

На правах рукописи

РОВКИНА Ксения Игоревна

**РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ АКТИВНОЙ  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО  
ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НЕКОТОРЫХ ВЫСШИХ  
РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ СИБИРИ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, доцент **Белоусов Михаил Валерьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Бомбела Татьяна Владимировна** - доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники, профессор

**Тернинко Инна Ивановна** - доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, испытательная лаборатория (центр контроля качества лекарственных средств), начальник

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск

Защита состоится «24» декабря 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел. (342) 2335501) Тел/факс (342)233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.068.02,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы.

Одной из наиболее проблемных задач современной медицины является терапия сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в ряду основных причин возникновения которых можно выделить нарушения липидного обмена. В современной стратегии медикаментозной коррекции дислипидемий и профилактики ССЗ в России центральное место занимает терапия статинами. Вместе с тем, в результате широкомасштабных клинических исследований последних лет показано, что монотерапия статинами, даже в высоких дозах, не всегда приводит к достижению целевых значений липопротеидов низкой плотности.

В качестве второй линии терапии гиперхолестеринемии/дислипидемии в настоящее время рассматриваются 2 класса препаратов – ингибиторы обратного захвата холестерина (эзетимиб) и секвестранты желчных кислот (СЖК), в частности холестирамин, препятствующие всасыванию холестерина и желчных кислот в просвете желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Несмотря на высокую эффективность последних, они не имеют широкого применения в стандартах лечения в РФ. Ограниченное использование этого класса препаратов в клинической практике обусловлено их высокой токсичностью и частотой возникновения побочных явлений. Механизм действия холестирамина связан с ионным обменом, в результате которого в просвете ЖКТ создается избыточная концентрация ионов, в частности хлорид-аниона, значительно превышающая физиологическую, поэтому при продолжительном лечении возникают гиперхлоремический ацидоз, экхимоз, геморроидальные, желудочные и кишечные кровотечения, снижение протромбинового времени.

Исследования в области разработки препаратов для терапии гиперхолестеринемии ведутся в том числе с использованием растительных полисахаридов, конкурентным преимуществом которых является отсутствие токсического действия.

В связи с этим, создание новых высокоэффективных и безопасных гипохолестеринемических лекарственных средств является актуальным и востребованным направлением.

### Степень разработанности темы исследования.

Проведённое ранее комплексное исследование активности полисахаридов высших растений, выделенных из листьев березы (*Betula pendula* Roth. (*Betula verrucosa* Ehrh.), *Betula pubescens* Ehrh.), листьев боярышника (*Crataegus sanguinea* Pall.), надземной части люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), надземной части болиголова (*Conium maculatum* L.), листьев мать-и-мачехи (*Tussilago farfara* L.), корневищ и корней девясила высокого (*Inula helenium* L.), цветков календулы (*Calendula officinalis* L.), побегов багульника болотного (*Ledum palustre* L.), корневищ аира (*Acorus calamus* L.), ряски (*Lemna minor* L.), цветков липы (*Tilia cordata* Mill.), листьев подорожника большого (*Plantago major* L.) показало в рамках эксперимента *in vitro*, что наиболее выраженную сорбционную активность

по отношению к желчным кислотам и холестерину проявляли полисахариды, выделенные из листьев березы, боярышника и надземной части люцерны посевной. В связи с этим полисахариды, выделенные из данных объектов, выбраны для дальнейшей характеристики химического состава и сравнения гипополидеической активности в эксперименте *in vivo*.

**Цель:** На основании сравнительного исследования гипополидеической активности, состава и структуры полисахаридов некоторых высших растений флоры Сибири разработать активную фармацевтическую субстанцию для профилактики и терапии атеросклероза.

**Задачи исследования:**

1. Выделить и дать химическую характеристику полисахаридных комплексов листьев березы, боярышника кроваво-красного и надземной части люцерны посевной.

2. Провести скрининговое исследование гипополидеической активности *in vivo* выделенных полисахаридных комплексов для выбора объекта получения активной фармацевтической субстанции (АФС).

3. Определить оптимальные условия получения активной фармацевтической субстанции из растительного сырья (листья березы).

4. Установить химическую структуру полисахаридов листьев березы.

5. Разработать параметры стандартизации АФС для проекта НД «Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана».

**Научная новизна.**

1. Впервые проведено сравнительное исследование гипополидеической активности *in vivo* полисахаридов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной.

2. Определено влияние параметров выделения полисахаридов из листьев березы на выход, содержание низкомолекулярных примесей и молекулярные характеристики.

3. Впервые установлена структура полисахаридов листьев березы, обладающих гипополидеической активностью.

4. Впервые установлены параметры стандартизации АФС на основании установленной структуры полисахаридов листьев березы и разработана методика их количественного определения методом спектрофотометрии.

**Практическая значимость и внедрение результатов работы.**

Полученные экспериментальные данные о структуре полисахаридов листьев березы, обладающих гипополидеической активностью, позволили обосновать аналитические подходы к их стандартизации. Разработана и валидирована методика количественного определения полисахаридов листьев березы, которая вошла в проект нормативной документации «Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана». Методика используется в учебном процессе Сибирского государственного медицинского университета при обучении студентов и ординаторов фармацевтического факультета по дисциплинам

«Аналитическая химия» и «Фармацевтическая химия», студентов медико-биологического факультета по дисциплине «Основы спектрального анализа». С помощью разработанной методики количественного определения полисахаридов листьев березы проведено изучение стабильности субстанции на основе L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана, произведенного в Центра внедрения технологий СибГМУ, в рамках доклинических исследований, поддержанных грантом Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт от «28» апреля 2017 г. №14.N08.11.0132). Полученные результаты НИР являются основой для разработки нового лекарственного средства, предназначенного для коррекции хронических дислипидемий в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3,6 паспорта специальности.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Химическая характеристика полисахаридных комплексов, выделенных из листьев березы, боярышника кроваво-красного и надземной части люцерны посевной.
2. Результаты скринингового исследования гиполипидемической активности полисахаридов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной.
3. Результаты оптимизации методики выделения полисахаридов листьев березы.
4. Химическая структура L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана.
5. Результаты разработки и валидации методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана и определение параметров стандартизации субстанции.

**Апробация результатов исследования.**

Основные результаты исследования легли в основу 23 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах из перечня ВАК, 2 патентов Российской Федерации и 15 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

**Личный вклад автора** заключается в планировании дизайна исследования, получении экспериментальных данных, их обработке и систематизации, а также в обобщении и обсуждении результатов работы. Автором подготовлены статьи для публикации, проект нормативной документации и текст диссертации.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 21 рисунок; состоит из введения, пяти глав, заключения и выводов, списка использованных литературных источников, включающего 198 наименований, 3 приложений.

## Основное содержание работы

**Во введении** отражена актуальность исследования, сформулированы цели и задачи. В **первой главе** приведен анализ данных литературы о методах исследования ПС, который выявил, с одной стороны, их многообразие, обусловленное сложностью исследуемых объектов, а с другой – отсутствие универсальных методов, позволяющих корректно решать аналитические задачи по стандартизации ПС. Показана необходимость разработки индивидуальных подходов с учетом особенностей химической структуры определяемого вещества, его физико-химических свойств и задач анализа. Во **второй главе** приводится описание методик проведения эксперимента, характеристика растительного сырья, реактивов и аппаратуры, методики определения фармакологической активности. **Третья глава** посвящена характеристике полисахаридных комплексов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной и обоснованию выбора перспективного объекта исследований на основании сравнительного исследования гипополидеммической активности. В **четвертой главе** изучены процессы экстракции полисахаридов из растительного сырья, а также влияние критических факторов стандартных методик на их деградацию. Приведены результаты ионообменной хроматографии полисахаридов листьев березы и ферментативного гидролиза мажорной фракции, а также его характеристика методом ЯМР-спектроскопии. В **пятой главе** представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения, а также описаны параметры качества активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов листьев березы. На основании полученных результатов сделаны выводы и обобщающее заключение.

