

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение города Москвы
Романовская школа
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
МИРЭА – Российский Технологический университет
Детский технопарк «Альтаир» РТУ МИРЭА

**РАЗРАБОТКА ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ШАЛФЕЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ
ИХ АНТИОКСИДАНТНЫХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
СВОЙСТВ**

Автор работы:
Ученица 10 класса
ГБОУ г. Москвы Романовская школа
Мирошник Мария Александровна

Научный руководитель:
Преподаватель Детского технопарка «Альтаир» РТУ МИРЭА
Васильева Дарья Владимировна

Москва, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	6
1.1 Ботаническая характеристика рода <i>Salvia</i>	6
1.2 Химический состав и фармакологические свойства шалфея лекарственного. Применение в медицине.	6
1.3. Флавоноиды. Нахождение в растительном сырье.	9
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	12
2.1 Объект изучения	12
2.2 Методы исследования	12
2.3 Материалы исследования	12
2.4 Экстракция	14
2.5 Оценка органолептических показателей экстрактов:	19
2.6 Проведение качественных реакций на флавоноиды.	20
2.7 Исследование на микробиологическую чистоту.	23
2.8 Исследование экстрактов на антибактериальную активность.	27
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
3.1 Экстракция	30
3.2 Качественный анализ	30
3.3 Микробиологическое исследование	30
ВЫВОДЫ	31
ПЕРСПЕКТИВЫ РАБОТЫ	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	33

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым фактором поддержания оптимальной работоспособности, хорошего самочувствия и выносливости человека является правильно сбалансированное питание, снабжающее организм энергетически богатыми веществами и микронутриентами, необходимыми для нормального протекания биохимических процессов.

Незаменимыми пищевыми ингредиентами являются антиоксидантные соединения – они укрепляют иммунную систему, замедляют процессы старения, помогают бороться со стрессами и неблагоприятными экологическими условиями, предотвращают процессы, приводящие к сердечно-сосудистым, онкологическим заболеваниям.

Причинами проявления сердечно-сосудистых, желудочно-кишечных и других заболеваний является накопление в организме излишних концентраций свободных радикалов. Для урегулирования концентрации радикалов в живых организмах вырабатываются специальные вещества – ферменты и витамины, обладающие антиоксидантными свойствами.

Набор биологически активных веществ (далее БАВ): витаминов, минеральных веществ, фенольных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами – антиоксидантов – гораздо богаче в растениях, чем в тканях животных и человека. Это объясняется тем, что растения практически не имеют никаких других средств защиты от агрессивного воздействия окружающей среды. На сегодняшний день известно около 6000 антиоксидантов растительного происхождения [15, 16], объединённых под общим термином – флавоноиды. Все биофлавоноиды в своей основе имеют общую структуру С₆–С₃–С₆, и, благодаря наличию гидроксильных групп, они являются ловушкой для свободных радикалов [17, 18].

Лекарственное растительное сырьё служит надёжным источником БАВ, которые, как правило, проявляют комплексное антиоксидантное, антибактериальное и фунгицидное действие [9]. Естественно, что для

профилактики вышеуказанных заболеваний рекомендуются лекарства с содержанием антиоксидантов растительного происхождения [22].

Одним из основных способов извлечения БАВ для использования в пищевой и фармацевтической промышленности является получение экстрактов [2]. В свою очередь использование экстрактов лекарственных растений, содержащих большое количество БАВ и обеспечивающих хорошие органолептические показатели и оригинальность вкуса, отличается простотой внесения в продукт [24].

По литературным данным, значительное количество БАВ содержит доступное и перспективное лекарственное растение – шалфей лекарственный [9].

Шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*) представляет значительный теоретический и практический интерес как ценное лекарственное растение, нашедшее широкое применение в народной и научной медицине. Этот вид охарактеризован в фармакопеях многих стран. В настоящее время известно около 900 видов *Salvia* [12], из которых шалфей лекарственный имеет наибольшее значение для медицины.

Обзор данных литературы показал, что биологическая активность растений рода *Salvia* L. во многом обусловлена присутствием фенольных соединений [29]. Следовательно исследование экстрактов из растительного сырья шалфея лекарственного как природных источников антиоксидантов является современной актуальной подцелью данного исследования.

Лекарственные растения являются основой для получения фитопрепаратов, экстрактов, которые относятся к сырью, наиболее контаминированному различными микроорганизмами, и могут являться переносчиками различных бактерий, грибов [28]. При этом микробной контаминации может подвергаться не только лекарственное растительное сырье, но и почти все готовые лекарственные формы.

Поэтому при разработке лекарственных средств, в особенности растительного происхождения, необходимым условием является оценка микробиологических рисков.

Вследствие чего подцелью данного исследования в свою очередь явилась оценка микробиологической чистоты жидких экстрактов листьев шалфея (*Salviae Folia*).

Общая цель настоящей работы: Разработка водного и спиртового экстрактов из листьев шалфея (*Salviae Folia*), изучение их антиоксидантных и антимикробных свойств и определение микробиологической чистоты экстрактов. А также обоснование их использования при создании продукции с повышенной биологической ценностью.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проанализировать научную литературу по выбранной тематике.
2. Создать водный и спиртовой экстракты растения шалфея лекарственного.
3. Изучить органолептические показатели полученных экстрактов.
4. Подтвердить присутствие флавоноидных веществ в сырье для определения антиоксидантной активности сырья.
5. Изучить антибактериальную активность исследуемых экстрактов.
6. Исследовать экстракты на микробиологическую чистоту.
7. Проанализировать полученные результаты и сформулировать выводы.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Ботаническая характеристика рода *Salvia*.

Шалфей лекарственный – *Salvia officinalis* – относится к классу двудольные (магнолиоопсиды) – Dicotyledones (Magnoliopsida), подклассу ламииды – Lamiidae, порядку яснотковые – Lamiales, семейству яснотковые (губоцветные) – Lamiaceae (Labiatae) [12].

Семейство объединяет около 5500 видов из 200 родов. Наиболее богато представлено в Средиземноморье. Жизненные формы – травы многолетние, реже двулетние или однолетние, полукустарники и кустарнички [8, 9, 12].

Многолетний полукустарник семейства губоцветных, 30–70 см, реже до 1 м. в высоту. Растение имеет сильный ароматный запах. Корневая система мочковатая. Стебель ветвистый, сверху травянистый, внизу деревянистый, четырёхгранный, с густооблиственными побегами, развивающимися по трициклическому типу [14]. Листья простые, продолговатые или продолговато-яйцевидные, располагаются накрест супротивно, черешковые, морщинистые, опушённые, особенно с нижней стороны, серовато-зелёные, при прекращении вегетации меняют цвет на серебристо-серый. Край листа городчатый [12].

Родина шалфея лекарственного – Малая Азия, откуда он распространился по странам Средиземноморья, где обычно растёт на сухих горных склонах. Тип ареала характеризуется как древне средиземноморский [25] или южноевропейско-средиземноморский [14]. Культивируется в Югославии, Греции, Италии, Франции, Чехии, Словакии и во многих других государствах. Шалфей лекарственный возделывают также в Молдове, на Украине, а в России преимущественно в Краснодарском крае [13].

1.2 Химический состав и фармакологические свойства шалфея лекарственного. Применение в медицине.

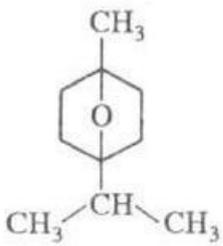
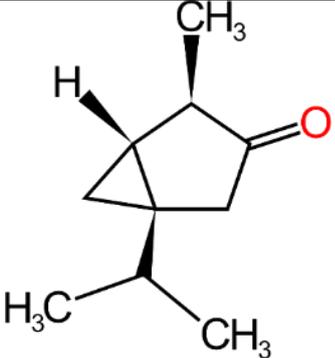
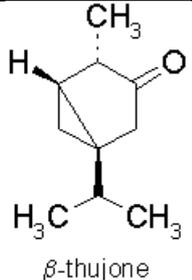
Шалфей лекарственный содержит кумарины, алкалоиды, флавоноиды, сапонины, склареол, розмариновую кислоту – [34; 35], дигидрокверцетин, рутин, кумарин, умбеллиферон, галловую, цикориевую и феруловую кислоты – [2, 30],

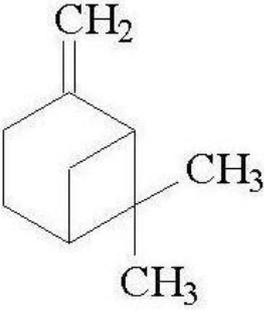
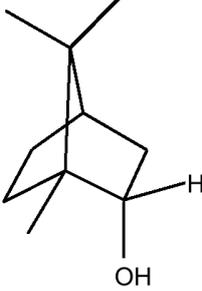
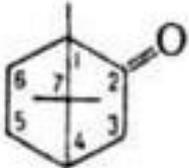
соли К, Са, Fe, Mn, Zn, Li, Sn – [38; 39]. Также определены полифенолы – [1,29], фенольные и флавоноидные гликозиды – [32].

Эфирное масло (0,5–2,5%) содержится в листьях растения, в состав которого входят цинеол (до 15%), L- α -туйон, D- β -туйон, D- α -пинен, сальвен, D-борнеол, D-камфора, цедрен. По ФС и ГФ XI требуется содержание эфирного масла не менее 0,8% в цельном растении [8, 33].

Соцветия и листья шалфея лекарственного содержат линалоол, ароматические смолы, уксусную и муравьиную кислоту, флавоноиды, дубильные вещества, алкалоиды, витамин Р, никотиновую кислоту, горечи, фитонциды, парадифенол, 1–2,5% эфирного масла. [8,22,33,34]. (См. табл.1.)

Таблица 1. Химический состав шалфея лекарственного.

Компоненты	Химическая формула	Количественное содержание
Эфирное масло	–	Не менее 0.8%
1. Цинеол		до 15%
2. D- α -туйон		Не более 10
3. D- β -туйон	 β -thujone	Не более 20%

4. D-α-пинен		Не более 4%
5. D-борнеол		Не более 12%
6. D-камфора		Не более 5%

Биологическая ценность сырья шалфея лекарственного обусловлена комплексом биологически активных веществ, таких как летучие соединения, фенольные вещества и витамины. Фенольные соединения шалфея лекарственного представлены фенолкарбоновыми кислотами и их производными, флавоноидами и дубильными веществами [2,3,29,32].

Таблица 2. Фенольные соединения шалфея лекарственного.

Фенольные соединения	Количественное содержание
1. Дубильные вещества	Не более 2,5%
2. Флавоноиды	Не более 4%
Органические кислоты	Не более 3%
1. Олеановая кислота	Не более 2%
2. Хлорогеновая кислота	Не более 1%
3. Парадифенол	Не более 3%

Применение в медицине: шалфей лекарственный издавна известен в народной медицине и широко используется в пищевой, парфюмерной и

фармацевтической промышленности [2]. Настои и отвары листьев шалфея обладают антисептическими, противовоспалительными свойствами [13], и применяются при лечении широкого спектра заболеваний – сердца, нервной системы, органов дыхания, пищеварения, эндокринной системы [2]. Эфирное масло шалфея обладает противогрибковой активностью, бактерицидным действием, с чем связаны фитонцидные свойства растения. Противовоспалительные свойства шалфея связаны с дубильными веществами, флавоноидными соединениями и витамином Р, которые уплотняют эпителиальные ткани, снижают проницаемость клеточных мембран, стенок кровеносных и лимфатических сосудов [2,3,8]. Лекарственные препараты на основе шалфея незаменимы по уходу за зубами – они уменьшают образование зубного налёта, снимают воспаление дёсен, а также оказывают положительное влияние на профилактику кариеса [7]. С древнейших времён шалфеем используется для ароматизации различных пищевых продуктов, что является неотъемлемой частью популярной здоровой средиземноморской диеты.

1.3. Флавоноиды. Нахождение в растительном сырье.

Флавоноиды – самый многочисленный класс природных фенольных соединений, широко распространённых в растительном мире. Они представляют собой полифенолы, структурной основой которых служит флавоновое ядро, содержащее два ароматических кольца, соединённых С3 – мостиком. [27,37]

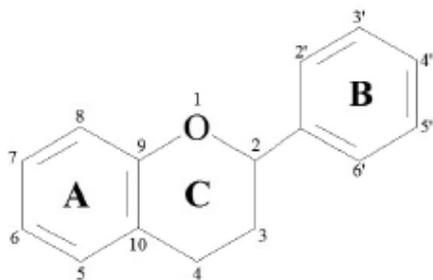


Рис.1. Общая структура флавоноидов.

Под термином флавоноиды объединены различные соединения, генетически связанные друг с другом и обладающие различным фармакологическим действием. Своё название они получили от латинского слова «flavus» – жёлтый, поскольку первые выделенные из растений флавоноиды имели жёлтую окраску. Большинство флавоноидов – твёрдые кристаллические

вещества, окрашенные в жёлтый цвет. Все флавоноиды оптически активны, способны флуоресцировать в УФ-свете [26].

Флавоноиды широко распространены в высших растениях, значительно реже встречаются в микроорганизмах и насекомых.

Наиболее богаты флавоноидами растения семейства бобовых, астровых (сложноцветных), сельдерейных (зонтичных), яснотковых (губоцветных), розоцветных, гречишных, берёзовых, рутовых и др. В растениях флавоноиды локализуются главным образом в цветках, листьях и плодах, реже – в корнях и стеблях; содержание их в растениях колеблется от 0,5 до 30 %.

Около 40 % флавоноидов приходится на группу производных флавонола, несколько меньше группа производных флавона, значительно реже встречаются флаваноны, халконы, ауроны. [28,37]

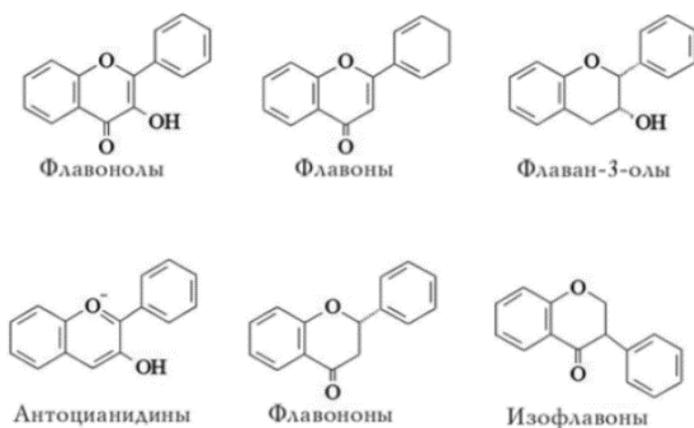


Рис.2. Основные подклассы флавоноидов.

Как правило, флавоноиды в растениях содержатся в клеточном соке. Максимальное содержание флавоноидов наблюдается в надземных частях растения в период бутонизации и цветения.

В растительном сырье и препаратах, флавоноидные соединения обнаруживают с помощью качественных реакций и методов хроматографии.

Качественное определение: Общие реакции, специфичные для всех групп флавоноидов, отсутствуют. Наиболее часто используются следующие реакции [37]:

1. Цианидиновая реакция или проба *Chinoda.*, основанная на восстановлении флавоноидов атомарным водородом в кислой среде в присутствии Mg/Zn^{2+} [26,

27]. Флавонолы, флаваноны и флавоны при восстановлении магнием или цинком в присутствии соляной кислоты дают красное или оранжевое окрашивание, обусловливаемое образованием антоцианидинов.

2. Борно-лимонная реакция. 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы взаимодействуют с борной кислотой в присутствии лимонной, образуя ярко-жёлтое окрашивание с жёлто-зелёной флуоресценцией (образование батохромного комплекса).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнялась на базе Детского технопарка «Альтаир» (МИРЭА – Российский технологический университет) в кластере лабораторий «Биохимические и химические технологии» с декабря 2023 г. по февраль 2024 г.

2.1 Объект изучения

Объектом изучения служили жидкие водный и спиртовой экстракты из листьев шалфея (*Salviae Folia*), полученные модифицированным методом одноразовой экстракции. Растительное сырье шалфея было приобретено в качестве сухих листьев в АО «Красногорсклексредства» Фармацвет. В качестве экстрагента в первом экстракте использовали воду. В качестве экстрагента во втором экстракте использовали раствор спирта 70%.



Рис. 3. Растительное сырье листьев шалфея (*Salviae Folia*).

2.2 Методы исследования

Экстракция, метод глубинного посева, диффузионный метод с помощью лунок (луночный метод), качественные реакции: Цианидиновая проба, Качественная реакция с раствором щелочи.

2.3 Материалы исследования

Экстрагирование экстрактов производилось модифицированным методом одноразовой экстракции в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания ОФС.1.5.3.0006.15, модифицированным в плане времени экстракции.

Оценку органолептических показателей производили, изучая запах, цвет, прозрачность и лекарственный запах полученных экстрактов в соответствии с испытаниями лекарственных форм, описанных в ОФС.1.4.1.0001.15 Государственной Фармакопеи XIV издание Том II.

Определяли антиоксидантную активность экстрактов – флавоноидные соединения идентифицировали качественным анализом методом качественных реакций: использовали цианидиновую пробу и борно-лимонную реакцию.

Исследование антибактериальной активности экстрактов происходило общеизвестным диффузионным методом глубинного посева с помощью лунок (луночный метод).

Изучение микробиологической чистоты жидких экстрактов проводилось методом глубинного посева на питательные среды в соответствии с требованиями к микробиологической чистоте лекарственных субстанций, описанных в ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд. [5, с. 163]. Так нестерильные формы лекарственных средств могут быть контаминированы различными микроорганизмами. При этом допускается наличие лимитированного количества микроорганизмов, при отсутствии определенных видов бактерий, представляющих эпидемиологическую опасность для здоровья человека

Согласно Государственной Фармакопеи XII изд., лекарственные средства растительного происхождения в зависимости от способа применения разделяются на категории 3 и 4. Для них установлены пределы допустимых микробиологических норм определенных групп микроорганизмов, такие как: общее число бактерий и общее число грибов, а также наличие *Escherichia coli*, *Salmonella* и энтеробактерии [5, с. 163].

Соответственно данной классификации, жидкие экстракты из листьев *Salviae Folia* относятся к категории 3.2 – Субстанции природного происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов (Табл. 3).

Таблица 3. Требования к микробиологической чистоте субстанций и вспомогательных веществ для производства лекарственных препаратов

Субстанции, вспомогательные вещества	Рекомендуемые требования
Категория 3.2.	Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г или в 1 мл.
Субстанции природного происхождения	Общее число грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г или в 1 мл.
(растительного, животного или минерального) для	Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г или в 1 мл.
производства нестерильных лекарственных препаратов	Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г или в 10 мл.
	Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл.
	Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл.
	Энтеробактерии – не более 10^2 КОЕ в 1 г или в 1 мл.

В данной проектной работе, изучали общее число аэробных микроорганизмов, общее число грибов, наличие/отсутствие *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

2.4. Экстракция

Материалы исследования и используемое оборудование: коническая колба объемом 250 мл, нагревательная плита, обратный холодильник., штатив, весы аналитические Ohaus AX224, весы портативные Ohaus NVL1101, шпатель пластиковый, мерный стакан на 50 мл, мерный цилиндр на 100 мл, ступка и пестик.

Создание водного и спиртового (70%) экстрактов шалфея.

Методика выполнения работы: около 3 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья Шалфея измельчали в ступке до мелких частиц. Просеивали сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Пересыпали в две конические колбы объемом 250 мл ровно по 1,0 г измельченного сырья.



Рис. 4. Измельченное растительное сырье Шалфея, ровно 1,0 г в каждой колбе.
Для создания смеси для водного экстракта в первую колбу с растительным сырьем в качестве экстрагента прибавляли 50 мл дистиллированной воды.
Для создания смеси для спиртового экстракта во вторую колбу с растительным сырьем прибавляли 50 мл спирта 70 %.

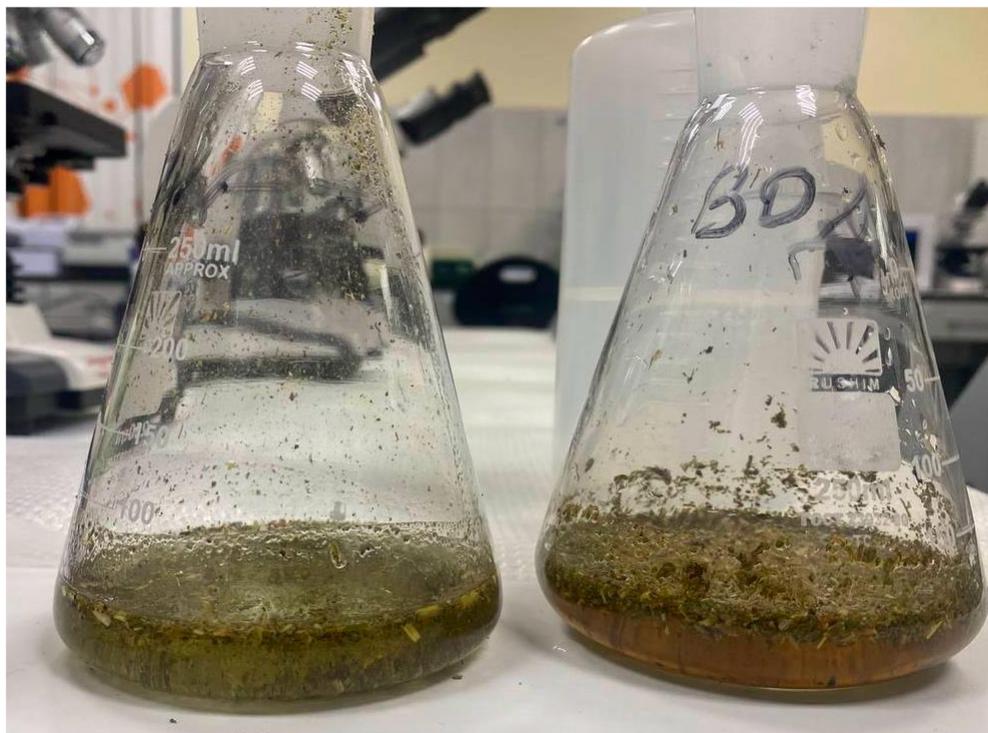


Рис. 5. Спиртовая и водная смесь растительного сырья шалфея.
Для приготовления спирта 70% в мерный цилиндр объемом 100 мл добавляли 70 мл медицинского спирта 100 %, доводили до отметки 100 мл дистиллированной водой.
Колбы, с приготовленными смесями, перемещали в вытяжной шкаф и ставили на установку, состоящую из нагревательной плиты, обратного холодильника и штатива, придерживающего колбу с холодильником.

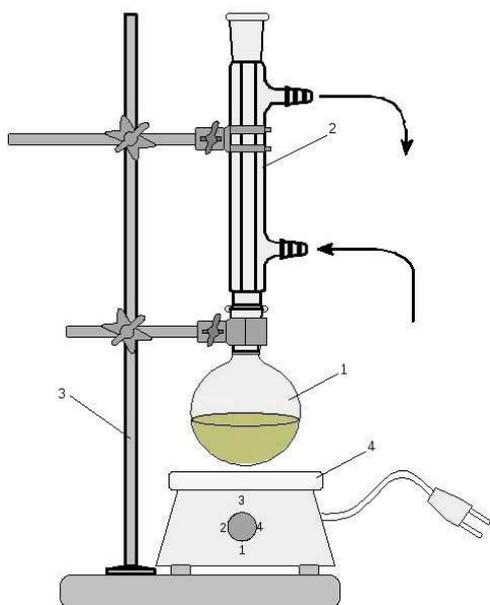


Рис. 6. Схема экстракционной установки, где

- 1 – Колба с экстрактом
- 2 – Обратный холодильник
- 3 – Штатив
- 4 – Нагревательная плита

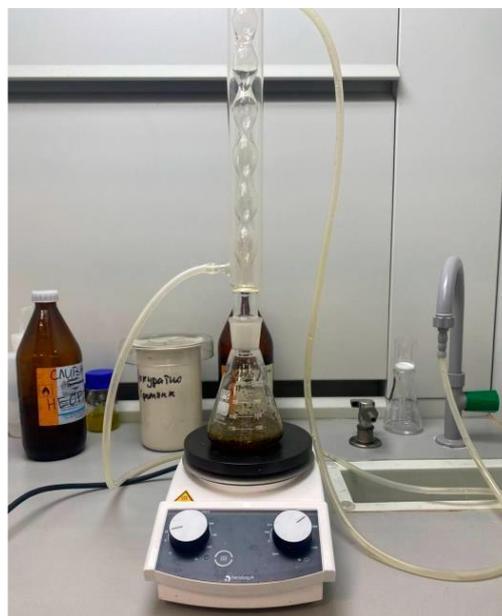
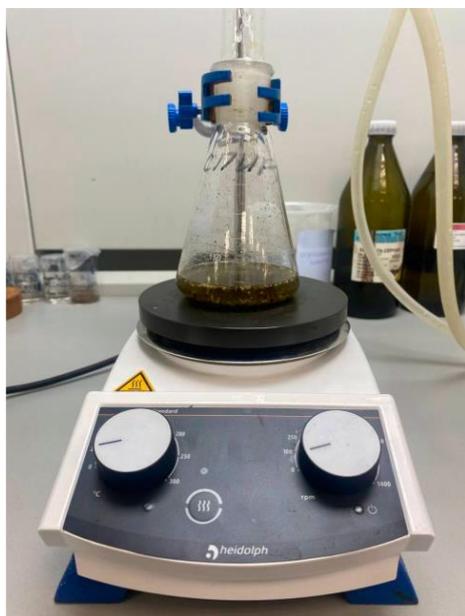


Рис.7. Установка со спиртовой смесью. Рис.8. Установка с водной смесью.

Нагревательную плиту разогревали до 100–110°C. На протяжении 1,5 часов ровно, поддерживали слабое кипение. По истечению времени колбы оставляли до полного остывания.

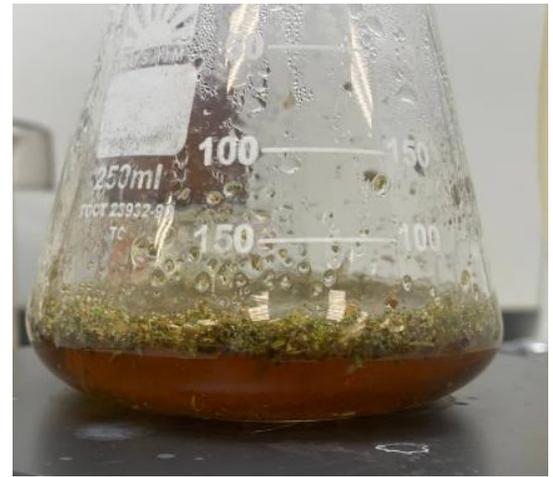
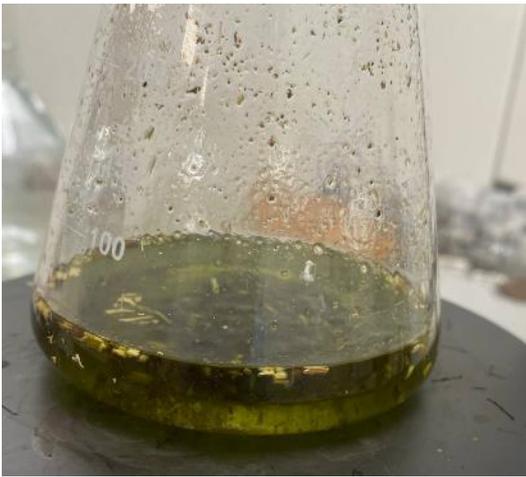


Рис.9. Экстракция спиртового экстракта. Рис.10. Экстракция водного экстракта
После полного остывания, фильтровали получившиеся экстракты через фильтровальную марлю, сложенную в несколько раз.



Рис.11. Неотфильтрованные экстракты.



Рис.12. Фильтрация водн. экстракта. Рис.13. Фильтрация спирт. экстракта.
Экстракты перелили в пластиковые пробирки «Фалькон», загерметизировали парафином.



Рис.14. Спиртовой экстракт.



Рис.15. Водный экстракт.

Жидкие экстракты после завершения процесса экстрагирования следует обязательно выдерживать при температуре 8 – 10 °С в течение не менее 2 суток для осаждения балластных веществ, которые отделяют фильтрованием, и получения прозрачной жидкости.



Рис. 16. Экстракты по истечению времени выдержки.



Рис. 17. Фильтрование.



Рис. 18. Отфильтрованные экстракты, после осаждения балластных веществ.

2.5. Оценка органолептических показателей экстрактов:

При органолептической оценке экстрактов определяли цвет, прозрачность, наличие лекарственного запаха, запах. По внешнему виду экстракты представляли собой прозрачные жидкости без осадка, со свойственными растению ароматом и цветом – от светло коричневого до темно зеленого.

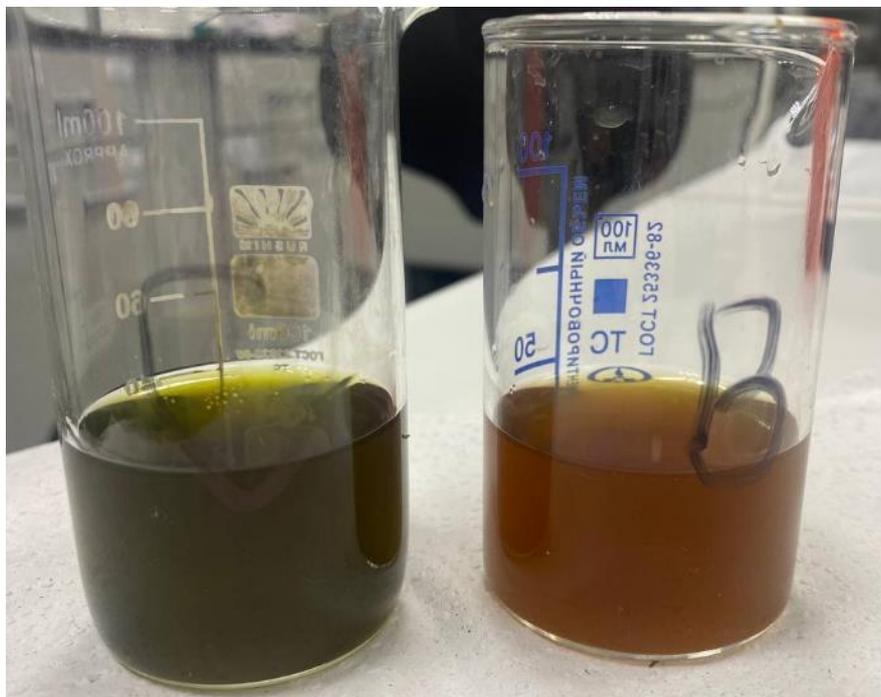


Рис.13. Определение цвета экстрактов. Спиртовой (1) и водный (2) экстракты.

Таблица 4. Органолептические показатели экстрактов.

Признак	Водный экстракт	Спиртовой экстракт
Цвет	Умеренно коричневый	Коричневато-зеленый
Прозрачность	Полупрозрачный, мутноватый	Полупрозрачный, более плотный чем водный
Наличие лекарственного запаха	Присутствует	Присутствует незначительно
Запах	Травяной запах шалфея лекарственного	Присутствует ярко выраженный спиртовой запах
Возможность образования осадка	Да	Да

2.6. Качественный анализ. Качественные реакции на флавоноиды.

1. Цианидиновая проба (проба *Chinoda*).

Используемые материалы исследования и оборудование: пипетка Пастера, нагревательная плита, весы аналитические Ohaus AX224, пробирки пластиковые 15 мл, стаканы мерные на 50 мл.

Реактивы: соляная кислота (концентрированная) 5–7 капель из пипетки Пастера, металлический цинк 15 мг

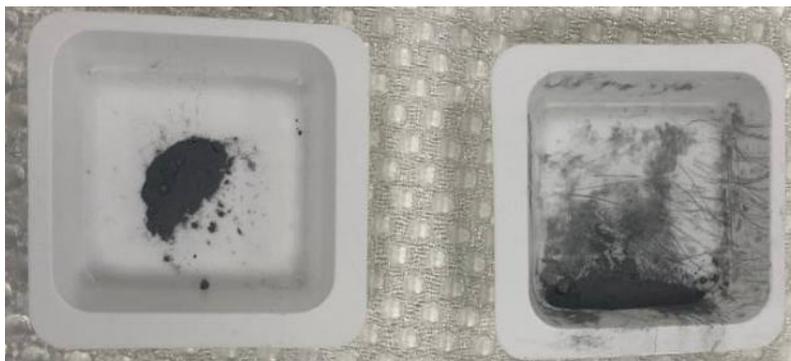


Рис.14. Металлический цинк 15 мг.

Методы исследования: метод качественных реакций.

Методика выполнения работы: к 2 мл извлечения добавляли 5–7 капель концентрированной HCl и 10–15 мг металлического Zn, через 3–5 мин наблюдали оранжевое окрашивание. Для ускорения реакции и усиления окраски подогрели реакционную смесь (2–3 мин).

Наблюдения:



Рис.15. После добавления реактивов наблюдалось окрашивание серого цвета.

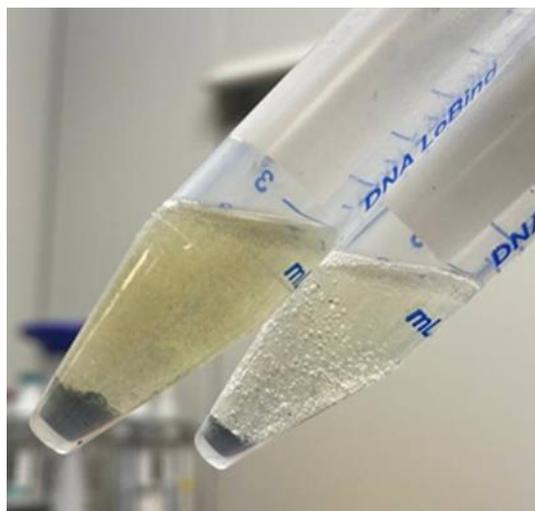


Рис.16. В течение 2 мин. окрашивание смесей переходило в оранжевый оттенок. (Спиртовой (1), водный (2)).

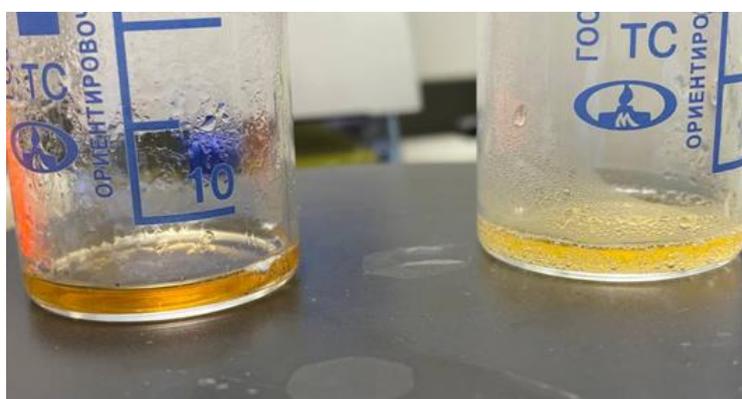


Рис.17. После подогревания смесей появилось выраженное оранжевое окрашивание.

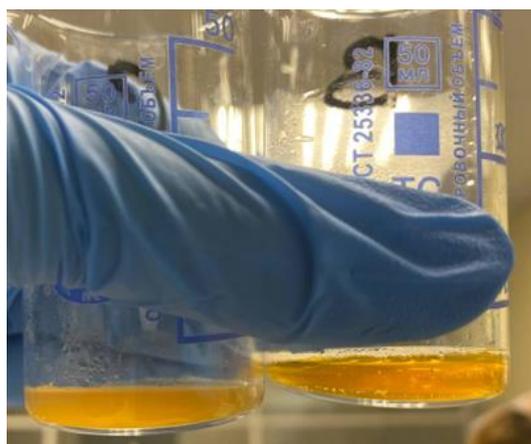


Рис.18 Спиртовой (1) и водный (2) экстракты приобрели оранжевое окрашивание.

2. Борно-лимонная реакция.

Реактивы: Борная кислота (3%), Лимонная кислота.

Материалы исследования и используемое оборудование: Пипетка Пастера, пробирки на 15 мл, шпатель пластиковый

Методика выполнения работы: к 2 мл извлечения добавляли 5–7 капель борной кислоты, присыпали 10–15 мг лимонной кислоты. Сразу после появляется желтое окрашивание экстрактов, что свидетельствует о наличии флавоноидов в экстрактах.

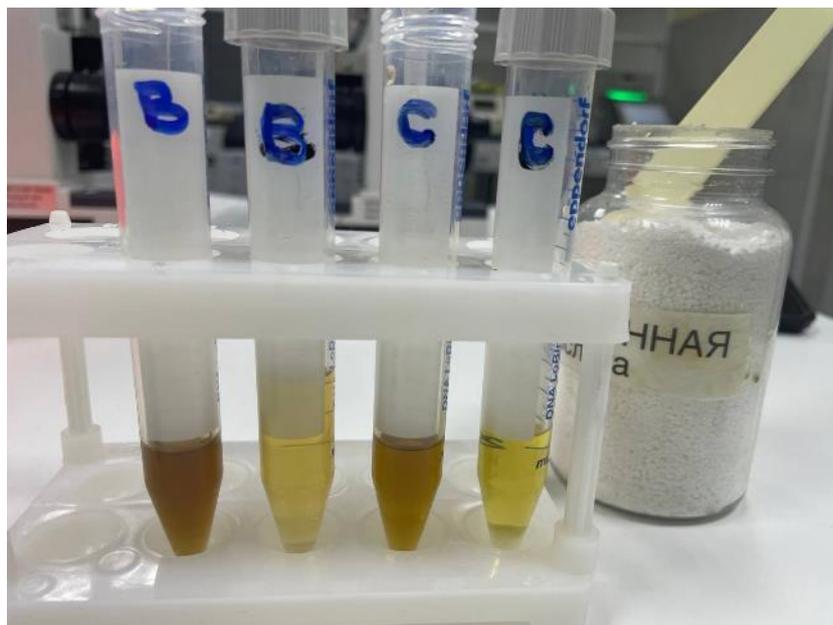


Рис.19. Водный (В), спиртовой (С) экстракты в сравнении с прореагировавшими экстрактами.

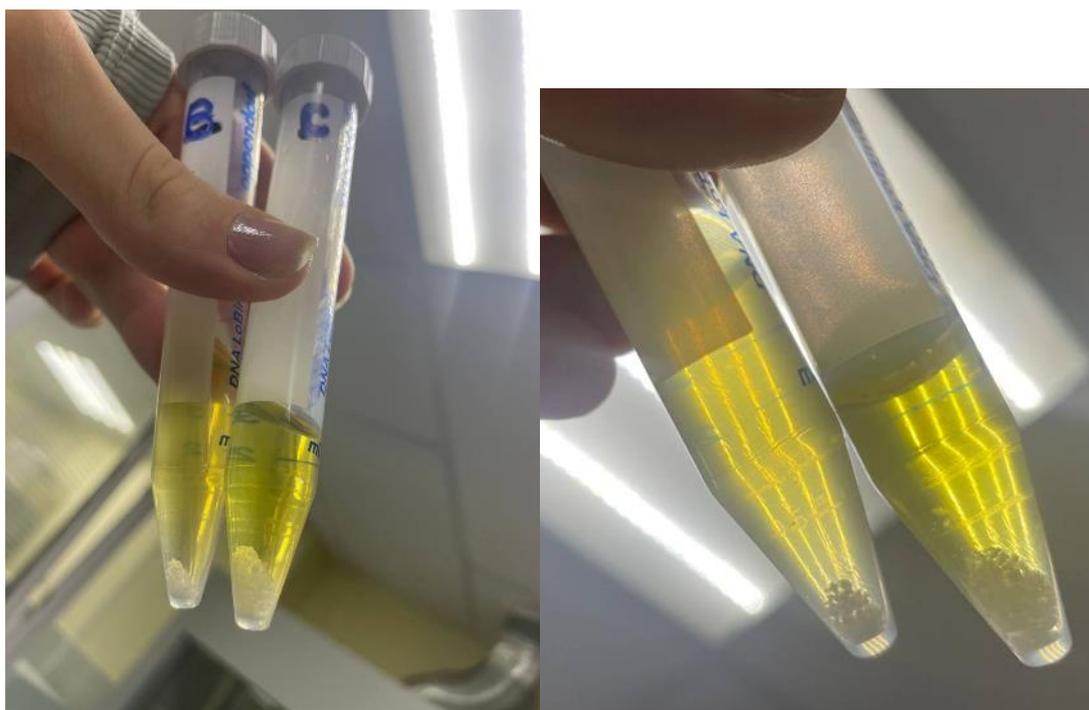


Рис. 20,21. Экстракты приобрели ярко-жёлтое окрашивание.

2.7 Определение микробиологической чистоты.

Испытание на микробиологическую чистоту включало подготовку образцов экстрактов перед испытанием. Предварительно стерилизованные в автоклаве водный и спиртовой экстракты шалфея обозначили за В2 и С2. Нестерилизованные водный и спиртовой экстракты, обозначили за В1 и С1.



Рис.22. Автоклавирование образцов экстрактов.

При проведении исследования использовалось лабораторное оборудование: Автоклав автоматический с вакуумной сушкой STE-8 class B., Термостат суховоздушный с охлаждением Binder KB 400, Ламинарный бокс, Автоматические механические дозаторы.

Расходные материалы исследования: чашки Петри.

Используемые тест-микроорганизмы: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

Используемые питательные среды для исследования:



Рис.23. Питательная среда №1.

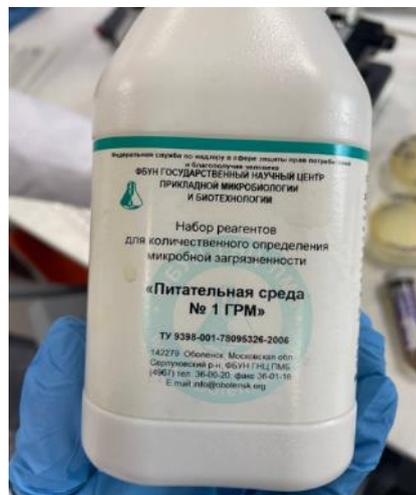


Рис.24. Питательная среда №2.

Питательная среда № 1 – ГРМ для количественного определения микробной загрязненности.

Состав, г/л: Панкреатический гидролизат рыбной муки – 15,0

Панкреатический гидролизат казеина – 10,0

Дрожжевой экстракт – 2,0

Натрия хлорид – 3,5

Д-глюкоза – 1,0

Агар – 10,0 (+ – 2,0)

Питательная среда № 2 – агар Сабуро для выделения и учета дрожжевых и плесневых грибов с хлорамфениколом сухой.

Состав, г/л: Панкреатический гидролизат рыбной муки сухой – 10,0

Панкреатический гидролизат казеина сухой – 10,0

Дрожжевой экстракт – 2,0

Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный – 2,0

Д-глюкоза – 40,0

Левомецитина натрия сукцинат (хлорамфеникол) – 0,1

Агар бактериологический – 10,0 (+ – 3,0)

При анализе микробиологической чистоты использовались методы: определение общего числа жизнеспособных аэробных бактерий и грибов – методом глубинного посева, определение наличия бактерий *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

Испытание проводилось в асептических условиях, с целью предотвращения контаминации исследуемых образцов.

Ход работы:

В способе приготовления на упаковке обозначена масса среды (39,5 г) на 1 л, а для данного опыта такой объем среды будет излишним, поэтому производился пересчет массы на 50 мл дистиллированной воды.

ГРМ агар.

$$\frac{39,5^g}{1\text{ л воды}} \Rightarrow \frac{39,5 \cdot 0,05^l}{1} = 1,975^g$$

х 2 на 0,05 л (50 мл)

1,975^г на 0,05 л (50 мл)

Рис. 25. Пересчет массы питательной среды с 1 л на 50 мл.

Ход работы приготовления питательных сред:

1,975 г среды размешали в 50 мл дистиллированной воды, кипятили 2 мин. до полного расплавления агара, фильтровали через ватно-марлевый фильтр, разливали в стерильные флаконы и стерилизовали автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин.



Рис. 26. Взвешивание сухой пит. среды. Рис. 27. Кипячение и расплавление агара.



Рис. 28. Автоклави́рование питательных сред.

Ход работы проведения экспериментальной работы:

Для определения аэробных микроорганизмов: По 100 микролитров (далее мкл) испытуемых образцов В1 и С1 вносили в две половины первой чашки Петри. По 100 мкл испытуемых образцов В2 и С2 в две половины второй чашки Петри. Добавляли по 10 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45°C ГРМ агара в каждую чашку.

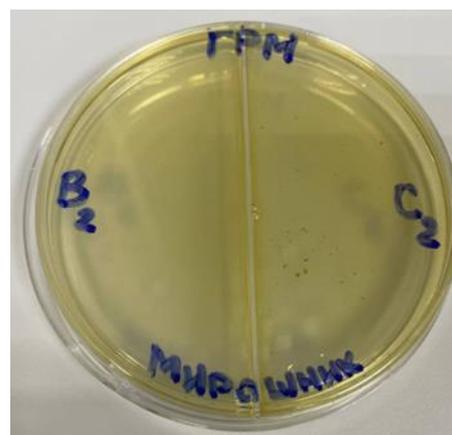
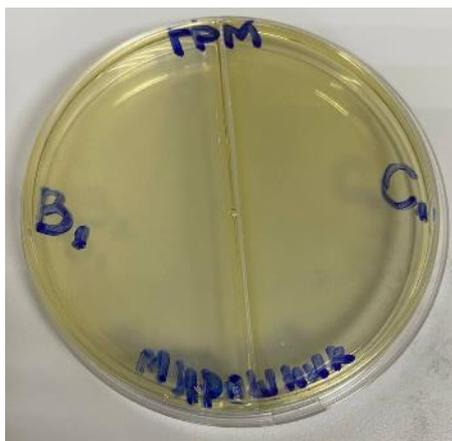


Рис. 29. В1, С1 до периода инкубации. Рис.30. В2, С2 до периода инкубации.

Для определения дрожжевых и плесневых грибов: По 100 мкл испытуемых образцов В1 и С1 вносили в две половины первой чашки Петри. По 100 мкл испытуемых образцов В2 и С2 в две половины второй чашки Петри. Добавляли по 10 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45°C сабуро-декстрозного агара в каждую чашку.

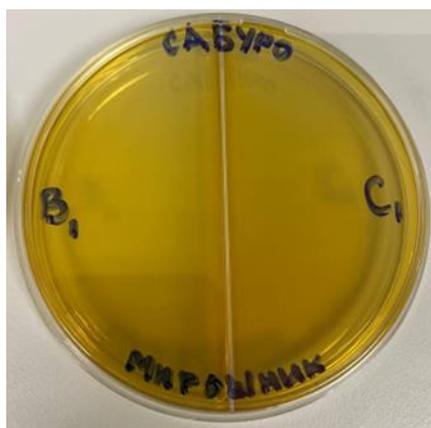


Рис.31. В1, С1 до периода инкубации. Рис. 32. В2, С2 до периода инкубации

Чашки петри с ГРМ и сабуро агаром инкубировали в течение 3 суток при температуре 37°C. По истечении срока инкубации, подсчитывали колонии бактерий.

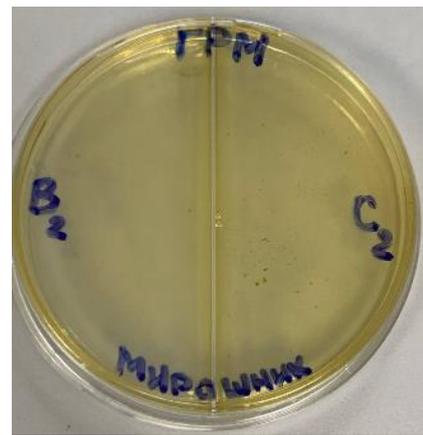
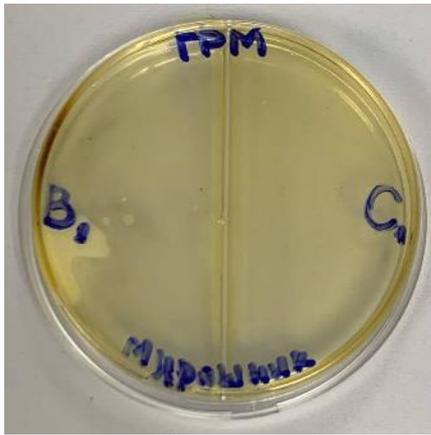


Рис. 33. В1 обладает 6 колониями бактерий. Рис.34. В2, С2 бактериально чисты. С1 бактериально чист.

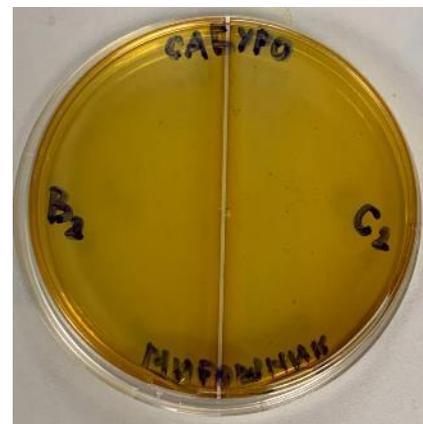
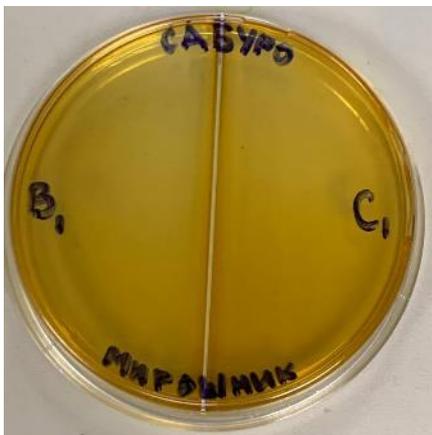


Рис.35. В1, С1 не содержат грибов.

Рис.36. В2, С2 не содержат грибов.

2.8 Исследование экстрактов на антибактериальную активность.

При исследовании экстрактов на антибактериальную активность, пробу, взятую из спиртового экстракта, обозначили за П1 (проба 1), а из водного за П2 (проба 2). Испытания проводили диффузионным методом глубинного посева с помощью лунок.

При подготовке и проведении исследования использовали оборудование: Ламинарный бокс, Термостат суховоздушный с охлаждением Binder KB 400, Автоматические механические дозаторы, Весы аналитические Ohaus AX224, Вортекс персональный V-1 plus, Денситометр DEN-1 McFarland Densitometer.

Расходные материалы исследования: пробирки на 15 мл, чашки Петри двухсекционные, бактериологическая петля.

Испытание проводилось в асептических условиях, с целью предотвращения контаминации исследуемых образцов.

Ход работы:

Приготовление суспензий *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*:

В пробирке на 10 мл добавили физ.-раствор (0,9% NaCl). Брали суточные культуры *Escherichia coli*, бактериологической петлей касались колонии и помещали в пробирку. Пробирку перемешивали сначала вручную, затем на Вортексе V-1 plus. На денситометре смотрели показания, получали 0,5 ЕМФ.



Рис. 37. Приготовление суспензий. Рис. 38. Мутность суспензий смотрели на денситометре.

Проведение эксперимента: В двухсекционные стерилизованные чашки Петри расставляли по 2 цилиндра с каждой стороны делая лунки. По 100 мкл тест-микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* вносили в две разные половины чашки Петри. Добавляли по 10 мл расплавленного и охлажденного до температуры 45°C ГРМ агара. После застывания ГРМ агара, в лунки вливали по 100 мкл водных и спиртовых экстрактов. Чашки Петри убирали в термостат на 2 суток при температуре 37°C.

По окончании инкубации, отмеряли по линейке зоны подавления роста бактерий.



Рис. 39. Ход работы.



Рис. 40. Проба 1 (спиртовой экстракт) проявляет антимикробную активность на микроорганизмы *Escherichia coli*. Зона подавления роста у пробы спиртового экстракта шалфея составила 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Экстракция

Модифицированным методом однократной экстракции были получены водный и спиртовой экстракты шалфея лекарственного. Испытания показали, что модификация экстракции не инактивировала флавоноидные соединения в экстрактах шалфея.

Оценка органолептических показателей показала, что по внешнему виду экстракты представляют собой прозрачные жидкости без осадка, со свойствами растению вкусом, пряным ароматом и цветом – от светло-коричневого до тёмно-зелёно-коричневого.

3.2. Качественный анализ

Изучение антиоксидантной активности экстрактов растений методом качественных реакций показало, что рассмотренные экстракты проявляют антиоксидантные свойства.

В ходе проведения исследований были качественно обнаружены и идентифицированы флавоноиды в приготовленных экстрактах из растительного сырья лекарственного растения шалфей. Идентификация биоантиоксидантов в приготовленных экстрактах шалфея свидетельствует об антиоксидантной активности данных экстрактов. Идентифицированы 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы, флавонолы, флаваноны и флавоны.

3.3. Микробиологическое исследование.

Исследованием на микробиологическую чистоту была выявлена бактериальная и грибковая чистота стерилизованных водного и спиртового экстрактов, а также нестерилизованного спиртового экстракта шалфея. Нестерилизованный экстракт обладал колониями бактерий, не превышающими по количеству лимитированную норму для нестерилизованных лекарственных субстанций. (См. табл. 3).

Результаты изучения антибактериальных свойств экстрактов позволяют сделать вывод, что добавление в питательную среду экстракта шалфея вызывает угнетение роста бактерий *Escherichia coli*.

ВЫВОДЫ

1. Провели анализ и обзор литературы по химическому составу, ботаническим характеристикам, антибактериальным и антиоксидантным свойствам известного лекарственного растения шалфей. В том числе по биоантиоксидантам, содержащимися в растительном сырье шалфея и методам их идентификации.

2. Модифицированным методом одноразовой экстракции были получены водный и спиртовой экстракты шалфея лекарственного.

3. Органолептические показатели экстрактов соответствовали нормированным показателям для экстрактов. Полученные экстракты шалфея обладали приятным пряным запахом, что в перспективе может быть использовано для дальнейшего применения.

4. На основании проведённых исследований идентифицировали флавоноиды (биоантиоксиданты) в водном и спиртовом экстрактах, что свидетельствует об антиоксидантных свойствах данных экстрактов шалфея лекарственного. Изучено, что антиоксидантная активность обуславливается присутствием сложного комплекса флавоноидов в лекарственно-растительном сырье.

5. Исследованием на микробиологическую чистоту выявили бактериальную чистоту стерилизованных и нестерилизованных водных и спиртовых экстрактов. Показатели микробиологической чистоты экстрактов об учёте общего числа аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г или в 1мл, общего числа грибов – не более 10^2 КОЕ соответствуют требованиями ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд. и могут быть использованы для обеспечения качества субстанции – жидких экстрактов шалфея.

6. Спиртовой экстракт при испытании на антибактериальную активность ингибировал рост бактерий *Escherichia coli*. Лунки с зонами ингибирования бактерий размерами 1 см, свидетельствуют об антибактериальных свойствах спиртового экстракта растения шалфея лекарственного.

7. *Общие выводы:* В приготовленных по модифицированной методике экстрактах шалфея лекарственного идентифицированы флавоноиды, что свидетельствует об антиоксидантной активности экстрактов. Оценка органолептических показателей показала, что по внешнему виду экстракты представляют собой прозрачные жидкости без осадка, со свойственными растению вкусом, ароматом и цветом. Установлено, что антибактериальными свойствами обладает спиртовой экстракт шалфея. Определение микробиологической чистоты выявило бактериальную и грибковую чистоту у созданных экстрактов.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАБОТЫ

Полученные данные могут быть использованы для обоснования использования экстрактов из растительного сырья шалфея лекарственного. Водные и спиртовые экстракты шалфея лекарственного обладают антиоксидантной активностью, бактериальной и грибковой чистотой, антибактериальной активностью (спиртовой), нормальными органолептическими показателями. Из чего можно сделать вывод, что полученные экстракты шалфея могут быть использованы в дальнейшем для создания напитков с высокой биологической ценностью.

Изучение ценных свойств экстрактов лекарственных растений положило начало разработкам собственных чайного и сокосодержащего напитков с антиоксидантной активностью и высоким содержанием БАВ с добавлением экстрактов шалфея.

Полученные экстракты шалфея обладают приятным пряным запахом и могут быть использованы в качестве основы для производства пищевой, лечебно-профилактической и парфюмерно-косметической продукции.

Принимая во внимание содержание флавоноидов, антибактериальную активность экстрактов, приготовленных по модифицированной методике, считаю, что данные экстракты шалфея перспективны для дальнейших исследований с целью более широкого применения на благо человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М.В. Гаврилин, О.И. Попова, Е.А. Губанова / Фенольные соединения надземной части Шалфея Мускатного, культивируемого в Ставропольском крае. / ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. 2010. №4. С. 99–104
2. Гребенникова О.А., Палий А.Е., Работягов В.Д. Биологически активные вещества *Salvia officinalis* L // Бюллетень ГНБС. 2014. №111.
3. Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Ветрова Е.Н., Пономарева Н.И. Сравнение химико-аналитических методов определения танидов и антиоксидантной активности растительного сырья // Аналитика и контроль. – 2011. – Т. 15, № 2. – С. 202 – 208.
4. Ивахненко Е. Л., Стрилец О. П., Стрельников Л. С., Кустова С. П. Оценка микробиологической чистоты мягкой лекарственной формы с катиазином // Человек и его здоровье. 2013. №2.
5. Чугунова О. В., Пастушкова Е. В. Исследование антиоксидантной активности лекарственно-технического сырья Уральского региона и напитков на его основе // Технические науки – от теории к практике. 2015. №7-8 (44).
6. Каталог «НІМEDIA». Сухие питательные среды и добавки, 2003. Mumbai, Индия. [Электронный ресурс]
7. Böszörményi A., Héthelyi É., Farkas Á., Horváth G., Papp N., Lemberkovics É., Szóke É. Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and judean sage (*Salvia judaica* Boiss.) // J. Agric. Food Chem. – 2009. – Vol. 57, № 11. – P. 4663 – 4667.
8. Аминова М. Антибактериальные и противовоспалительные свойства лекарственного растения Шалфей // Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина» № 10 – ноябрь (27) 2018г
9. Путырский, И. Н. Лекарственные растения: энциклопедия / И. Н. Путырский, В. Н. Прохоров. – Минск: Книжный Дом, 2003.с

- 10.Большакова, Н. В. Антиоксидантные свойства ряда экстрактов лекарственных растений / Н. В. Большакова // Биофизика. – 1997. – Т. 42. – Вып. 2. – С. 480–483.
- 11.Митасева, Л. Ф. Использование экстрактов растений в качестве антиоксидантов / Л. Ф. Митасева // Мясная индустрия. 2002.№ 12.С. 28–29.
- 12.Sharifi, Mohsen & Ermakova, Valentina & Alexander, Luferov & Luferov, Alexander. (2022). Quantitative determination of medicinal sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the raw material of different origins.
- 13.Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия // Издание четвертое, переработанное и дополненное, Москва «Медицина» 2002. С. 219–221.
- 14.Байкова Е.В. Закономерности морфологической эволюции шалфеев (*Salvia*, Lamiaceae) // Автореферат диссертация. ... докт. биол. наук, М.: Главн. бот. сад им. Н.В.Цицина, 2005 б. 36 с.
- 15.Пепанян А.А. Использование антиоксидантов в косметологии // Вестник медицинского института им. Меграбяна. Ереван, 2007. С. 34–39.
- 16.Nanaski Y., Ogawa S., Fukui S. The correlation between oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids //Free radic. Biol Med. 1994.Vol. 8. Pp. 77–97.
- 17.Денисов Е.Т., Денисова Т.Г. Реакционная способность природных фенолов // Успехи химии. 2009. Т. 78, №11. С. 1129–1155.
- 18.Tikhonov I., Roginsky V., Pliss E. The Chain – breaking antioxidant activity of phenolic compounds with different of OH groups as determinend during the oxidation of styrene // Int. J. Chem. Kinet. 2009. Vol. 41. Pp. 92–100.
- 19.Е.С. Колядич, Антиоксидантные и антибактериальные свойства водных экстрактов пряно-ароматических и лекарственных растений / Л.М. Павловская, А.Н. Лилишенцева, Е.С. Александровская, О.В. Шрамченко / –Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию:29.07.2008.

20. Дмитриевна Г.Ю. Влияние экологических факторов на содержание в растениях некоторых антиоксидантов. Автореферат диссертация. ... канд. биол. наук. Калининград, 2009. 25 с.
21. Атабекян Л.В. Определение количественного содержания флавоноидов в листьях глухой крапивы (Яснотка Белая) – *Laminum Album L.* и барбариса – *Berberus* // Химический журнал Армении. 2012. Т. 65, N1. С. 34–38.
22. Marfak A., Trouillas P., Allais Redox reactions obtained by irradiation of quercetin methanol solution ar similar in vivo metabolism // *Radiat Res.* 2003. Vol. 159. Pp. 218–227.
23. Т.П. Зюбр, И.Б. Васильев. ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ// Раздел 2 «Водные извлечения из лекарственного растительного сырья» / Учебно-методическое пособие. Иркутск, 2008. С.4–5.
24. Лейн. Т. Е. 5 простых способов обогащения соков и сокосодержащих напитков / Т. Е. Лейн // Пищевые ингредиенты, сырье и добавки. – 2004. – № 2. – С. 30–31
25. Байкова Е.В. Род шалфей: морфология, эволюция, перспективы интродукции. Новосибирск: Наука., 2006. С. 21–32.
26. Кондрашова Ю.С. Флавоноиды. Физико химические свойства. Методы идентификации и выделения флавоноидов // *FORCIPE.* 2019. № Приложение.
27. Синютина С. Е., Шубина А. Г., Конюхова Е. В. Определение флавоноидов в растительном сырье Тамбовской области // *Вестник российских университетов. Математика.* 2010. №1.
28. Исмаилов И. З., Кравцов А. А. Микробиологическая чистота как показатель качества сухого экстракта из надземных частей *Radus Graynaе Maxim* // *Наука и образование сегодня.* 2017. №1.
29. Губанова Е.А., Попова О.И. Фенольные соединения некоторых видов рода *Salvia* (Lamiaceae) флоры России и их биологическая активность // *Растительные ресурсы.* 2009. Т. 45, вып. 3. С. 137–160.

30. Губанова Е.А., Лысенко Т.А., Попова О. И., Ивашев М.Н. Противовоспалительная активность настоя травы шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae) – Вест. Воронеж. гос. ун-та. сер: Хим. Биол. Фарм. 2009, 2, 165-166.
31. ФС.2.5.0051.15 Шалфея лекарственного листья. Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 22.
32. Lu Y., Foo L.Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis* - *Phytochemistry* 2000, Oct., 55(3), 263-267.
33. Доля В.С., Тржецинский С.Д., Мозуль В.И., Третьяк Н.И. Особенности химического состава видов рода *Salvia* L. - Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики 2013, 083-085.
34. Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Изучение состава биологически активных веществ сухих экстрактов эхинацеи узколистной и шалфея лекарственного - *Химия растительного сырья* 2012, 1, 153-160.
35. Омариева Л.В., Юнусова Ф.М. Экстракция эфирного масла шалфея и его фитохимический анализ - *Вестник Дагестанского Государственного Университета. Серия 1: Естественные Науки* 2014, 1, 184-188.
36. ОФС.1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота. Взамен ГФ XI, вып. 2, стр. 193.
37. Гринкевич-Н.И.-Сафронич-Л.Н. Химический-анализ-лекарственных-растений. Учебное пособие, Москва «Высшая школа», 1983. С.43–48.
38. Шайдуллина Г.Г., Пупыкина К.А., Улямаева Д.Р. Сравнительное изучение содержания макро- и микроэлементов в некоторых видах рода шалфей - *Евразийский союз ученых* 2016, 29-3, 6-7.
39. Рыбашлыкова Л.П. Макро- и микроэлементы в лекарственных растениях, культивируемых в Астраханской области - *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2017 20, 5, 33-35.
40. ОФС.1.4.1.0021.15 Экстракты. Взамен ст. ГФ XI