis arvensis radices*) помимо β -ситостерола были идентифицированы стигмастерол и кампестерол, в листьях солодки уральской

(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) и корнях солодки (*Glycyrrhizae radices*) помимо β -ситостерола был идентифицирован стигмастерол.

6. Проведен сравнительный анализ количественного содержания β -ситостерола в ЛРС. Перспективными источниками фитостеролов являются трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.) и трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.).

7. Изучена стабильность фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС. В условиях хранения при 20°C в защищенном от света месте в течение 6 месяцев количество фитостеролов незначительно снизилось.

8. Результаты исследования показали, что в процессе хранения изменяются органолептические свойства спиртовых извлечений из ЛРС: образуется осадок во всех извлечениях, за исключением извлечения из корней солодки.

ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИАМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФИТОСТЕРОЛОВ

5.1 Определение антиамилазной активности спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья

Ингибиторы амилазы используют в терапии больных сахарным диабетом. Сообщается, что извлечения из ряда лекарственных растений также обладают антиамилазной активностью. Имеются данные о возможной антиамилазной активности фитостеролов (Agatonovic-Kustrin S.) [14].

В качестве предварительного испытания проводили определение антиамилазной активности суммарных спиртовых извлечений из ЛРС методом спектрофотометрии. В основе методики лежит качественная реакция восстанавливающих сахаров с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС). Альдегидная группа сахара восстанавливает одну из нитрогрупп, образуя окрашенную в желтый цвет 3-амино-5нитросалициловую кислоту (метод Миллера), Рисунок 20.

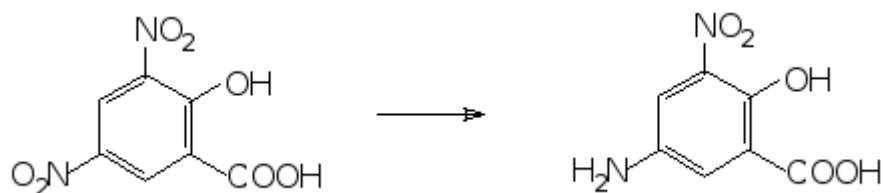


Рисунок 20 – Реакция восстановления 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС)

Измерение поглощения раствора проводят при длине волны около 540 нм. На этой реакции также основано определение ферментной активности β -глюконазы, описанное в ГОСТ Р 54905-2012.

Поскольку в испытании использовали препарат бактериальной амилазы без точно установленной активности, концентрацию рабочего раствора фермента подбирали экспериментально и она составила 1:2000 (об/об).

1 мл фермента (1,7226 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили дистиллированной водой до метки. 5 мл полученного раствора

помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили дистиллированной водой до метки.

Методика определения антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС

Для количественного определения ингибирующей амилазу активности спиртовых извлечений использовали методику, описанную ГОСТ Р 54905-2012, с изменениями. Перед анализом все растворы выдерживали в термостате при 37°C в течение 10 минут для уравнивания их температуры. К 200 мкл раствора фермента (1:2000) добавляли 40 мкл раствора извлечения 1:1 (об/об) и 160 мкл буферного раствора рН 6,86. Смесь встряхивали и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. К смеси добавляли 400 мкл крахмала. Смесь встряхивали и инкубировали в термостате при 37°C в течение 15 минут. Для количественной оценки выделившейся глюкозы 600 мкл смеси добавляли к 300 мкл раствора ДНС-реактива и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин в закрытых сосудах. После охлаждения к смеси добавляли 8,1 мл дистиллированной воды, перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны около 540 нм в кювете 10 мм. Раствор сравнения – дистиллированная вода.

Для того чтобы исключить влияние экстрагента (спирта) на фермент, а также компонентов извлечения на ДНС-реактив, параллельно проводили ряд контрольных опытов.

Контрольный опыт 1 – проводится аналогично, вместо раствора фермента – дистиллированная вода; контрольный опыт 2 – вместо извлечения – спирт; контрольный опыт 3 – вместо фермента вода, вместо извлечения спирт.

Ингибирование амилазы (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{Ингибирование, \%} = \left[1 - \left(\frac{A_S - A_B}{A_T - A_C} \right) \right] \cdot 100\%$$

A_S – оптическая плотность раствора основного опыта,

A_B – оптическая плотность раствора контрольного опыта 1,

A_T – оптическая плотность контрольного опыта 2,

A_C – оптическая плотность контрольного опыта 3.

Основной опыт и контрольный опыт 2 проводили пятикратно, контрольные опыты 1 и 3 проводили трижды.

На Рисунке 21 и в Таблице 16 представлены результаты количественного определения антиамилазной активности спиртовых извлечений (% ингибирования амилазы).

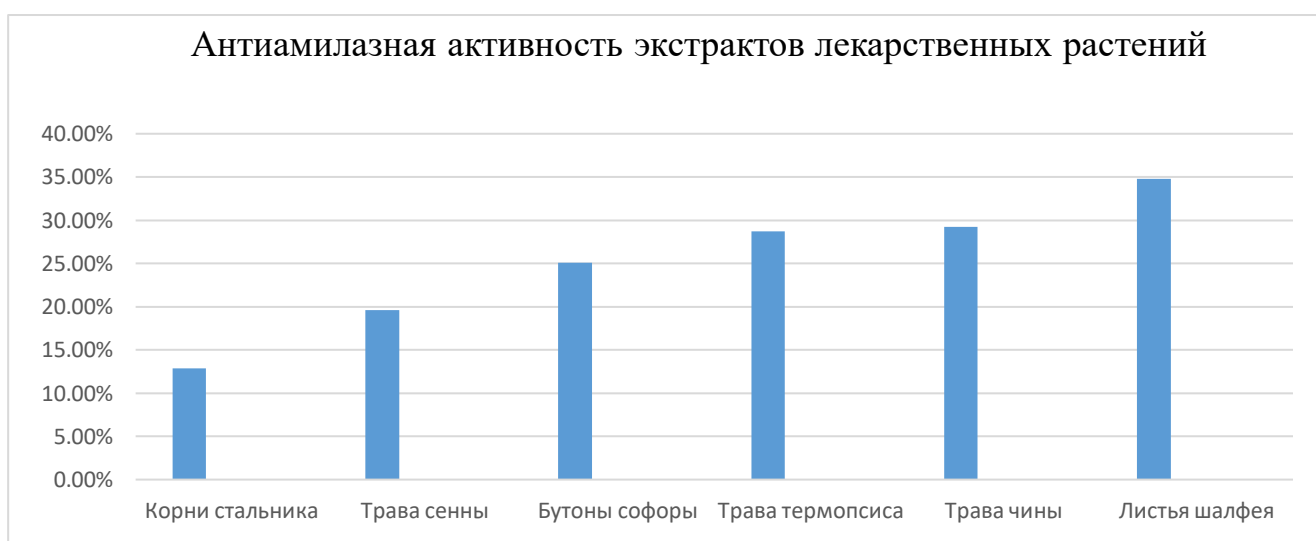


Рисунок 21 – Сравнительная характеристика антиамилазной активности извлечений из лекарственных растений

Таблица 16 – Ингибирующая амилазу активность извлечений из ЛРС

Сырье	% ингибирования амилазы
листья шалфея лекарственного (<i>Salviae officinalis folia</i>)	34,76%
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis L.</i>)	29,15%
трава термопсиса ланцетного (<i>Thermopsisidis lanceolatae herba</i>)	28,65%
бутоны софоры японской (<i>Sophora japonica L.</i>)	25,13%
листья сенны (<i>Sennae folia</i>)	19,64%
корни стальника полевого (<i>Ononis arvensis radices</i>)	12,92%

Спиртовые извлечения из травы донника, корней солодки, плодов люпина не обладали ярко выраженной способностью ингибировать амилазу в выбранных условиях. При снижении концентрации амилазы в 10 раз все извлечения проявили способность её ингибировать. Таким образом, наиболее выраженной антиамилазной активностью обладают извлечения из такого сырья, как корни стальника, трава сенны, бутоны софоры, трава термопсиса, трава чины и листья шалфея.

Статистическая обработка метода показала, что коэффициент вариации, % не превышал 15% и в среднем составил 7%.

Антиамилазная активность спиртовых извлечений обусловлена содержанием в них суммы биологически активных веществ. Согласно литературным источникам, ряд биологических соединений, таких как флавоноиды, дубильные вещества[111], органические кислоты[152], обладают способностью ингибировать амилазу [16]. Возможно, данными свойствами обладают и фитостеролы.

Для идентификации индивидуальных соединений, обладающих антиамилазной активностью, проводили исследование с использованием метода ТСХ.

5.2 Идентификация биологически активных соединений, обладающих антиамилазным эффектом

Для выявления компонентов, обладающих антиамилазной активностью, извлечения разделяли методом тонкослойной хроматографии.

Для разделения использовали систему растворителей гексан:этилацетат:кислота уксусная ледяная (20:9:1). Использование второй предложенной системы растворителей (гексан:этилацетат 3:1) в качестве подвижной фазы не обеспечило необходимого разделения компонентов, обладающих антиамилазной активностью. Методика хроматографирования описана в разделе 3.3.

Далее пластинку с разделенными извлечениями пропитывали раствором α -амилазы (600 мкл в 100 мл раствора), помещали в пластиковый контейнер, на дно которого налито небольшое количество воды. В углы контейнера прикрепляли небольшие пластиковые бруски так, чтобы пластинка не касалась воды. Пластинку инкубировали во влажной среде при температуре 37°C в течение 45 минут. Затем пластинку пропитывали раствором крахмала (0,3 г в 100 мл раствора) и таким же образом инкубировали в течение 20 минут. Далее пластинку промывали 0,1 н раствором йода в воде и оставляли на 5 минут до высыхания и фотографировали.

На пластинке видны синие пятна, соответствующие соединениям, способным ингибировать амилазу. Пример хроматограммы представлен на Рисунке 22. В Таблице 17 перечислены Rf зон подавления активности амилазы.

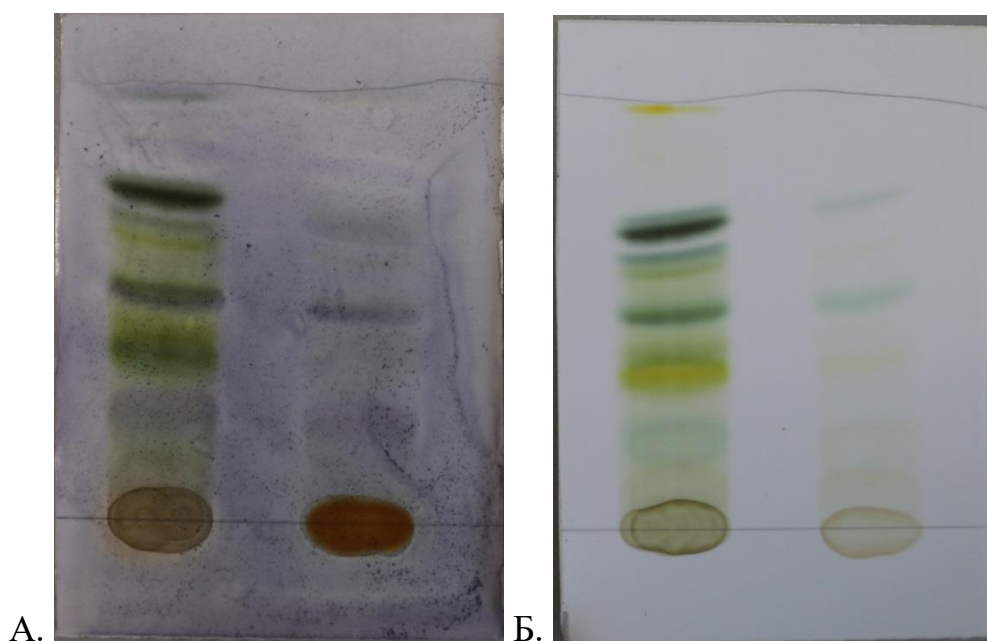


Рисунок 22 – А. ТСХ хроматограммы для определения антиамилазной активности спиртового извлечения из травы чины луговой (*Lathyrus pratensis L.*) (слева) и плодов люпина многолистного (*Lupinus polyphillus Lindl.*) (справа).

Б. Хроматограммы, полученные с использованием системы гексан:этилацетат:уксусная кислота (20:9:1)

Таблица 17 – Величины Rf соединений, обладающих антиамилазной активностью

Сырье	Зоны ингибирования α -амилазы
корни солодки (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	Rf = 0,57; 0,87
трава донника лекарственного (<i>Meliloti herba</i>)	Rf = 0,23; 0,8
корни стальника полевого (<i>Ononis arvensis radices</i>)	Rf = 0,57; 0,87
листья сенны (<i>Sennae folia</i>)	Rf = 0,28; 0,56; 0,77
трава термопсиса ланцетного (<i>Thermopsis lanceolatae herba</i>)	Rf = 0,27; 0,84
софоры японской бутоны (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	Rf = 0,87
листья шалфея лекарственного (<i>Salviae officinalis folia</i>)	Rf = 0,26; 0,77
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	Rf = 0,23; 0,63; 0,8
травы козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	Rf = 0,87
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	Rf = 0,56; 0,76
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	Rf = 0,25; 0,5; 0,64; 0,84
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	Rf = 0,25; 0,5; 0,84

На всех хроматограммах наблюдается зона подавления активности амилазы со значением $Rf \approx 0,8$, что совпадает со значением Rf β -ситостерола. Таким образом, можно предположить, что фитостеролы, содержащиеся в спиртовых извлечениях из ЛРС, также обладают антиамилазным эффектом.

5.3 Подтверждение антиамилазной активности β -ситостерола методом ГХ-МС

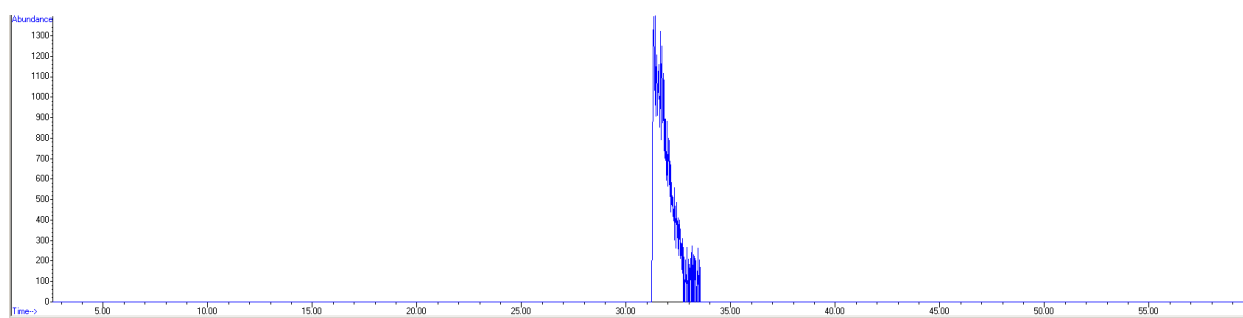
Для подтверждения антиамилазной активности β -ситостерола спиртовые извлечения разделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей гексан:этилацетат:кислота уксусная ледяная (20:9:1) согласно методике, описанной в разделе 3.3. После просушивания пластинки область с R_f 0,8, соответствующую области подавления активности амилазы, а также 1-2 мм выше и ниже этой области соскребали и помещали в пробирку. Биологически активные вещества экстрагировали 250 мкл дихлорметана, встряхивали в течение 2 минут и центрифугировали при 20000 об/мин в течение 5 минут. Далее проводили анализ как описано в разделе 4.2 методом ГХ-МС.

Параллельно выполняли аналогичные испытания стандартного раствора β -ситостерола (1,0 мг/мл).

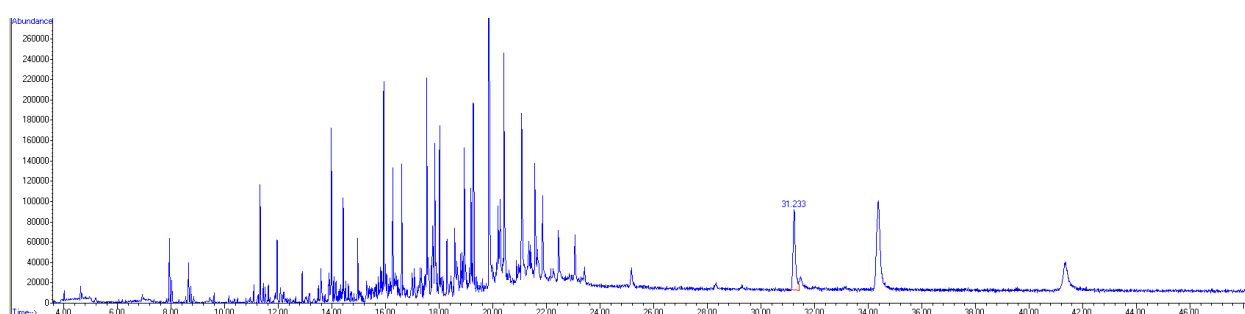
На хроматограммах экстрактов наблюдался пик, по времени удерживания соответствующий пику β -ситостерола на хроматограмме стандартного раствора. Масс-спектр наблюдаемого пика на хроматограммах экстрактов соответствовал масс-спектру β -ситостерола из библиотеки спектров так же, как и масс-спектр стандартного раствора.

На Рисунке 23 представлены хроматограммы извлечения из травы чины луговой и стандартного раствора β -ситостерола соответственно. Таким образом, можно предположить, что β -ситостерол ингибирует активность амилазы.

А.



Б.



В.

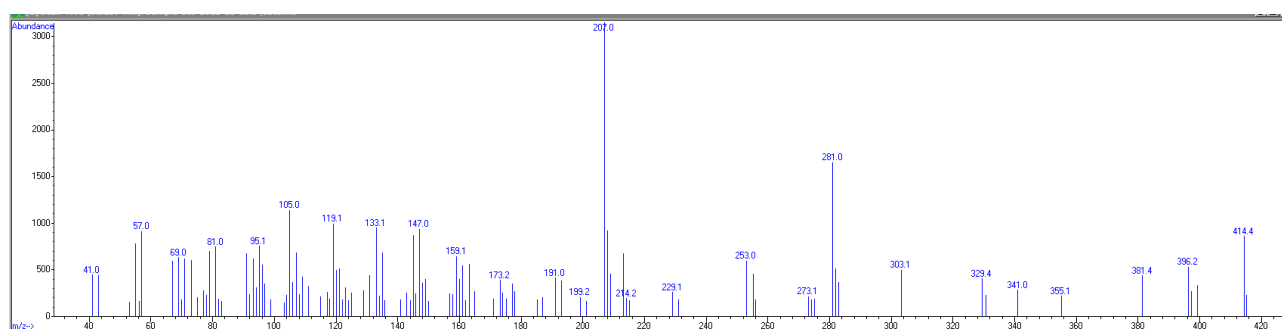


Рисунок 23 – А – Хроматограмма, полученная методом ГХ-МС, спиртового извлечения из травы чины луговой; Б – хроматограмма стандартного раствора β -ситостерола; В – масс-спектр β -ситостерола

5.4 Подтверждение антиамилазной активности β -ситостерола методом спектрофотометрии

Анализ ингибирующей активности β -ситостерола проводили в следующих условиях:

К 50 мкл раствора фермента (1:100000) добавляли 50 мкл воды дистиллированной, 40 мкл спиртового раствора β -ситостерола 0,25 мг/мл и 160 мкл буферного раствора рН 6,86. Смесь встряхивали и инкубировали при 37°C в течение 20 минут. К смеси добавляли 400 мкл крахмала. Смесь встряхивали и инкубировали в термостате при 37°C в течение 15 минут. Для количественной оценки выделившейся глюкозы 600 мкл смеси добавляли к 300 мкл раствора ДНС-реактива и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин в закрытых сосудах. После охлаждения к смеси добавляли 5,1 мл дистиллированной воды, перемешивали и измеряли оптическую плотность при 540 нм. Раствор сравнения – дистиллированная вода. Расчёты проводили по формуле, приведенной в разделе 5.1.

β -ситостерол ингибирует 15,3% амилазы. Статистическая обработка метода показала, что коэффициент вариации не превышал 13% и в среднем составил 6%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Доказано, что все 12 спиртовых извлечений из ЛРС обладают способностью ингибировать амилазу.
2. Наибольшей антиамилазной активностью обладают извлечения из листьев шалфея (*Salviae officinalis folia*), травы чины (*Lathyrus pratensis* L.), травы термопсиса (*Thermopsis lanceolatae herba*), бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.), травы сенны (*Sennae folia*), корней стальника (*Ononis arvensis radices*).
3. β -ситостерол – одно из БАВ, входящее в состав ЛРС, которое обладает антиамилазной активностью.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое исследование научных данных о физико-химических свойствах, источниках, фармакологических эффектах и методах анализа и экстракции фитостеролов. Их используют при дислипидемии для снижения уровня холестерина в крови, при доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Описаны положительное воздействие фитостеролов при болезни Альцгеймера, при раке различных органов, есть сообщения о возможном противодиабетическом эффекте фитостеролов.

Поскольку фитостеролы обладают высокой липофильностью, для их извлечения используют неполярные экстрагенты. Для качественного определения фитостеролов используют методы ТСХ и качественные реакции. Для количественного определения фитостеролов используют как спектральные, так и хроматографические методы, наиболее специфичным и достоверным из которых является метод ГХ-МС.

2. Экспериментально установлены оптимальные условия экстрагирования БАВ из изучаемого ЛРС. Установлено, что нетоксичным и эффективным экстрагентом для извлечения фитостеролов является этанол 95%. В качестве пробоподготовки из лекарственного растительного сырья получены спиртовые извлечения.

Подобраны условия качественного определения фитостеролов в ЛРС методом ТСХ. Оптимальными составами подвижных фаз являются: гексан : этилацетат 3:1 и гексан : этилацетат : уксусная кислота ледяная (20:9:1). Для детектирования фитостеролов целесообразно использовать спиртовой раствор ванилина серноокислого с последующим нагреванием до 100-105°C и 10% раствор серной кислоты в спирте с последующим нагреванием до 100-105°C и УФ-свет при длине волны 254 нм. Фитостеролы были обнаружены во всех спиртовых извлечениях из ЛРС.

3. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в ЛРС методом спектрофотометрии. Пробоподготовка заключается в щелочном гидролизе спиртовых извлечений и

дальнейшей экстракции липофильных соединений в гексан. В основе количественного определения лежит реакция фитостеролов с ванилином в среде серной кислоты концентрированной. Максимум поглощения при длине волны около 545 нм.

Проведена валидация методики, предел обнаружения – 0,08 мкг/мл, предел количественного определения 0,24 мкг/мл. Доказаны линейность, прецизионность и правильность методики в диапазоне концентраций 0,2-1,8 мг/мл. Относительная ошибка не превышала 4,1 %. Разработанная методика предусматривает использование доступного оборудования, однако не позволяет идентифицировать индивидуальные фитостеролы и обладает недостаточной специфичностью.

4. Разработана и валидирована методика количественного определения фитостеролов в ЛРС методом ГХ-МС в пересчёте на β -ситостерол. Оптимальным является использование колонки HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, неподвижная фаза, содержащая 5% фенил, 95% метилсилоксана, толщиной 0,25 мкм. Газ носитель – гелий, скорость потока – 0,8 мл/мин.

В качестве стандарта использовали раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ChemStationE 02.00. Время удерживания β -ситостерола составила 32,237 мин.

Данная методика обладает высокой специфичностью, предел количественного определения – 0,1 нг/мл, доказаны линейность, прецизионность и правильность методики в диапазоне от 0,05 мг/мл до 50,0 мг/мл. Наибольшее суммарное количество фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол было обнаружено в лекарственном растительном сырье: трава чины луговой (*Lathyrus pratensis L.*) – 5,605 мг/мл, трава козлятника восточного (*Galega orientalis Lam.*) – 9,431 мг/мл, плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus Lindl.*) – 8,102 мг/мл.

5. Проведено изучение стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС в условиях хранения при 20°C в течение 6 месяцев. Помимо этого определяли органолептические свойства спиртовых извлечений, сухой остаток, содержание спирта. Во всех спиртовых извлечениях незначительно уменьшается содержание фитостеролов и наблюдается изменение цвета и

выпадение небольшого осадка. Наиболее стабильным является спиртовое извлечение из корней солодки.

6. В ходе исследования антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС было установлено, что наибольшая антиамилазная активность наблюдается у экстрактов листьев шалфея (*Salviae officinalis folia*), экстракта травы чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), экстракта травы термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolatae herba*). Обоснована и доказана антиамилазная активность β -ситостерола.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Практические данные, полученные в ходе диссертационного исследования о количественном содержании фитостеролов в растительном сырье и антиамилазной активности β -ситостерола позволяют расширить сведения о составе фармакопейного и нефармакопейного лекарственного растительного сырья и его возможных фармакологических эффектах. Разработанные методики целесообразно использовать в учебном и научном процессе при преподавании фармакогнозии, а также при разработке критериев контроля качества растительного сырья и фитопрепаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ВМС – высокомолекулярное соединение

ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ГРЛС – Государственный реестр лекарственных средств

ГФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-детектированием

ДНС – динитрисалициловая кислота

ИК- спектрометрия – инфракрасная спектрометрия

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

УФ-спектрометрия – ультрафиолетовая спектрометрия

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная Фармакопея XIV изд. [Электронный ресурс]. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.(дата обращения 20.07.2022).
2. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/>.(дата обращения 20.07.2022).
3. ВФС 42-341-74.
4. Перова Н. В., Хучиева М. А. Растительные стерины и станолаы в профилактике болезней системы кровообращения // Кардиология и ангиология. – 2011. – № 1. – С. 64–69.
5. Филимонова С.М., Щепочкина О.Ю., Кузнецов Р.М., Стреляева А. В. / Разработка и валидация методики количественного определения фитостеролов в экстрактах спиртовых из растительного сырья // Сборник тезисов 75-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 120-летию санитарно-эпидемиологической службы города Ярославля, Россия, 2021. – С. 231-232.
6. Филимонова С.М. Сравнительное изучение методов экстракции и идентификации фитостеролов / С.М. Филимонова, О.Ю. Щепочкина, Ю.В. Медведев [и др.] // Естественные и технические науки. – 2019. – № 137 (11). – С. 219 – 224.
7. Филимонова С.М. Разработка ТСХ методики идентификации фитостеролов в спиртовом экстракте листьев шалфея / С.М. Филимонова, О.Ю. Щепочкина, Е.С. Мельников [и др.] // Естественные и технические науки. – 2019. – № 137 (11). – С. 225 –227.
8. Филимонова С.М., Щепочкина О. Ю. / Разработка и валидация методики количественного определения липофильных тритерпеноидов в сырье лекарственных растений методом спектрофотометрии // Серия конференций ЗКМУ имени Марата Оспанова, Казахстан, 2022, (XVII). – С. 111–113
9. Хучиева М. А., Перова Н. В. Рандомизированные исследования

«функциональных» продуктов, обогащенных растительными стеринами и станолами: эффективность в коррекции дислипидемий // Атеросклероз. – 2014. – № 2 (10). – С. 5–13.

10. Щепочкина О.Ю. Применение методов ТСХ и ГХ/МС для оценки качества лекарственного растительного сырья, содержащего фитостеролы. Биофармацевтический журнал / О.Ю. Щепочкина, А.В. Стреляева, С.М. Филимонова [и др.] // Биофармацевтический журнал. 2021. – № 13 (5). С. 38 – 44.

11. Adams J. D. [и др.]. Β-Sitosterol Lithospermate From *Salvia Columbariae* // Open Natural Products Journal. – 2012. – №5. – С. 13–15.

12. Adu J. K. [и др.]. Validation of a Simple and Robust Liebermann-Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana // International Journal of Food Science. – 2019. – 2019.

13. Afouxenidi A., Milošević-Ifantis T., Skaltsa H. Secondary metabolites from *Stachys tetragona* Boiss. & Heldr. ex Boiss. and their chemotaxonomic significance // Biochemical Systematics and Ecology. – 2018. – № 81. – С. 83–85.

14. Agatonovic-Kustrin S. [и др.]. High-performance thin-layer chromatographic methods in the evaluation of the antioxidant and anti-hyperglycemic activity of *Myrmecodia platytyrea* as a promising opportunity in diabetes treatment // Journal of Chromatography A. – 2017. – 1530. – С. 192–196.

15. Aisyah S. [и др.]. Compositional changes in (iso)flavonoids and estrogenic activity of three edible *Lupinus* species by germination and Rhizopus-elicitation // Phytochemistry. – 2016. – 122. – С. 65–75.

16. Ali Asgar M. Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review // International Journal of Food Properties. – 2013. – № 1 (16). – С. 91–103.

17. Alkhalaf M. I. [и др.]. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract // Journal of King Saud University - Science. – 2019. – № 4 (31). – С. 1358–1362.

18. Alvarez-Sala A. [и др.]. Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol (β -sitosterol) in human cancer cell lines // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2019. – № 3 (70). – С. 323–334.

19. Amorim T. L., Oliveira M. A. L. de Advances in Lipid Capillary Electromigration Methods to Food Analysis Within the 2010s Decade // *Food Analytical Methods*. – 2020. – № 7 (13). – С. 1503–1522.
20. Araújo L. B. D. C. [и др.]. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2013. – № 5 (23). – С. 736–742.
21. Awad A. B. [и др.]. β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells // *Phytomedicine*. – 2007. – № 11 (14). – С. 747–754.
22. Ayaz M. [и др.]. Anti-Alzheimer's studies on β -sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – № 8. – С. 1–16.
23. Azimi M. [и др.]. Separation and Purification of Effective Ingredient of Galegine from *Galega officinalis* L. by Column Chromatography Tandemed with Molecularly Imprinted Polymer Enforced by Graphene Oxide (GO-MIP) Technique // *Journal of Medicinal plants and By-product*. – 2020.
24. Di Battista C. A., Ramírez-Rigo M. V., Piña J. Microencapsulation of phytosterols by spray drying // *Studies in Natural Products Chemistry*. – 2018. – Т. 56. – С. 437-468.
25. Bend J. [и др.]. Evaluation of certain food additives // *World Health Organization - Technical Report Series*. – 2009. – № 952. – С. 1–208.
26. Berge K. E. [и др.]. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters // *Science*. – 2000. – № 5497 (290). – С. 1771–1775.
27. Beveridge T. H. J. [и др.]. Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – № 5 (53). – С. 1799–1804.
28. Blanco-Vaca F., Cedó L., Julve J. Phytosterols in Cancer: From Molecular Mechanisms to Preventive and Therapeutic Potentials // *Current Medicinal Chemistry*. – 2018. – № 37 (26). – С. 6735–6749.
29. Burčová Z. [и др.]. Antibacterial and antifungal activity of phytosterols and methyl dehydroabietate of Norway spruce bark extracts // *Journal of Biotechnology*. – 2018. – № 282. – С. 18–24.

30. Burg V. K. [и др.]. Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – № 41 (33). – С. 16072–16087.
31. Chang M. [и др.]. Characterization of fatty acids, triacylglycerols, phytosterols and tocopherols in peony seed oil from five different major areas in China // *Food Research International*. – 2020. – № 137. – С. 109416.
32. Chanioti S., Tzia C. Evaluation of ultrasound assisted and conventional methods for production of olive pomace oil enriched in sterols and squalene // *Lwt*. – 2019. – № 2018 (99). – С. 209–216.
33. Child P., Kuksis A. Critical role of ring structure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations in vitro // *Journal of Lipid Research*. – 1983. – № 9 (24). – С. 1196–1209.
34. Child P., Kuksis A. Investigation of the role of micellar phospholipid in the preferential uptake of cholesterol over sitosterol by dispersed rat jejunal villus cells // *Biochemistry and Cell Biology*. – 1986. – № 8 (64). – С. 847–853.
35. Davis D. L., Poneleit C. G. Sterol Accumulation and Composition in Developing *Zea mays* L. Kernels // *Plant Physiology*. – 1974. – № 5 (54). – С. 794–796.
36. Davis D. L., Poneleit C. G. Sterols in developing seed from low and high oil *Zea mays* strains // *Phytochemistry*. – 1975. – № 5–6 (14). – С. 1201–1203.
37. Dewick P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition* / P. M. Dewick. – 2009.
38. Drenin A. A., Botirov E. K. Flavonoids and isoflavones of plants of the genus *trifolium* L. Structural diversity and biological activity // *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. – 2017. – № 3. – С. 39–53.
39. Duong S. [и др.]. Influence of acid hydrolysis, saponification and sample clean-up on the measurement of phytosterols in dairy cattle feed using GC–MS and GC with flame ionization detection // *Journal of Separation Science*. – 2018. – № 17 (41). – С. 3467–3476.
40. EDQM *European Pharmacopoeia Eighth Edition* // EDQM Publication ID (EPID). 2013. (1 and 2). – С. 437.

41. Edwin-wosu N. Evaluation of Bioactive Compounds in Mangroves : A Panacea towards Exploiting and Optimizing Mangrove Resources Evaluation of Bioactive Compounds in Mangroves : A Panacea towards Exploiting and Optimizing Mangrove Resources. – 2019. № 2015 (5). – С. 1–9.
42. Ekezie F. G. C., Sun D. W., Cheng J. H. Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments // Trends in Food Science and Technology. – 2017. – 67. – С. 160–172.
43. Ekinici M. S., Gürü M. Extraction of phytosterols from melon (*Cucumis melo*) seeds by supercritical CO₂ as a clean technology // Green Processing and Synthesis. – 2019. – № 1 (8). – С. 677–682.
44. Fan Y. H. [и др.]. Structures and In Vitro Antihepatic Fibrosis Activities of Prenylated Dihydrostilbenes and Flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Leaves // Journal of Food Science. – 2019. – № 5 (84). – С. 1224–1230.
45. Fang N., Yu S., Badger T. M. Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – № 11 (51). – С. 3260–3267.
46. Fathi-Achachlouei B. [и др.]. Microwave pretreatment as a promising strategy for increment of nutraceutical content and extraction yield of oil from milk thistle seed // Industrial Crops and Products. – 2019. – № 2018 (128). – С. 527–533.
47. Feng S. [и др.]. Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2020. – № 4 (19). – С. 1243–1267.
48. Fernanda M. [и др.]. Trends in Analytical Chemistry Gas chromatography – mass spectrometry for characterisation , assessment of quality and authentication of seed and vegetable oils // Trends in Analytical Chemistry. – 2021. – 138. – С. 116238.
49. Fernando I. P. S. [и др.]. Identification of sterols from the soft coral *Dendronephthya gigantea* and their anti-inflammatory potential // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2017. – № (55). – С. 37–43.

50. Gachumi G., El-aneed A. Mass Spectrometric Approaches for the Analysis of Phytosterols in Biological Samples. – 2017. – С. 10141–10156.
51. García-Llatas G., Rodríguez-Estrada M. T. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2011. – № 6 (164). – С. 607–624.
52. Ghorbani M. [и др.]. A non-insulin herbal treatment to improve liver tissue in diabetic rats through gavage of walnut oil enriched with a phytosterol // *Cogent Biology*. – 2019. – № 1 (5). – С. 1648628
53. Granato D. [и др.]. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety // *Annual Review of Food Science and Technology*. – 2020. – (11). – С. 93–118.
54. Grattan B. J. Plant sterols as anticancer nutrients: Evidence for their role in breast cancer // *Nutrients*. – 2013. – № 2 (5). – С. 359–387.
55. Hannan M. A. [и др.]. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology // *Phytomedicine*. – 2020. № 69. – С. 153201.
56. Hashim S. N. N. S. [и др.]. Parallel enrichment of polyphenols and phytosterols from Pinot noir grape seeds with molecularly imprinted polymers and analysis by capillary high-performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry // *Talanta*. – 2020. – № 2019 (208). – С. 120397.
57. He W. Sen, Zhu H., Chen Z. Y. Plant Sterols: Chemical and Enzymatic Structural Modifications and Effects on Their Cholesterol-Lowering Activity // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2018. – № 12 (66). – С. 3047–3062.
58. Grundy S. M. Prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: why are the benefits of lifestyle therapies neglected? // *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. – 2005. – Т. 10. – №. 2. – С. 73-86.
59. Herchi W. [и др.]. Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2009. – № 10 (47). – С. 880–885.
60. Heydari H. [и др.]. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of some lathyrus L. (fabaceae) species growing in Turkey // *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*.

– 2019. – № 2 (16). – С. 240–245.

61. Indian Pharmacopoeia Commition Indian Pharmacopoeia // – 2018. – Т. 3.

62. Isanga J., Zhang G. N. Soybean bioactive components and their implications to health - A review // Food Reviews International. – 2008. – № 2 (24). – С. 252–276.

63. Jafarian Asl P., Niazmand R., Jahani M. Theoretical and experimental assessment of supercritical CO₂ in the extraction of phytosterols from rapeseed oil deodorizer distillates // Journal of Food Engineering. – 2020. – № 2019 (269). – С. 109748.

64. Jafarian Asl P., Niazmand R., Yahyavi F. Extraction of phytosterols and tocopherols from rapeseed oil waste by supercritical CO₂ plus co-solvent: A comparison with conventional solvent extraction // Heliyon. – 2020. – № 3 (6). – С. e03592.

65. Jiang L. [и др.]. The protective effect of dietary phytosterols on cancer risk: a systematic meta-analysis // Journal of Oncology. – 2019. – Т. 2019.

66. Jong A. De, Plat J., Mensink R. P. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review) // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2003. – № 7 (14). – С. 362–369.

67. Ju Y. H. [и др.]. β -Sitosterol, β -Sitosterol Glucoside, and a Mixture of β -Sitosterol and β -Sitosterol Glucoside Modulate the Growth of Estrogen-Responsive Breast Cancer Cells in Vitro and in Ovariectomized Athymic Mice // Journal of Nutrition. – 2004. – № 5 (134). – С. 1145–1151.

68. Kamgang F. [и др.]. Development of an innovative phytosterol derivatization method to improve the HPLC-DAD analysis and the ESI-MS detection of plant sterols / stanols // Food Research International. – 2020. – № 131. – С. 108998.

69. Kangsamaksin T. [и др.]. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- α // PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 12. – С. e0189628.

70. Khuchieva M. A., Perova N. V., Akhmedzhanov N. M. Plant sterols and stanols as dietary factors reducing hypercholesterolemia by inhibiting intestinal cholesterol absorption // Cardiovascular Therapy and Prevention (Russian Federation). – 2011. – № 6 (10). – С. 124–132.

71. Kiprono P. C. [и др.]. The in vitro anti-fungal and anti-bacterial activities of β -sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae) // Zeitschrift für Naturforschung C. – 2000.

– Т. 55. – №. 5-6. – С. 485-488.

72. Klingberg S. [и др.]. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden // *The American journal of clinical nutrition*. – 2008. – Т. 87. – №. 4. – С. 993-1001.

73. Komarova A. O., Shashkov M. V., Sidel'nikov V. N. Study of methyl- and phenyl-substituted thermostable polysiloxane–silarylene motionless phases for capillary gas chromatography // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2017. – № 11 (91). – С. 2252–2259.

74. Kozłowska M. [и др.]. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds // *Food Chemistry*. – 2016. – 213. – С. 450–456.

75. Kumar S. S. [и др.]. Chemical composition, nutraceuticals characterization, NMR confirmation of squalene and antioxidant activities of: *Basella rubra* L. seed oil // *RSC Advances*. – 2020. – № 53 (10). – С. 31863–31873.

76. Kumari B. [и др.]. Recent Advances on Application of Ultrasound and Pulsed Electric Field Technologies in the Extraction of Bioactives from Agro-Industrial By-products // *Food and Bioprocess Technology*. – 2018. – № 2 (11). – С. 223–241.

77. Kwon Y. Use of saw palmetto (*Serenoa repens*) extract for benign prostatic hyperplasia // *Food Science and Biotechnology*. – 2019. – № 6 (28). – С. 1599–1606.

78. Lagarda M. J., García-Llatas G., Farré R. Analysis of phytosterols in foods // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. № 5 (41). С. 1486–1496.

79. Le C. F. [и др.]. Phytosterols isolated from *Clinacanthus nutans* induce immunosuppressive activity in murine cells // *International Immunopharmacology*. – 2017. – 44. – С. 203–210.

80. Lea L. J., Hepburn P. A. Safety evaluation of phytosterol-esters. Part 9: Results of a European post-launch monitoring programme // *Food and Chemical Toxicology*. – 2006. – № 8 (44). – С. 1213–1222.

81. Lee J. [и др.]. Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in *Artemisia apiacea* by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector // *Pharmacognosy Magazine*. – 2015. – № 42 (11). – С. 297–303.

82. Lee J. H. [и др.]. A multiplex phytosterol assay utilizing gas chromatography-mass spectrometry for diagnosis of inherited lipid storage disorders // *Annals of Laboratory Medicine*. – 2019. – № 4 (39). – С. 411–413.
83. Li T. S. C., Beveridge T. H. J., Drover J. C. G. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification // *Food Chemistry*. – 2007. – № 4 (101). – С. 1633–1639.
84. Liu R. [и др.]. Antioxidant interaction of α -tocopherol, γ -oryzanol and phytosterol in rice bran oil // *Food Chemistry*. 2021. № September 2020 (343). С. 128431.
85. Liu Y. [и др.]. Rapid determination of phytosterols by NIRS and chemometric methods // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2019. – 211. – С. 336–341.
86. Lu K. [и др.]. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: Genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively // *American Journal of Human Genetics*. – 2001. – № 2 (69). – С. 278–290.
87. Mab P. D. [и др.]. Phytosterols decrease prostaglandin release in cultured P388D1/MAB macrophages // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. – 2004. – Т. 70. – №. 6. – С. 511-520.
88. Madanat H. M., Antary T. M. Al, Zarga M. H. A. Identification and Isolation of the Insecticidal Compounds From *Robinia Pseudoacaci* *Insecticidal Compounds From // Fresenius Environmental Bulletin*. – 2018. – № 3. – С. 1838–1849.
89. Massa T. B. [и др.]. Pumpkin (*Cucurbita maxima*) by-products: Obtaining seed oil enriched with active compounds from the peel by ultrasonic-assisted extraction // *Journal of Food Process Engineering*. – 2019. – № 5 (42). – С. 1–12.
90. Mattson H., Crouse R. Optimizing cholesterol the effect absorption of plant sterols in man // *Sciences New York*. – 1982. – № 4 (35). – С. 697–700.
91. McCann S. E. [и др.]. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups // *Journal of Nutrition*. – 2003. – № 6 (133). – С. 1937–1942.

92. McClements D. J., Decker E. A., Weiss J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components // *Journal of Food Science*. – 2007. – № 8 (72). – С. 109–124.
93. Meguro S. [и др.]. Solubilization of phytosterols in diacylglycerol versus triacylglycerol improves the serum cholesterol-lowering effect // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – № 7 (55). – С. 513–517.
94. Mello B. T. F. de [и др.]. Methyl acetate as solvent in pressurized liquid extraction of crambe seed oil // *Journal of Supercritical Fluids*. – 2019. № 2018 (145). – С. 66–73.
95. Mendilaharsu M. [и др.]. Phytosterols and risk of lung cancer: A case-control study in Uruguay // *Lung Cancer*. – 1998. – № 1 (21). – С. 37–45.
96. Miraliakbari H., Shahidi F. Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents // *Journal of Food Lipids*. – 2008. – Т. 15. – №. 1. – С. 81-96.
97. Monu E. [и др.]. Phytosterol effects on milk and yogurt microflora // *Journal of Food Science*. – 2008. – № 3 (73). – С. 121–126.
98. Moon J. [и др.]. Simultaneous quantification of 18 saturated and unsaturated fatty acids and 7 sterols as their tert-butyl dimethylsilyl derivatives in human saliva using gas chromatography-tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. – 2018. – № 1092. – С. 114–121.
99. Morais M. G. [и др.]. Antioxidant and anti-inflammatory effects of fractions from ripe fruits of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) and putative identification of bioactive compounds by GC-MS and LC-DAD-MS // *Food Research International*. – 2022. – Т. 156. – С. 111145.
100. Moreau R. A. [и др.]. Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses // *Progress in Lipid Research*. – 2018. – Т. 70. – С. 35-61.
101. Mwaurah P. W. [и др.]. Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2020. – № 1 (19). – С. 3–20.
102. Myers S. P., Vigar V. Effects of a standardised extract of *Trifolium pratense* (Promensil) at a dosage of 80 mg in the treatment of menopausal hot flushes: A

- systematic review and meta-analysis // *Phytomedicine*. – 2017. – 24. – С. 141–147.
103. Nadar S. S., Rao P., Rathod V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review // *Food Research International*. – 2018. – № 108. – С. 309–330.
104. Narváez-Cuenca C. E. [и др.]. The phenolic compounds, tocopherols, and phytosterols in the edible oil of guava (*Psidium guava*) seeds obtained by supercritical CO₂ extraction // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2020. – № 2019 (89). – С. 103467.
105. Nes W. D. [и др.]. Biosynthesis of phytosterols: Kinetic mechanism for the enzymatic C-methylation of sterols // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – № 36 (278). – С. 34505–34516.
106. Newman C. W., Newman R. K., Fastnaught C. E. Barley // *Whole Grains and their Bioactives: Composition and Health*. – 2019. – С. 135-167.
107. Nguyen T. T. [и др.]. Fatty Acids, Tocopherols, and Phytosterol Composition of Seed Oil and Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fresh Seeds from Three *Dalbergia* Species Grown in Vietnam // *Processes*. – 2020. – Т. 8. – №. 5. – С. 542.
108. Nicholls K. W., Bohm B. A. Flavonoids and affinities of some North American lupines // *Canadian Journal of Botany*. – 1983. – № 3 (61). – С. 708–730.
109. Noormazlinah N. [и др.]. Extraction of Phytosterol Concentration in Different Legume Pods by Using Microwave-Assisted Hydrodistillation // *Indonesian Journal of Chemistry*. – 2019. – № 3 (19). – С. 796.
110. Nzekoue F. [и др.]. Spent coffee grounds: A potential commercial source of phytosterols // *Food Chemistry*. – 2020. – Т. 325. – С. 126836.
111. Ogawa S., Yazaki Y. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin determination and biological activities // *Molecules*. – 2018. – № 4 (23). – С. 1–18.
112. Ostlund R. E. [и др.]. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Δ^5 -phytosterols and phytostanols in humans // *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. – 2002. – № 445-4 (282). – С. 911–916.
113. Park S. J. [и др.]. The ameliorating effects of stigmasterol on scopolamine-induced memory impairments in mice // *European Journal of Pharmacology*. – 2012. – № 1–3

(676). – С. 64–70.

114. Paul E. [и др.]. Antioxidant molecules from plant waste: Extraction techniques and biological properties //Processes. – 2020. – Т. 8. – №. 12. – С. 1566.

115. Piironen V. [и др.]. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2000. – № 7 (80). – С. 939–966.

116. Piironen V., Toivo J., Lampi A. M. Plant sterols in cereals and cereal products // Cereal Chemistry. – 2002. – № 1 (79). – С. 148–154.

117. P Pimentel-Moral S. [и др.]. Recent advances in extraction technologies of phytochemicals applied for the revaluation of agri-food by-products //Functional and preservative properties of phytochemicals. – 2020. – С. 209-239.

118. Plat J. [и др.]. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters // European Journal of Clinical Nutrition. – 2000. – № 9 (54). – С. 671–677.

119. Pokkanta P. [и др.]. Cholecalciferol and phylloquinone in rice bran and vegetable oil samples // Food Chemistry. – 2019. – № 2018 (271). – С. 630–638.

120. Ramanpreet G. R. C., Kaur M. Determination of Lupeol and β -Sitosterol from *Solanum nigrum* //L. J Genet Cell Biol. – 2019. – Т. 2. – №. 2. – С. 68-71.

121. Radenkovs V. [и др.]. Valorization of wild apple (*Malus spp.*) by-products as a source of essential fatty acids, tocopherols and phytosterols with antimicrobial activity // Plants. – 2018. – № 4 (7). – С. 1–18.

122. Ramabulana T. [и др.]. Phytochemical Profiling and Isolation of Bioactive Compounds from *Leucosidea sericea* (Rosaceae) // ACS Omega. – 2022. – № 14 (7). – С. 11964–11972.

123. Ramadan M. F., Zayed R., El-Shamy H. Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some solanaceae plants // Food Chemistry. – 2007. – № 3 (103). – С. 885–890.

124. Reynauld J., Ismaili A., Jay M. Flavonoid glycosides of *Lathyrus pratensis* leguminosae //Phytochemistry. – 1981. – Т. 20. – №. 8. – С. 2052-2053.

125. Roche J. [и др.]. Effect of sowing dates on fatty acids and phytosterols patterns of *Carthamus tinctorius* L // *Applied Sciences*. – 2019. – Т. 9. – №. 14. – С. 2839.
126. Rotta E. M. [и др.]. Ultrasound-assisted saponification coupled with gas chromatography-flame ionization detection for the determination of phytosterols from passion fruit seed oil // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2018. – № 3 (29). – С. 579–586.
127. Ryan E. [и др.]. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2007. – № 3 (62). – С. 85–91.
128. Saad N. [и др.]. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Pomace // *Journal of Food Science*. – 2019. – № 6 (84). – С. 1371–1381.
129. Saiman M. Z., Mustafa N. R., Verpoorte R. Analysis of Terpenoid Indole Alkaloids, Carotenoids, Phytosterols, and NMR-Based Metabolomics for *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – (1815). – С. 437–455.
130. Santos K. A. [и др.]. Evaluation of favela seed oil extraction with alternative solvents and pressurized-liquid ethanol // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2021. – Т. 169. – С. 105125
131. Saraiva D. [и др.]. Evaluation of Phytosterols in Milk and Yogurts Used as Functional Foods in Portugal // *Food Analytical Methods*. – 2011. – № 1 (4). – С. 28–34.
132. Schantz M. M. [и др.]. Development of saw palmetto (*Serenoa repens*) fruit and extract standard reference materials // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – № 3 (392). – С. 427–438.
133. Seppänen-Laakso T., Nygren H., Rischer H. UPLC-ELSD Analysis of Algal Lipid Classes and Derivatization of Bound and Free Fatty Acids and Sterols for GC-MS Methods // *Methods in Molecular Biology*. – 2020. – 1980. – С. 223–232.
134. Shaarani S. [и др.]. Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: A review // *Separation Science and Technology*. – 2018. – Т. 53. – №.

14. – С. 2206-2223.

135. Shahzad N. [и др.]. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2017. – 88. – С. 786–794.

136. Shuang R., Rui X., Wenfang L. Phytosterols and Dementia // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2016. – № 4 (71). – С. 347–354.

137. Society of Japanese Pharmacopoeia the Japanese Pharmacopoeia // *Fourteenth Edition*. – 2001. – С. 885.

138. Sudeep H. V. [и др.]. A phytosterol-enriched saw palmetto supercritical CO₂ extract ameliorates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by regulating the inflammatory and apoptotic proteins in a rat model // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2019. – № 1 (19). – С. 1–10.

139. Suzuki M., Muranaka T. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis // *Lipids*. – 2007. № 1 (42). С. 47–54.

140. Talreja, T., Kumar, M., Goswami, A., Gahlot, G., Jinger, A. K. & Sharma T. Qualitative and Quantitative Estimation of Phytosterols in *Achyranthes aspera* and *Cissus quadrangularis* by HPLC // *The Pharma Innovation Journal*. – 2017. – № 1 (6). – С. 76–79.

141. The Department Of Health And Social Care British Pharmacopoeia / The Department Of Health And Social Care, London. – 2020.

142. Toiu A. [и др.]. Comparative phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and in vivo anti-inflammatory activity of different extracts of traditionally used Romanian *Ajuga genevensis* L. and *A. reptans* L.(Lamiaceae) // *Molecules*. – 2019. – Т. 24. – №. 8. – С. 1597.

143. Thi H. T. [и др.]. Screening of fatty acids, saccharides, and phytochemicals in *Jatropha curcas* seed kernel as their trimethylsilyl derivatives using gas chromatography/mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. – 2018. – Т. 1102. – С. 66-73.

144. Tundis R. [и др.]. An Insight into *Salvia haematodes* L.(Lamiaceae) Bioactive Extracts Obtained by Traditional and Green Extraction Procedures // *Plants*. – 2022. – Т. 11. – №. 6. – С. 781.

145. Uddin M. S. [и др.]. Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review // *Separation Science and Technology (Philadelphia)*. – 2018. – № 14 (53). – С. 2206–2223.
146. Veen G. [и др.]. Lupin alkaloids from *Lupinus polyphyllus* // *Phytochemistry*. – 1992. – № 12 (31). – С. 4343–4345.
147. Vergun O. [и др.]. Parameters of antioxidant activity of *Galega officinalis* L. and *Galega orientalis* Lam. (fabaceae Lindl.) plant raw material // *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. – 2020. – № 14. – С. 125–134.
148. Vivancos M., Moreno J. J. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2005. – № 1 (39). – С. 91–97.
149. Vu D. C. [и др.]. Identification and quantification of phytosterols in black walnut kernels // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2019. – № 75. – С. 61–69.
150. Wang M. [и др.]. Quantitative determination of free and esterified phytosterol profile in nuts and seeds commonly consumed in China by SPE/GC–MS // *LWT*. – 2019. – Т. 100. – С. 355–361.
151. Warner K., Mounts T. L. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1990. – № 11 (67). – С. 827–831.
152. Noh Y. H. [и др.]. In Vitro Inhibitory Effects of Organic Acids Identified in Commercial Vinegars on α -Amylase and α -Glucosidase // *Preventive Nutrition and Food Science*. – 2020. – Т. 25. – №. 3. – С. 319.
153. Woyengo T. A., Ramprasath V. R., Jones P. J. H. Anticancer effects of phytosterols // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2009. – № 7 (63). – С. 813–820.
154. Xia M. [и др.]. One-step preparative separation of phytosterols from edible brown seaweed *Sargassum horneri* by high-speed countercurrent chromatography // *Marine drugs*. – 2019. – Т. 17. – №. 12. – С. 691.
155. Xu L., Shu T., Liu S. Simplified Quantification of Representative Bioactives in Food Through TLC Image Analysis // *Food Analytical Methods*. – 2019. – № 12 (12). –

C. 2886–2894.

156. Yang R. [и др.]. Phytosterol contents of edible oils and their contributions to estimated phytosterol intake in the Chinese diet // *Foods*. – 2019. – Т. 8. – №. 8. – С. 334.

157. Yuan C. [и др.]. Simultaneous Analysis of Tocopherols, Phytosterols, and Squalene in Vegetable Oils by High-Performance Liquid Chromatography // *Food Analytical Methods*. – 2017. – № 11 (10). – С. 3716–3722.

158. Yuan C. [и др.]. Effect of β -sitosterol self-microemulsion and β -sitosterol ester with linoleic acid on lipid-lowering in hyperlipidemic mice // *Lipids in Health and Disease*. – 2019. – № 1 (18). – С. 1–11.

159. Yuan L. [и др.]. Phytosterols suppress phagocytosis and inhibit inflammatory mediators via ERK pathway on LPS-triggered inflammatory responses in RAW264. 7 macrophages and the correlation with their structure // *Foods*. – 2019. – Т. 8. – №. 11. – С. 582.

160. Yücel C. Ö., Ertaş H., Ertas F. N. Gas chromatographic determination and method validation of stigmasterol, β -sitosterol, campesterol and brassicasterol contents of Turkish cottonseed oil samples // *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. – 2017. – Т. 5. – №. 11. – С. 1274-1278.

161. Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review // *Chinese medicine*. – 2018. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-26.

162. Zhao C., Jia Y., Lu F. Angelica stem: A potential low-cost source of bioactive phthalides and phytosterols // *Molecules*. – 2018. – Т. 23. – №. 12. – С. 3065.

163. Fooddata Central [Электронный ресурс]. URL:<https://fdc.nal.usda.gov/index.html>. (дата обращения 20.07.2022).

164. USP NF 2020.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Акты внедрения

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России (Сеченовский
Университет)



Литвинова Т.М.

20 сентября 20 22 г.

20 СЕН 2022

АКТ 000130

о внедрении результатов диссертации Филимоновой Светланы Михайловны
(фамилия, имя, отчество)
в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института Фармации им.
А.П. Нелюбина
(наименование кафедры)

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные
положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Филимоновой Светланы Михайловны

(фамилия, имя, отчество)

на тему «Изучение состава и содержания фитостеролов в экстрактах лекарственного
растительного сырья и перспективных видах»

(название диссертации)

внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института
Фармации им. А.П. Нелюбина

(наименование кафедры)

при изучении дисциплины фармакогнозия,


(наименование дисциплин)

читаемых студентам по направлению подготовки (специальности)

33.05.01 Фармация


(шифр и наименование направления подготовки (специальности))

Директор Института
Института Фармации
А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор


(подпись)


Раменская Г.В.

Профессор кафедры
Фармацевтического естествознания
д.ф.н.


(подпись)

Бобкова Н.В.

Начальник Учебного управления
к.м.н.


(подпись)

Юдина Л.Ю.

«Утверждаю»

 Генеральный директор ООО «Центр
фармацевтической аналитики»
доктор фармацевтических наук

И. Е. Шохин

« 18 » _____ 2022 г.

**Акт № 01/1602****внедрения результатов научно-исследовательской работы**

Мы, нижеподписавшиеся директор ООО «Центр фармацевтической аналитики» д.фарм.н. Шохин И.Е., заведующий лабораторией БАИ №1 к.фарм.н. Медведев Ю. В. удостоверяем факт внедрения методики количественного определения липофильных терпеноидов в пересчёте на β -ситостерол в экстрактах сырья лекарственных растений методом спектрофотометрии в работу лаборатории БАИ №1. Данная методика была разработана в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме «Стандартизация перспективных источников природных фитостеролов растительного происхождения» преподавателем кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет (Сеченовский университет) Филимоновой С.М.

Данное внедрение может быть использовано для оценки качества спиртовых экстрактов сырья лекарственных растений в ООО «Центр фармацевтической аналитики».

 Заведующий лабораторией БАИ №1
ООО «ЦФА»
к.фарм.н. Медведев Ю.В.

 Генеральный директор ООО «ЦФА»
д.фарм.н. Шохин И.Е.