## Результаты и обсуждение

Для скрининга гипополидеммической активности проводили выделение полисахаридных комплексов из растительного сырья водой очищенной, подкисленной HCl до pH 3-4. Полученные ПСК из листьев боярышника кроваво-красного (ПСК БК), листьев березы (ПСК Б), надземной части люцерны посевной (ПСК Л) охарактеризованы по основным параметрам, представленным в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики ПСК изучаемого сырья

| Параметр            | ПСК БК     | ПСК Б      | ПСК Л      |
|---------------------|------------|------------|------------|
| Выход, %            | 1,8±0,2    | 2,4±0,4    | 3,7±0,3    |
| Углеводы, %         | 90,6±1,9   | 96,9±1,12  | 92,2±1,3   |
| Уроновые кислоты, % | 19,1±0,6   | 55,9±3,4   | 20,9±0,9   |
| Глюкоза, %          | 17,41±0,92 | -          | 12,19±0,73 |
| Галактоза, %        | 38,88±2,00 | 9,58±0,52  | 9,96±0,52  |
| Ксилоза, %          | 2,05±0,11  | -          | -          |
| Арабиноза, %        | 12,24±0,75 | 1,44±0,09  | 48,31±3,86 |
| Рамноза, %          | -          | 26,42±2,25 | -          |

|                        |               |               |               |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Белок, %               | 8,56±0,41     | 2,16±0,12     | 4,02±0,11     |
| Нуклеиновые кислоты, % | 0,0038±0,0003 | 0,0034±0,0004 | 0,0046±0,0004 |
| M <sub>w</sub> , кДа   | 413,7±19,9    | 310,2±15,1    | 366,8±14,9    |

Исследуемые ПСК в своем составе содержат уроновые кислоты (от 19,1 до 55,9 %), при этом их высоким содержанием отличается образец, полученный из листьев берёзы. Различается и состав нейтральных моносахаридов. Так, мажорным моносахаридом ПС листьев боярышника является галактоза, содержание которой в полисахаридах других исследуемых видов растений почти в 4 раза ниже. В составе ПСК, выделенных из листьев березы, наряду с уроновыми кислотами преобладающим компонентом является рамноза, отсутствующая в ПСК боярышника и люцерны. Наиболее гомогенный образец ПСК выделен из надземной части люцерны посевной ( $K=9,8$ ), тогда как ПСК листьев березы, напротив, характеризовались наибольшей гетерогенностью ( $K=20,6$ ).

Для **оценки гиполипидемической активности** полисахаридов изучаемых растений проведено исследование по определению их влияния на уровень общего ХС, ЛПНП и ЛПВП в сыворотке крови крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной атерогенной диетой. Результаты представлены на рисунке 1.

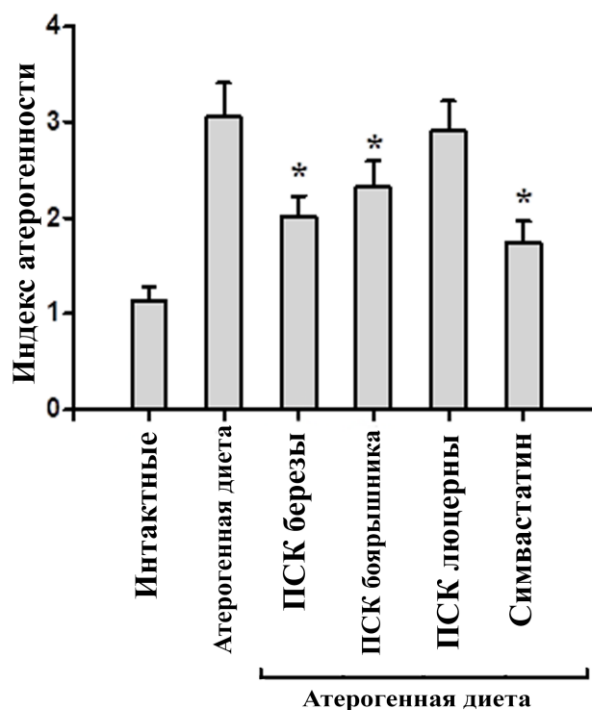


Рисунок 1 – Влияние курсового применения ПСК березы, боярышника, люцерны и симвастатина на индекс атерогенности

В результате проведенного эксперимента установлена выраженная гиполипидемическая активность ПСК листьев березы в дозе 200 мг/кг, достоверно превышающей активность ПСК люцерны и боярышника, сопоставимая с активностью референтного препарата – симвастатина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мг/кг. Таким образом, в качестве перспективного объекта для дальнейших исследований выбран ПСК листьев березы.

## Оптимизация параметров выделения ПС листьев березы

### Стадия экстракции.

#### Влияние степени измельчения.

Согласно данным таблицы 2, наибольший выход ПСfВ наблюдали при использовании сырья с размером частиц 1,2-2 мм, в то же время использование сырья со степенью измельчения 2-3 мм привело к незначимому изменению выхода.

Таблица 2. Влияние размера частиц сырья на выход ПСfВ и содержание белка.

| Фракция          | Выход ПСfВ, %    | Содержание белка, % |
|------------------|------------------|---------------------|
| 1 (менее 1,2 мм) | 1,86±0,09        | 3,05±0,31           |
| 2 (1,2-2 мм)     | <b>3,01±0,33</b> | 2,16±0,18           |
| 3 (2-3 мм)       | <b>2,86±0,21</b> | 2,08±0,15           |
| 4 (3-10 мм)      | 2,53±0,22        | 2,15±0,19           |
| 5 (более 10 мм)  | 1,99±0,16        | 2,00±0,11           |

Использование наиболее измельченного сырья (менее 1,2 мм) приводит к значительному снижению выхода целевых веществ, что связано с замедленным массопереносом за счет осаждения и уплотнения частиц сырья. Также, при использовании данной фракции сырья наблюдали увеличение содержания белковых примесей, что вероятно связано с механическими разрушением клеток сырья, приводящих к повышенной экстракции белка.

#### Влияние рН экстракции.

В качестве экстрагента использовали воду очищенную, подкисленную хлористоводородной кислотой до значения рН 2,0; 4,0; и воду очищенную без добавления хлористоводородной кислоты рН 6,5-7,0. Результаты представлены на рисунке 2.

Фракции образцов, экстрагируемых водой очищенной (рН 6,5-7,0), имели молекулярную массу выше, чем у образцов, полученных при подкислении, что обусловлено более мягкими условиями их выделения, и как следствие, менее выраженной деградации исходной макромолекулы.

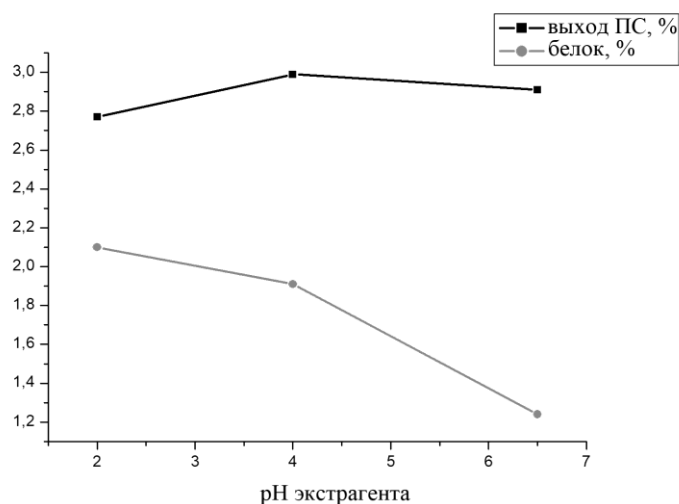


Рисунок 2 – Влияние рН экстрагента на выход ПСfВ и белка. Содержание примесей белка увеличивалось со снижением рН экстрагента,



что, возможно, связано с активацией кислых гидролаз и разрывом кислотоллабильных связей, вызывающих разрушение клеточной стенки. Так же длительное воздействие кислоты при высокой температуре, по-видимому, нарушает структурную целостность полимера и, очевидно, вызывает деградацию углеводных цепей, образованных остатками нейтральных моносахаридов. Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что значение рН экстрагента не оказывает существенного влияния на суммарный выход ПСfВ, но влияет на его качество – содержание белка и ММР (рисунок 2).

#### Влияние соотношения «сырье:экстрагент».

Для определения влияния соотношения «сырье:экстрагент» на выход готового продукта и на его качественные характеристики проводили эксперимент по изучению влияния различных соотношений экстрагента (воды очищенной рН=7) и растительного сырья (листьев березы). В эксперименте исследовали значения соотношений «сырье:экстрагент» : 1:10; 1:20; 1:30; 1:40. Из результатов эксперимента (рисунок 3) видно, что при соотношениях «сырье:экстрагент» 1:20; 1:30 и 1:40 не наблюдается значимых различий в выходе конечного продукта, а использование 10 частей экстрагента к 1 части сырья приводит к значительному снижению выхода.

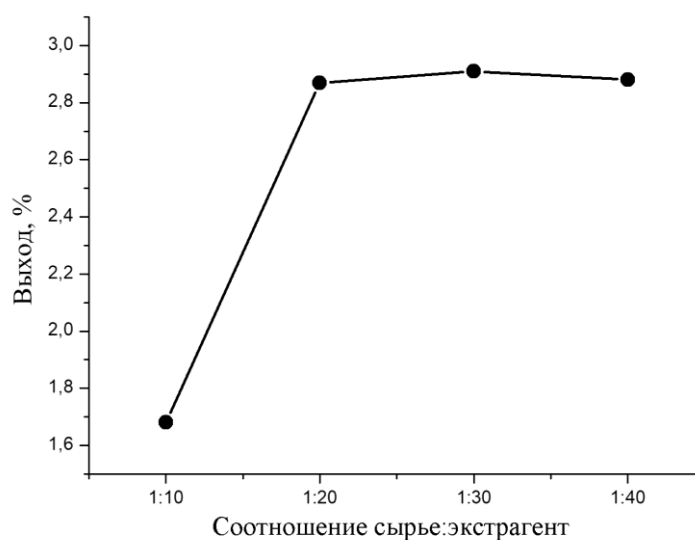


Рисунок 3 – Зависимость выхода ПСfВ от соотношения «сырье:экстрагент»

Таким образом, использование соотношений «сырье:экстрагент» 1:30 и 1:40 не приводит к увеличению выхода продукта и усложняет технологический процесс, связанный с упариванием большего количества растворителя.

#### Влияние температурного режима экстракции.

Для определения влияния температурного режима экстракции на выход и качество ПСfВ проведено сравнение этих показателей при температуре 50 °С, 90 °С и комнатной температуре (22 °С). Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние температурного режима экстракции на выход и молекулярные массы ПСfВ

| Температура экстракции, °С | Выход ПСfВ, % | Молекулярно-массовое распределение |                      |
|----------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------|
|                            |               | W, %                               | M <sub>w</sub> , кДа |
| 22                         | 1,75±0,14     | 15,76                              | 347,1                |
|                            |               | 46,32                              | 151,5                |
|                            |               | 23,41                              | 107,2                |
|                            |               | 14,5                               | 56,2                 |
| 50                         | 3,21±0,27     | 21,97                              | 415,3                |
|                            |               | 62,14                              | 366,5                |
|                            |               | 15,89                              | 143,3                |
| 90                         | 2,90±0,21     | 15,28                              | 419,9                |
|                            |               | 42,43                              | 336,4                |
|                            |               | 30,48                              | 272,0                |
|                            |               | 11,81                              | 135,3                |

Из полученных данных (таблица 3) видно, что экстракция при комнатной температуре приводит к меньшему выходу ПСfВ со снижением молекулярных масс. По-видимому, это обусловлено снижением интенсивности экстракции макромолекул из растительного сырья за счет замедления процессов смачивания и растворения, тогда как для низкомолекулярных веществ эти процессы проходят наиболее легко. При использовании высоких температур экстракции (90 °С) происходит частичная деградация макромолекул ПСfВ, что может оказывать влияние как на ММР, так и суммарный выход ПСfВ.

Таким образом, определены **оптимальные параметры на стадии экстракции:**

- степень измельчения растительного сырья – 1,2-3 мм;
- экстрагент – вода очищенная с рН = 6,5-7,0;
- значением температуры экстрагента – 50 °С;
- соотношение сырье:экстрагент – 1:20.

#### *Стадия упаривания*

##### Влияние температуры упаривания.

При изучении влияния температуры упаривания на выход и качество ПСfВ проводили экстракцию 3-х серий листьев березы. Полученные извлечения упаривали на роторном испарителе при 30, 50 и 90 °С при давлении в системе 25 мбар. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Влияние температуры упаривания экстракта на выход и молекулярные массы ПСfВ

| Температура упаривания экстракта, С | Время упаривания, мин | Выход ПСfВ, % | Молекулярно-массовое распределение |                      |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------|------------------------------------|----------------------|
|                                     |                       |               | W, %                               | M <sub>w</sub> , кДа |
| 30                                  | 105 мин               | 3,35±0,25     | 33,20                              | 407,3                |
|                                     |                       |               | 55,89                              | 328,8                |
|                                     |                       |               | 10,9                               | 129,2                |
| 50                                  | 58 мин                | 3,33±0,29     | 30,94                              | 391,5                |
|                                     |                       |               | 43,67                              | 338,9                |
|                                     |                       |               | 25,39                              | 117,4                |
| 90                                  | 42 мин                | 3,32±0,26     | 0,98                               | 409,3                |
|                                     |                       |               | 76,55                              | 341,8                |
|                                     |                       |               | 22,45                              | 125,5                |

Для образцов, упаренных при 90 °С, значения ММР заметно ниже, по сравнению с образцами, упаренными при более низкой температуре, что свидетельствует об ухудшении качества готового продукта. Из данных эксперимента видно, что упаривание экстракта при температуре 30 °С не приводит к снижению выхода и качества готового продукта, но значительно увеличивает время проведения процесса (в 1,8 раз). При 50 °С так же не происходит уменьшения выхода и снижения качества ПСfВ, однако значительно сокращается (на 45 %) время процесса по сравнению с упариванием при 30 °С.

#### Влияние степени упаривания.

При изучении влияния степени упаривания экстракта на выход ПСfВ получали 4 серии экстракта листьев березы, которые упаривали на ротормном испарителе при температуре 50 °С в 5, 4, 3 и 2 раза.

При 5-кратном упаривании экстракта, в испарительной колбе наблюдалось пленкообразование и залипание экстракта, что не позволило провести следующие технологические стадии и получить стандартизованный конечный продукт. Поэтому данная серия исключена из эксперимента, и сделан вывод о нецелесообразности 5 кратного упаривания экстракта. Различие в выходе ПСfВ при разной степени упаривания экстракта незначительно и составляет 0,1-0,2 % (таблица 5).

Таблица 5. Влияние степени упаривания экстракта на выход ПСfВ

| Степень упаривания экстракта, раз | Выход ПСfВ, % |
|-----------------------------------|---------------|
| 4                                 | 3,35±0,32     |
| 3                                 | 3,27±0,29     |
| 2                                 | 3,17±0,24     |

Упаривание экстракта в 4 раза приводит к меньшему расходу осаждающего агента – этилового спирта, что снижает затраты на получение конечного продукта.

Таким образом, определены **оптимальные параметры на стадии упаривания** экстракта:

- температура упаривания экстракта – 50 °С;
- упаривание проводить в 4 раза.

*Стадия осаждения.*

Влияние соотношения «концентрат:этанол».

Избыточная концентрация осаждающего агента может привести к соосаждению балластных низкомолекулярных веществ, которые потребуют введения дополнительных стадий очистки на дальнейших этапах технологического процесса, что также усложняет технологию и делает ее менее рациональной. В эксперименте изучали влияние «концентрат:этанол» в соотношениях 1:2, 1:3 и 1:4 на выход и молекулярную массу ПСfВ.

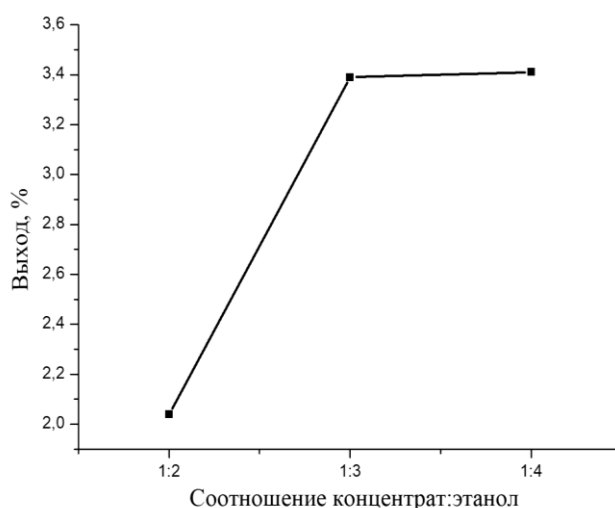


Рисунок 4 – Зависимость выхода ПСfВ от соотношения «концентрат:этанол».

Из данных эксперимента (рисунок 4) видно, что использование соотношения «концентрат:этанол» 1:2, приводит к значительно меньшему выходу ПСfВ. Значения ММР образцов, полученных осаждением в соотношении «концентрат:этанол» – 1:3 и 1:4, различаются незначительно и разница в выходе не существенна, однако соотношение 1:3 является более рациональным по затратам осаждающего агента (этанола).

*Стадия очистки.*

При анализе ИК-спектров ПСfВ, полученных при использовании различных методов очистки от НМП, выявлено, что наименее эффективным методом является промывка горячим этанолом (отношение 1610/1630  $\text{см}^{-1}$  – 0,70), а для образца, очищенного методом диализа, – 0,56. Наиболее эффективным методом очистки от НМП по данным эксперимента является ультрафильтрация: отношение 1610/1630  $\text{см}^{-1}$  – 0,41. Дополнительным преимуществом данного метода являются высокая скорость очистки при одновременном концентрировании и отсутствии затрат на растворители для очистки, что делает метод экономически выгодным и

сокращает время выделения ПС.

### Выделение основной фракции методом ионообменной хроматографии

Полученные по оптимизированной методике ПСfВ анализировали методом высокэффективной эксклюзионной хроматографии, что показало их гетерогенный профиль элюирования, поэтому для дальнейшего изучения химической структуры необходимо дополнительно провести фракционирование методом ионообменной колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе (в ОН<sup>-</sup>форме). Содержание углеводов в каждой пробирке определяли фенол-серным методом, белок – методом Лоури. По полученным данным строили хроматограмму элюирования (рисунок 5).

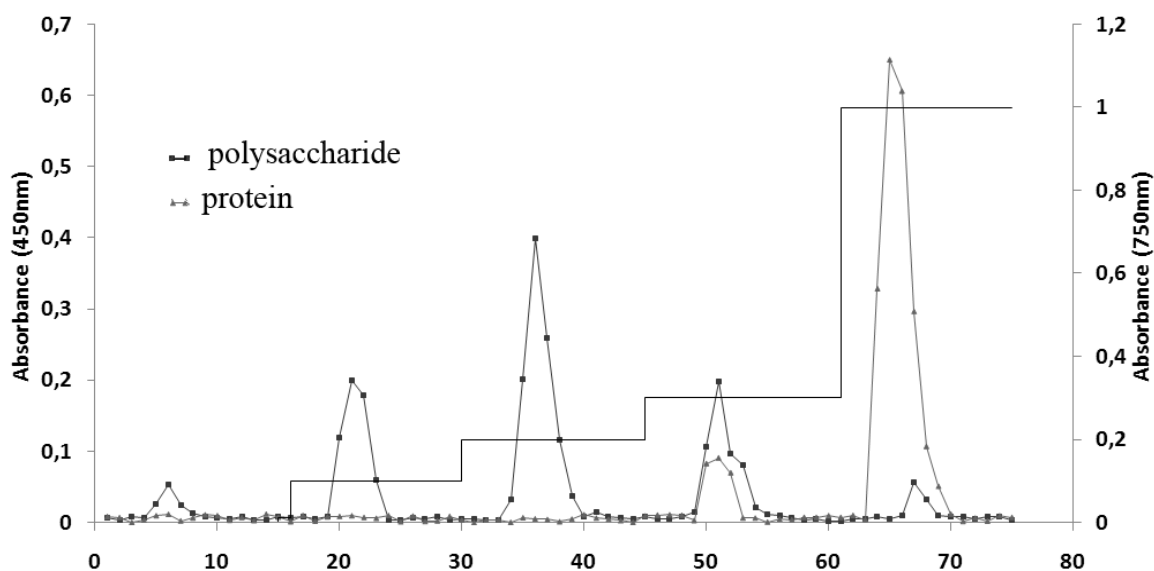


Рисунок 5 – Кривая элюирования полисахаридов и белка на DEAE-целлюлозе

В результате получено 5 фракций, мажорной из которых являются ПС, элюированные 0,2 М раствором NaCl и выход которых превышает 50 % от массы исходной навески ПСfВ. Для полученных фракций определены моносахаридный состав, содержание урсонных кислот, молекулярные массы (таблица 6). Практически весь белок, содержащийся в качестве примеси к ПСfВ, элюирован 0,5 М раствором NaCl, что свидетельствует об отсутствии ковалентных связей между белковым и полисахаридным компонентами.

Таблица 6. Характеристика фракций ПС березы после ионообменной хроматографии

| ПС             | Выход, %          | Содержание, % <sup>c</sup> |             |            |            | Mw, кДа      | Mn, кДа     | Mw/Mn       |
|----------------|-------------------|----------------------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|
|                |                   | GalA                       | Rha         | Ara        | Gal        |              |             |             |
| <b>ПСfВ</b>    | -                 | 50,9±1,8                   | 29,1        | 2,0        | 10,5       | 355,4        | 15,0        | 23,67       |
| ПСfВ -1        | 1,31±0,02         | 50,3±2,0                   | 11,8        | 2,9        | 8,2        | н/о          |             |             |
| ПСfВ -2        | 17,05±1,18        | 54,4±2,4                   | 11,6        | 3,3        | 16,8       | н/о          |             |             |
| <b>ПСfВ -3</b> | <b>59,28±3,92</b> | <b>59,1±3,0</b>            | <b>22,5</b> | <b>5,6</b> | <b>6,7</b> | <b>174,9</b> | <b>27,1</b> | <b>6,45</b> |
| ПСfВ -4        | 13,16±1,27        | 70,7±4,0                   | 10,5        | 0,9        | 4,0        | н/о          |             |             |
| ПСfВ -5        | 1,54±0,02         | 73,2±4,4                   | 9,4         | 0,8        | 3,8        | н/о          |             |             |

\*GalA – галактуроновая кислота, Rha – рамноза, Ara – арабиноза, Gal – галактоза; н/о – не определено.

Как видно из таблицы 6, все полученные фракции сходны по составу и различаются лишь соотношением моносахаридов. Во всех фракциях преобладает в составе галактуроновая кислота и рамноза, которые, вероятно, образуют главную углеводную цепь, а полученные ПС можно описать как рамногалактуронан I типа, следовательно, арабиноза и галактоза образуют боковые цепи. Таким образом, полученные ПСfВ являются смесью полимергомологов и для дальнейшего исследования структуры нами выбрана мажорная фракция ПСfВ-3, характеризующаяся меньшей степенью гетерогенности в сравнении с нанесенным на колонку образцом ПСfВ.

Для решения проблемы характеристики полисахаридов, вызванной их сложной структурой и большими молекулярными массами, использован подход "bottom-up", схема структурного анализа представлена на рисунке 6.

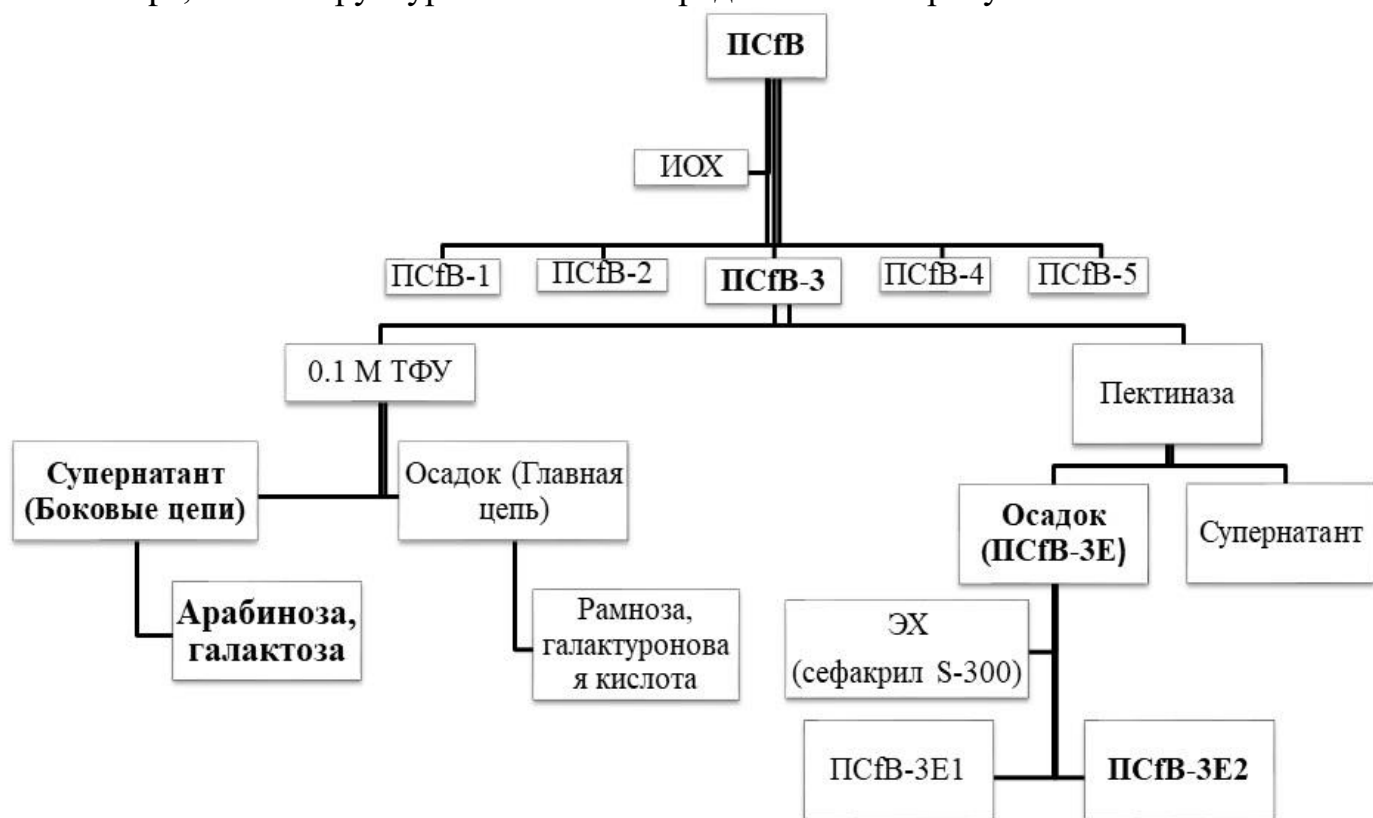


Рисунок 6 – Схема структурного анализа фракции ПСfВ

Как показал анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ, полученная фракция отличалась высокой гомогенностью, что говорит об эффективности выбранных методов пробоподготовки. Полисахарид ПСfВ-3Е2 (выход 81,7 %) имел на хроматограмме симметричный одиночный пик.

Для дальнейшей характеристики главной углеводной цепи и определения характера гликозидных связей применен метод ЯМР-спектроскопии на ядрах  $^{13}\text{C}$ .

Таблица 8. Химические сдвиги сигналов ЯМР-спектра фрагмента полисахарида листьев березы.

| Остаток моносахарида                | <sup>13</sup> C ЯМР химические сдвиги |      |      |      |      |       |                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------|------|------|------|------|-------|-------------------|
|                                     | C-1                                   | C-2  | C-3  | C-4  | C-5  | C-6   | O-CH <sub>3</sub> |
| $\alpha$ -L-Rhap-(1→(Rt))           | 102.1                                 | 71.5 | 71.4 | 73.5 | 70.2 | 17.9  | -                 |
| →2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→(R))       | 100.0                                 | 77.5 | 70.6 | 73.3 | 70.2 | 17.9  | -                 |
| →4)- $\alpha$ -GalpA-(1→2(GA))      | 98.9                                  | 69.2 | 71.3 | 78.4 | 72.2 | 175.8 | -                 |
| →4)- $\alpha$ -GalpA(OMe)-(1→(GA’)) | 101.5                                 | 69.2 | 69.9 | 80.0 | 71.6 | 172.1 | 54.3              |

В аномерных областях спектров ЯМР <sup>13</sup>C полисахарида присутствовали уширенные сигналы различной интенсивности. Обнаружены четыре основных сигнала рамнопиранозильных и галактуранопиранозильных остатков. Два интенсивных сигнала при 100 и 98,9 м.д. в спектре ЯМР <sup>13</sup>C аномерной области идентифицированы как соответствующие 2-О-замещенные рамнопиранозильные остатки (R) и 4-О-замещенные галактуранопиранозильные остатки (GA) рамногалактуранана-I. Дополнительный интенсивный сигнал при 101,5 м.д. обнаружен в спектре, который идентифицирован как соответствующие метилэтерифицированные 4-О-связанные галактуранопиранозильные остатки (GA’) области гомогалактуранана. Сигналы C-1 невосстанавливающих концевых рамнопиранозильных остатков (Rt) при 102,1 м.д. идентифицированы в спектрах. Другие диагностические области включают сигналы COOH при  $\delta$ C 175,8 и COOCH<sub>3</sub> 172,8 м.д., кроме того, обнаружен интенсивный сигнал атома углерода метоксильной группы (COOCH<sub>3</sub>) при  $\delta$ C 54,3 м.д.

### Стандартизация субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуранана

*Определение молекулярно-массового распределения ПС методом эксклюзионной хроматографии*

Точную навеску ПС (0,001 г) растворяли в 1,0 мл воды деионизированной, центрифугировали 15000 об/мин в течение 10 минут и анализировали на жидкостном хроматографе с эксклюзионной колонкой TSK-gel GMP<sub>XL</sub> 300×7,8 мм («Supelco», Япония), подвижная фаза – 0,1 М раствор NaCl, 1,0 мл/мин. Регистрацию компонентов проводили с помощью рефрактометрического детектора.

На хроматограмме ПС листьев березы должны быть **3 основных компонента с молекулярными массами: 400±10, 320±5, 190±5 кДа.**

### *ИК-спектроскопия*

Использовали метод записи ИК-спектра в таблетке с калия бромидом (ОФС.1.2.1.1.0002.15) рисунок 7.

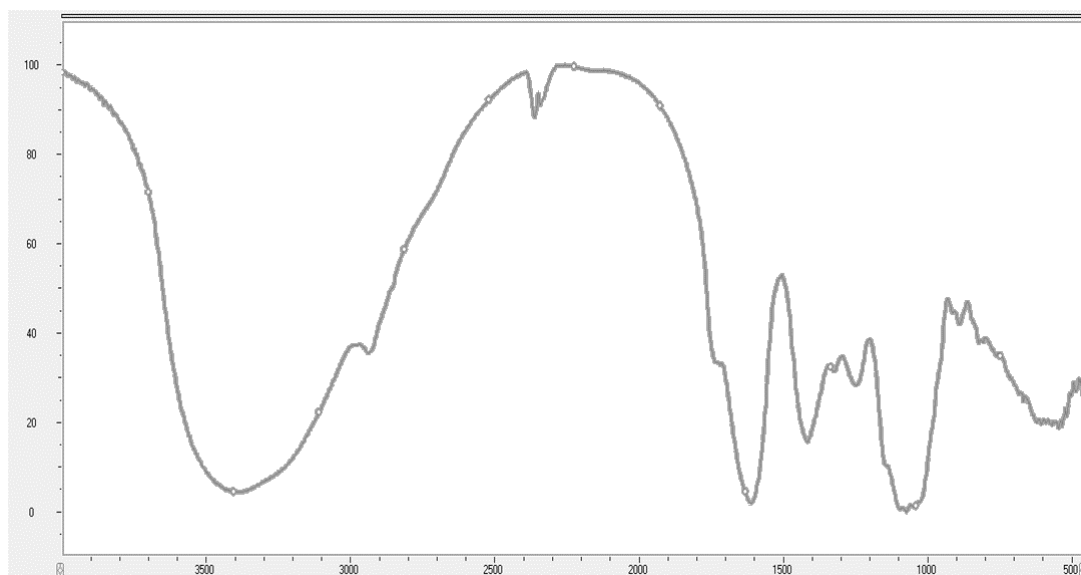


Рисунок 7 – ИК-спектр таблетки KBr с L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронатом

В ИК-спектре наблюдается широкая интенсивная полоса поглощения в области **3100-3600 см<sup>-1</sup>**, характерная для валентных колебаний гидроксильных групп С-ОН и валентных С-Н групп. Но наиболее информативной областью в ИК-спектроскопии полисахаридов является область от **1800-1000 см<sup>-1</sup>**, в которых наблюдаются две интенсивные полосы поглощения **1747 и 1609 см<sup>-1</sup>**, характерные для метоксилированных и кислых сахаров. Полоса при **1418 см<sup>-1</sup>** соответствует валентным колебаниям С-Н связей, полоса поглощения при **1240 см<sup>-1</sup>** деформационным колебаниям С-О связей в галактуроновой кислоте. Так же в этой области можно идентифицировать кольцевые колебания С-С связей при **1017 см<sup>-1</sup>** с валентными колебаниями С-ОН боковых групп при **1147 см<sup>-1</sup>** и С-О-С гликозидных связей полисахаридов при **1100 см<sup>-1</sup>**.

### **Разработка и валидация методики количественного определения субстанции**

Предлагаемые Государственной фармакопеей XIV ОФС.1.2.3.0019.15 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом» способы количественного определения сахаров: метод определения с пикриновой кислотой и метод определения с орциновым реактивом – не нашли применения в стандартизации субстанции ПСfВ, т.к. основаны на определении только восстанавливающих сахаров (с пикриновой кислотой) или только пентоз (с орциновым реактивом). Третий, предлагаемый фармакопейной статьей, метод определения с антроновым реактивом также имеет недостаток: количественный расчет проводится по стандарту глюкозы, что приводит к искажению результатов анализа полисахаридов, не содержащих ее в своей структуре.





Рисунок 8 – Алгоритм методики количественного определения ПС березы

На рисунке 8 представлены разработанные условия проведения реакции ПСfВ с антроном в присутствии серной кислоты для количественного анализа.

Исходя из установленного моносахаридного состава ПС березы, записаны электронные спектры продуктов реакции стандартов моносахаридов с антроном в разработанных условиях анализа (рисунок 9). Спектры поглощения комплексов антрона с продуктами окисления рамнозы и галактозы имеют максимум поглощения при длине волны  $625 \pm 2$  нм. Однако на спектрах галактуроносовой кислоты и арабинозы отсутствовали данные полосы поглощения.

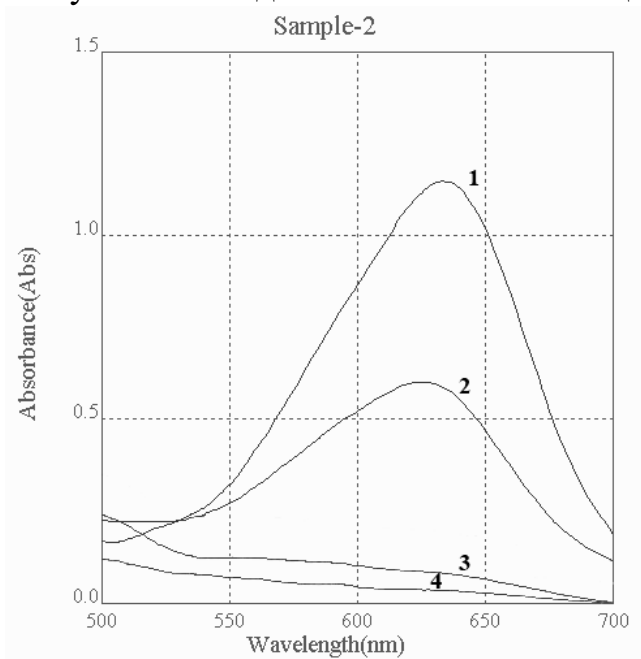


Рисунок 9 – Электронные спектры модельных растворов моносахаров 1 мг/мл с антроном в разработанных условиях (1 – рамноза, 2 – галактоза, 3 – арабиноза, 4 – галактуроносовая кислота)

Поскольку в ПС березы мажорными компонентами являются рамноза и галактуроносовая кислота (таблица 6), не образующая оптически активный при длине

волны  $625 \pm 2$  нм комплекс с антроном, то в качестве стандартного вещества для антрон-серного метода количественного определения ПС березы предложено использовать рамнозу.

Для расчета содержания ПС использовали формулу:

$$X\% = \frac{m_0 \times Abs_1 \times P \times 3}{Abs_0 \times m_1}$$

где  $X\%$  – содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции,

$m_0$  – масса навески стандарта рамнозы,

$Abs_1$  – оптическая плотность испытуемого раствора,

$P$  – содержание основного вещества в стандарте рамнозы,

3 – коэффициент пересчета на рамнозу,

$Abs_0$  – оптическая плотность стандартного раствора,

$m_1$  – масса навески L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана.

**Валидацию методики** количественного определения проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».

Аналитическая область, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал содержаний L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана от 40 до 120 %. Коэффициент корреляции составляет  $R^2 = 0,9965$ , что свидетельствует об удовлетворительной линейности зависимости оптической плотности от концентрации L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в изучаемом диапазоне (рисунок 10).

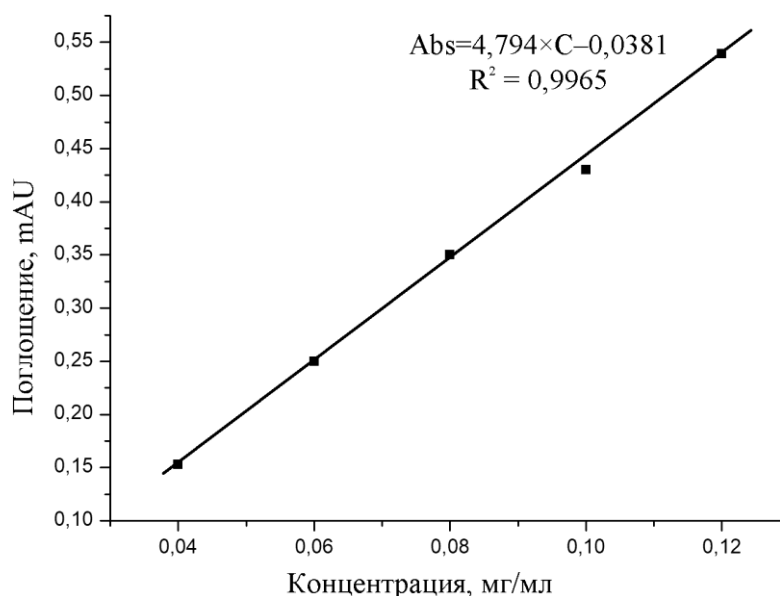


Рисунок 10 – Градуировочный график L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

Правильность методики устанавливали путём определения количественного содержания L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в модельных растворах для четырех уровней концентраций: 0,05; 0,075; 0,10 и 0,12 мг/мл

(содержание 50, 75, 100 и 120 % соответственно). Правильность оценивали путем расчета относительного стандартного отклонения ( $\delta$ , %) результатов. Результаты определения правильности методики представлены в таблице 9.

Таблица 9. Оценка правильности методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

| Содержание ПСfВ в растворе, мг/мл |           | $\delta$ , % | $\bar{\delta}$ , % |
|-----------------------------------|-----------|--------------|--------------------|
| теоретическое                     | найденное |              |                    |
| 0,120                             | 0,123     | 2,78         | 2,8                |
|                                   | 0,116     | 3,67         |                    |
|                                   | 0,118     | 1,94         |                    |
| 0,100                             | 0,103     | 3,47         | 3,1                |
|                                   | 0,097     | 2,80         |                    |
|                                   | 0,103     | 3,00         |                    |
| 0,075                             | 0,072     | 4,67         | 4,1                |
|                                   | 0,079     | 4,84         |                    |
|                                   | 0,077     | 2,67         |                    |
| 0,050                             | 0,053     | 6,67         | 6,7                |
|                                   | 0,054     | 8,89         |                    |
|                                   | 0,048     | 4,67         |                    |

Показано, что методика является правильной, и относительная ошибка в диапазоне содержаний 75-120 % не превышает 5 % и достигает 6,7 % близи предела количественного определения.

Прецизионность методики определяли в условиях повторяемости и воспроизводимости. Проверку повторяемости проводили в трехуровневом эксперименте по 6 параллельных определений выбранных концентраций.

Воспроизводимость методики оценивали в совместном эксперименте в двух различных лабораториях СибГМУ (Лаборатория контроля качества ЦВТ и Лаборатория инновационных фармацевтических технологий ЦНИЛ) разными операторами на различных спектрофотометрах по шесть образцов для трех уровней концентрации. При анализе повторяемости и воспроизводимости верхнему уровню соответствовала навеска 80 мг (80 %), среднему 100 мг (100 %) и нижнему 120 мг (120 %).

Анализ полученных данных оценки повторяемости (таблица 10) свидетельствует о статистической однородности выборок, отражая прецизионность методики в условиях повторяемости в диапазоне содержаний L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана 80-120 % ( $n=6$ ,  $p=0,95$ ).

Таблица 10. Оценка повторяемости методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

| $X_{ист}$ % | $X_{ср}$ , % | $S_x$ | $\Delta X$ | $\sigma_r$ , % |
|-------------|--------------|-------|------------|----------------|
| 80          | 79,90        | 0,349 | 0,90       | 0,44           |
| 100         | 100,57       | 0,327 | 0,84       | 0,33           |
| 120         | 120,73       | 0,302 | 0,78       | 0,25           |

В разработанной методике анализа сходимость в условиях повторяемости ( $\sigma_r$ ) составила 0,25-0,44 %.

Для проверки гипотезы об однородности двух выборок использован двухсторонний F-критерий. Табличное значение  $F(0,025, 5, 5) = 7,15$  сравнивали с расчетным ( $F_{расч.} = S_{max}^2/S_{min}^2$ ), при выполнении неравенства  $F_{расч.} < F(0,025, 5, 5)$  принимали нуль-гипотезу и рассчитывали относительное отклонение (RSD%,  $\sigma_R$ ) по выборке  $n=12$  (таблица 11).

Таблица 11. Оценка воспроизводимости методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

| $X_{ист}$ % | $X_{ср,i}$ , % |        | F    | $S_x$ | $\sigma_R$ , % |
|-------------|----------------|--------|------|-------|----------------|
| 80          | 79,90          | 80,40  | 1,36 | 0,71  | 0,89           |
| 100         | 100,57         | 101,15 | 1,73 | 0,61  | 0,61           |
| 120         | 120,73         | 121,06 | 1,55 | 0,53  | 0,44           |

Значения параметров воспроизводимости, приведенные в таблице 4, показывают удовлетворительную сходимость результатов определения методики в условиях межлабораторной прецизионности. Следовательно, предлагаемая аналитическая методика валидна по показателю воспроизводимости в исследуемом диапазоне содержаний L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана.

Разработанная методика количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана на основе фармакопейного антрон-серного метода, валидирована по показателям специфичности, линейности, правильности и прецизионна в условиях повторяемости и воспроизводимости и включена в проект нормативной документации «Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана».

#### **Выводы:**

1. Получены и охарактеризованы по молекулярной массе (ПСК БК (413,7±19,9 кДа), ПСК Б (310,2±15,1 кДа), ПСК Л (366,8±14,9 кДа)), моносахаридному составу (ПСК БК UA 19,1±0,6 %, Glc 17,41±0,92 %, Gal 38,88±2,00 %, Xsy 2,05±0,11 %, Ara 12,24±0,75 %; ПСК Б UA 55,9±3,4 %, Gal 9,58±0,52 %, Ara 1,44±0,09 %, Rha 26,42±2,25 %; ПСК Л UA 20,9±0,9 %, Ara 48,31±3,86 %, Glc 12,19±0,73 %, Gal 9,96±0,52 %), содержанию белковых примесей (ПСК БК 8,56±0,41 %, ПСК Б 2,16±0,12 %, ПСК Л 4,02±0,11 %) полисахаридные комплексы листьев березы, боярышника кроваво-красного и надземной части люцерны посевной.

2. На основании определения гипополипидемической активности полисахаридов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части

люцерны посевной выбран перспективный объект – полисахариды листьев березы, которые на экспериментальной модели индуцированной гиперлипидемии снижали уровень ХС эффективнее, по сравнению с ПС листьев боярышника и надземной части люцерны на 20 и 31 % соответственно.

3. Определены оптимальные условия экстракции полисахаридов из растительного сырья, а также влияние критических факторов выделения и очистки на их деградацию. Показано, что критическими параметрами экстракции, влияющими на выход ПС, являются степень измельченности сырья, температура, соотношение «сырье:экстрагент». В то же время, установлено, что снижение рН экстракции с 6,5 до 2,0, при постоянстве выхода, приводит к снижению молекулярной массы ПС (с 422,5кДа до 307,1кДа) и увеличению содержания белка (с 1,24 % до 2,1 %). Определено, что ультрафильтрация является более эффективным методом очистки ПС, чем диализ и промывка горячим этанолом на 37 % и 70 % соответственно.

4. Установлена химическая структура полисахаридов из листьев березы. Показано, что они состоят из пяти фракций одинакового моносахаридного состава (рамноза – 9,4-22,5 %, галактуронозная кислота – 50,3-73,2 %, галактоза – 3,8-8,2 %, арабиноза – 0,8-5,6 %), т.е. образуют смесь полимергомологов. Методом ЯМР-спектроскопии фрагментов, полученных ферментативным гидролизом и эксклюзионной хроматографией, определено, что основная углеводная цепь образована повторяющимися звеньями L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана.

5. Разработана методика количественного определения L-рамнопиранозил-6-O-алкил-D-галактуронана в фармацевтической субстанции на основе антронсерного метода. Методика соответствует требованиям валидности по показателям: специфичность, линейность (0,04-0,12 мг/мл), правильность в диапазоне содержаний 75-120 % (2,8-4,1 %) и прецизионна в условиях повторяемости (0,25-0,44 %) и воспроизводимости (0,44-0,89 %). Установлены параметры качества L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана (описание, растворимость, подлинность, посторонние примеси, остаточные органические растворители, количественное определение, потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы, микробиологическая чистота) на основе анализа пяти серий субстанции, позволяющие провести стандартизацию субстанции и включить их в проект нормативной документации.

### **Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. Хасанова, С.Р. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) из флоры республики Башкортостан / С.Р. Хасанова, С.В. Кривошеков, Н.В. Кудашкина, А.М. Гурьев, **К.И. Ровкина**, М.В. Белоусов // **Растительные ресурсы.** – 2015. – Том 51, № 3. – С. 397-406.

2. **Ровкина, К.И.** Водорастворимые полисахариды травы люцерны посевной *Medicago sativa* (Fabaceae) флоры Красноярского края / **К.И. Ровкина**, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С.О. Юсубов, М.В. Белоусов // **Химия растительного сырья.** – 2017. – № 2. – С. 57-64.

3. **Ровкина, К.И.** Разработка методики количественного определения полисахаридов листьев березы / **К.И. Ровкина, С.В. Кривощев, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, Е.А. Безверхняя, М.В. Белоусов** // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2019. – Том 14, № 1 (79). – С.47-50
4. **Ровкина, К.И.** Валидация методики количественного определения полисахаридов листьев березы / **К.И. Ровкина, С.В. Кривощев, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов** // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2019. – Том 14, № 2 (80). – С. 48-51.
5. **Ровкина, К.И.** Скрининг гипополидемической активности растительных полисахаридов / **К.И. Ровкина, Е.Е. Буйко, В.В. Иванов, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов** // **Традиционная медицина.** – 2019. – №2(57). – С. 39-44.
6. **Ровкина, К.И.** Разработка методики получения полисахаридов из листьев березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) / **К.И. Ровкина, С.В. Кривощев, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов** // **Химия растительного сырья.** – 2019. – №3. – С. 23-31
7. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью Данилец М.Г., Гурьев А.М., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Шерстобоев Е.Ю., Белоусов М.В., Юсубов М.С., Тобольжина С.А., **Ровкина К.И., Кривощев С.В. патент на изобретение RUS 2657819 27.01.2017**
8. Средство на основе L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана, обладающее гипополидемической активностью Гурьев А. М., Белоусов М. В., Юсубов М. С., Иванов В. В., **Ровкина К.И. патент на изобретение RUS 2019119525 24.06.2019**
9. Ровкина, К.И. Выделение и химическая характеристика полисахаридов *Medicago sativa* L. / К.И. Ровкина // Сборник материалов Всероссийской 72-ой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова. – 2013. – С. 64
10. Ровкина, К.И. Выделение и химическая характеристика полисахаридов *Medicago sativa* L. / К.И. Ровкина, С.В. Кривощев, А.М. Гурьев // Химия и технология растительных веществ: Тезисы докладов VIII Всероссийской научной конференции. – 2013. – С. 286
11. Ровкина, К.И. Исследование полисахаридного комплекса люцерны посевной методом ИК-спектроскопии / К.И. Ровкина, С.В. Кривощев, М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, А.М. Гурьев // Материалы всероссийской молодежной школы-конференции с международным участием «Достижения и проблемы современной химии». – 2014. – С. 174-175.
12. Ровкина, К.И. Анатомическое исследование надземной части люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) / К.И. Ровкина // Сборник материалов Всероссийской 73-ой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова. – 2014. – С. 280-281.
13. Ровкина, К.И. Фракционирование водорастворимых полисахаридов люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) на DEAE-целлюлозе / К.И. Ровкина, С.В. Кривощев, А.М. Гурьев // Сборник III Международной научно-технической

конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Высокие технологии в современной науке и технике». –2014. –С. 282-283.

14. Ровкина, К.И. Выделение полисахаридного комплекса люцерны посевной (*Medicago sativa* L.). / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.А. Курашова // Сборник тезисов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – 2016. – С. 452-455.

15. Буачидзе, А.Р. Характеристика полисахаридных комплексов подземной и надземной части кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L.) / А.Р. Буачидзе, К.И. Ровкина // Сборник материалов Всероссийской 75-ой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова. – 2016. – С.241.

16. Ровкина, К. И. Структура полисахаридов березы повислой. / К.И. Ровкина // Материалы международной научно-практической конференции Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии, посвященной 55-летию ЦНИЛ СибГМУ – 2017. – С. 67.

17. Ровкина, К.И. Рамногалактуронан I листьев березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh / