УДК 615.1: 615.015.4.032
DOI 10.21685/2072-3032-2018-3-5

Е. Е. Курдюков

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ДИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ В СЫРЬЕ СТЕВИИ

Аннотация.

Актуальность и цели. Сахарный диабет является острейшей медико-социальной проблемой практически всех стран мира. Продолжается поиск обоснованных подходов к профилактике сахарного диабета. Листья стевии и экстракты из листьев применяют как для профилактики сахарного диабета, так и в комплексной терапии заболевания. Однако фармакогностические аспекты недостаточно изучены. В связи с этим актуально проведение фитохимического анализа растительного сырья стевии. Цель исследования: доказать присутствие и количественно определить содержание дитерпеновых гликозидов в листьях стевии.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы измельченного сырья из высушенных листьев сорта Рамонская сластена, выращенного в условиях Пензенской области, Тверской области, Краснодарского края, Республики Крым. Идентификацию дитерпеновых гликозидов в сырье стевии проводили методом тонкослойной хроматографии. Количественное определение суммы дитерпеновых гликозидов в извлечениях из листьев стевии проводили методом прямой спектрофотометрии.

Результаты. Для качественного определения стевиозида была применена методика тонкослойной хроматографии. Обнаружение проводили визуально при дневном свете после обработки пластинок 50 % раствором серной кислоты. Пятна были окрашены в черный цвет. Характерной зоной являлось пятно с Rf 0,39, соответствующее стевиозиду. Для скринингового анализа содержания комплекса гликозидов в листьях стевии была применена прямая спектрофотометрия. В качестве раствора сравнения использовался сироп стевии с известным содержанием стевиозида, доказана линейность поглощения при 203 ± 2 нм от концентрации. Для извлечений из листьев стевии отмечается присутствие характерного максимума при длине волны 203 ± 2 нм.

Выводы. Определены максимумы собственного поглощения дитерпеновых гликозидов спиртовых экстрактов из листьев стевии – 203 нм. Было установлено, что содержание суммы дитерпеновых гликозидов в листьях стевии варьирует от 14,8 до 21,4 %.

Ключевые слова: *Stevia rebaudiana Bertoni*, дитерпеновые гликозиды, спектрофотометрия.

E. E. Kurdyukov

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF DITERPENE GLYCOSIDES IN THE RAW STEVIA

Abstract.

Background. Diabetes mellitus is the most acute medical and social problem in almost all countries of the world. It is difficult to overestimate the importance of

© 2018 Курдюков Е. Е. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

finding reasonable approaches to the prevention of diabetes. Stevia leaves, leaf extracts are used for the prevention of diabetes, and in the treatment of the disease. However, pharmacognostic aspects are insufficiently studied. In this regard, it is important to conduct phytochemical analysis of plant raw materials of stevia. Objective: to prove the presence and quantify the content of diterpene glycosides in stevia leaves.

Materials and methods. The material for use was samples of crushed raw materials from dried leaves of Ramon slasten variety grown in the conditions of the Penza region, Tver region, Krasnodar region, the Republic of Crimea. Identification of diterpene glycosides in stevia raw materials was performed by thin-layer chromatography (TLC). Quantitative determination of the amount of diterpene glycosides in extracts from stevia leaves was carried out by direct spectrophotometry.

Results. For the qualitative determination of stevioside, the TLC technique was applied. The detection was carried out visually in daylight after treatment of plates with 50% sulfuric acid solution. The spots were painted black. Typical area was the spot with Rf of 0.39, corresponding to stevioside. Direct spectrophotometry was used for screening analysis of the content of glycosides complex in stevia leaves. Stevia syrup with a known stevioside content was used as a comparison solution, the absorption linearity at 203±2 nm from the concentration was proved. For extracts from stevia leaves, the presence of a characteristic maximum at a wavelength of 203±2 nm is noted.

Conclusion. The maximum self - absorption of diterpene glycosides of alcohol extracts from stevia leaves-203 nm (maximum) was determined. It was found that the content of the sum of diterpene glycosides in stevia leaves varies from 14.8 to 21.4 %.

Keywords: *Stevia rebaudiana* B., diterpene glycosides, spectrophotometry.

Введение

Сахарный диабет является острейшей медико-социальной проблемой практически во всех странах мира, катастрофический рост числа заболевших принимает характер неинфекционной эпидемии. Трудно переоценить значимость поиска обоснованных подходов к профилактике сахарного диабета, так как, несмотря на довольно обширный арсенал противодиабетических препаратов и большой опыт их применения, проблема профилактики и лечения заболевания не решена.

Листья стевии, экстракты из листьев применяют как для профилактики сахарного диабета, так и в комплексной терапии заболевания. Во всех надземных органах стевии обнаружены сладкие дитерпеновые гликозиды: стевиозид, ребаудиозиды A, B, C, D и E, обладающие способностью усиливать секрецию инсулина, усиливать эффект инсулина на клеточные мембраны, стабилизировать секрецию глюкагона и уровня сахара в крови. Однако фармакогностические аспекты недостаточно изучены. В связи с этим актуально проведение фитохимического анализа растительного сырья стевии [1–3].

Основной группой биологически активных соединений в сырье стевии являются дитерпеновые гликозиды [4, 5]. На сегодня разработан метод идентификации комплекса гликозидов в листьях стевии методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии [6–8].

1. Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы измельченного сырья из высушенных листьев сорта Рамонская сластена, выращенного в условиях Пензенской и Тверской областей, Краснодарского края, Республики Крым.

Идентификацию дитерпеновых гликозидов в сырье стевии проводили методом ТСХ [6]. Использовали хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254». Пластинки для ТСХ-анализа предварительно выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 1 ч с целью их активирования. Хроматографировали восходящим способом в камере с системой растворителей: хлороформ – метанол – вода (60:30:6). После того как фронт растворителей пройдет 13 см, пластинку вынимали из камеры и высушивали на воздухе в течение 30 мин, затем пластинку опрыскивали 50 % раствором серной кислоты. После выдерживания пластинки в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 15 мин на хроматограмме идентифицировали пятна черного цвета с различными значениями Rf.

Количественное определение суммы дитерпеновых гликозидов в извлечениях из листьев стевии проводили методом прямой спектрофотометрии. Эксперимент проводили на спектрофотометре СФ104 в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн 190–300 нм. Извлечение дитерпеновых гликозидов из листьев стевии с соотношением сырье-экстрагент 1:100 проводили путем однократной экстракции 95 % этанолом при нагревании на кипящей водяной бане в течение 45 мин.

2. Результаты и обсуждение

Важным показателем подлинности экстракта стевии является содержание в нем стевиозида. Для качественного определения стевиозида была применена методика ТСХ, характерной зоной являлось пятно с Rf 0,39, соответствующее стевиозиду.

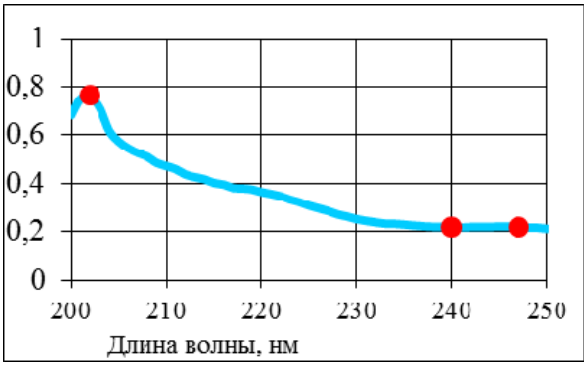
Для скринингового анализа содержания комплекса гликозидов в листьях стевии была применена прямая спектрофотометрия. В качестве раствора сравнения использовался сироп стевии с известным содержанием стевиозида, доказана линейность поглощения при 203 ± 2 нм от концентрации. При использовании концентрации 40 и 70 % спирта не было ярко выраженного максимума. На рис. 1 представлен общий вид спектра спиртовых извлечений из листьев стевии, полученного в ходе количественной оценки содержания суммы дитерпеновых гликозидов методом прямой спектрофотометрии.

Для извлечений из листьев стевии отмечается присутствие характерного максимума при длине волны 203 ± 2 нм. Следует отметить, что при использовании сырья стевии различного происхождения характер спектра не менялся у всех образцов. Аналитическая длина волны может быть использована для идентификации дитерпеновых гликозидов.

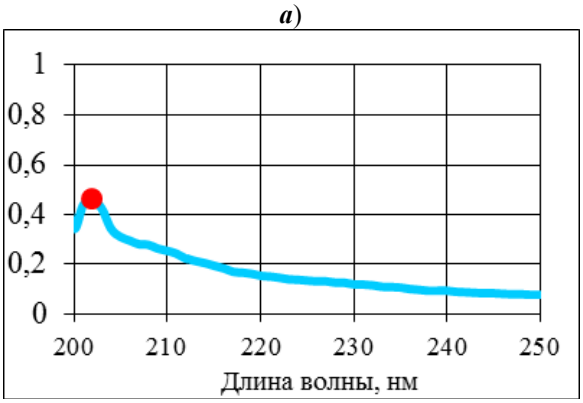
При разработке количественного определения дитерпеновых гликозидов в листьях стевии были изучены ультрафиолетовые спектры стевиозида. Для количественного спектрофотометрического анализа необходим стандарт или величина удельного показателя поглощения дитерпеновых гликозидов, $E_{l\,\text{ст}}^{1\,\%}$ = 57,3. Был проведен сравнительный анализ лекарственного растительного сырья стевии, выращенной в разных климатических условиях (табл. 1). Было установлено, что содержание суммы дитерпеновых гликозидов в листьях стевии варьирует от 14 до 22 %.

Изучение спектров поглощения в ультрафиолетовой области спиртовых экстрактов стевии проводилось с целью выбора оптимальных условий и характеристик, позволяющих установить подлинность. Спектр 1,0 % раствора

экстракта стевии в этаноле имеет один ярко выраженный максимум при длине волны 203 нм. При сопоставлении спектров со спектрами образца сравнения установлено, что он имеет аналогичные спектры с экстрактом. Изученные спектры в области от 190 до 300 нм специфичны и информативны. Для установления подлинности стевиозида предложено использовать спектр поглощения 1,0 % раствора экстракта из листьев стевии в этаноле.



а)



б)

Рис. 1. Ультрафиолетовый спектр поглощения дитерпеновых гликозидов спиртового извлечения из сырья стевии, спирт этиловый 95 % (***а***); ультрафиолетовый спектр раствора сравнения (дифференциальный спектр) (***б***)

Таблица 1

Результаты количественного определения суммы дитерпеновых гликозидов в сырье стевии

Сорт стевии (регион произрастания)	Содержание суммы дитерпеновых гликозидов, %
Рамонская сластена (Краснодар)	18,2
Рамонская сластена (Крым)	21,4
Рамонская сластена (Пенза)	15,0
Рамонская сластена (Тверь)	14,8

Заключение

Для доказательства присутствия дитерпеновых гликозидов в экстрактах из листьев стевии целесообразно использовать ТСХ-анализ, характерной зоной являлось пятно с Rf 0,39.

Определены максимумы собственного поглощения дитерпеновых гликозидов спиртовых экстрактов из листьев стевии – 203 нм. Положение максимумов не изменялось при использований сырья стевии различного происхождения. Для экстракции дитерпеновых гликозидов из листьев стевии оптимально использовать растворы этанола 95 %.

Было установлено, что содержание суммы дитерпеновых гликозидов в листьях стевии варьирует от 14,8 до 21,4 %. Показано, что по содержанию дитерпеновых гликозидов стевия, выращенная в Пензенской области, на 30 % уступает сырью стевии, полученной в условиях Республики Крым. Это дает основание полагать, что регион возделывания стевии в России может быть расширен и включать агроклиматические условия Пензенской области.

Библиографический список

1. **Lemus-Mondaca, R.** Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects / R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, Ah-Hen. Kong // Food Chemistry. – 2012. – Vol. 132 (3). – P. 1121–1132.
2. Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni A Review / Swati Madan, Sayeed Ahmad, G N Singh, Kanchan Kohli, Yatendra Kumar Raman Singh and Madhukar Garg // Indian Journal of Natural Products and Resources. – 2010. – Vol. 1 (3). – P. 267–286.
3. **Курдюков, Е. Е.** Макро- и микроморфологические особенности листьев стевии Ребо Stevia rebaudiana Bertoni при интродукции в Среднем Поволжье / Е. Е. Курдюков, Е. Ф. Семенова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер.: Медицина и фармация. – 2017. – № 26. – С. 137–145.
4. **Федоров, С. В.** Разработка метода выделения сладких дитерпеновых гдикозидов стевии и анализ полученных экстрактов / С. В. Федоров, С. А. Кедик, Н. А. Лнуль // Биологически активные добавки к пище и проблемы оптимизации питания : материалы VI Междунар. симпозиума. – Сочи, 2002. – С. 266.
5. **Кедик, С. А.** Сладкие дитерпеновые гликозиды стевии / С. А. Кедик, Н. А. Януль, С. В. Фёдоров // Питание и здоровье. Биологически активные добавки. – 2002. – № 8. – С. 42–44.
6. Контроль содержания стевиозида в растительном сырье методом ВЭЖХ и ТСХ / С. А. Кедик, С. В. Федоров, Н. А. Януль, Л. В. Прохорова, Е. В. Смирнова, А. В. Панов // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 10. – С. 19–22.
7. **Рудаков, О. Б.** Контроль стевиозида в сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / О. Б. Рудаков, Н. Д. Верзилина, С. В. Федоров, К. К. Полянский // Молочная промышленность. – 2004. – № 7. – С. 54–55.

References

1. Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L., Kong Ah-Hen. *Food Chemistry*. 2012, vol. 132 (3), pp. 1121–1132.
2. Madan Swati, Ahmad Sayeed, Singh G N., Kohli Kanchan, Yatendra Kumar Raman Singh and Garg Madhukar *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2010, vol. 1 (3), pp. 267–286.
3. Kurdyukov E. E., Semenova E. F. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvenno-go universiteta. Ser.: Meditsina i farmatsiya* [Scientific bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine and pharmacy]. 2017, no. 26, pp. 137–145.
4. Fedorov S. V., Kedik S. A., Lnul' N. A. *Biologicheski aktivnye dobavki k pishche i problemy optimizatsii pitaniya: materialy VI Mezhdunar. simpoziuma* [Bioactive food supplements and problems of diet optimization: proceedings of VI International symposium]. Sochi, 2002, p. 266.

5. Kedik S. A., Yanul' N. A., Fedorov S. V. *Pitanie i zdorov'e. Biologicheski aktivnye dobavki* [Nutrition and health. Bioactive food supplements]. 2002, no. 8, pp. 42–44.
6. Kedik C. A., Fedorov S. V., Yanul' N. A., Prokhorova L. V., Smirnova E. V., Panov A. V. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Chemical and pharmaceutical journal]. 2003, vol. 37, no. 10, pp. 19–22.
7. Rudakov O. B., Verzilina N. D., Fedorov S. V., Polyanskiy K. K. *Molochnaya promyshlennost'* [Milk industry]. 2004, no. 7, pp. 54–55.

Курдюков Евгений Евгеньевич
старший преподаватель, кафедра общей и клинической фармакологии, Медицинский институт, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: e.e.kurdyukov@mail.ru

Kurdyukov Evgeniy Evgen'evich
Senior lecturer, sub-department of general and clinical pharmacology, Medical Institute, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

УДК 615.1: 615.015.4.032
Курдюков, Е. Е.
Количественное определение суммы дитерпеновых гликозидов в сырье стевии / Е. Е. Курдюков // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2018. – № 3 (47). – С. 43–48. – DOI 10.21685/2072-3032-2018-3-5.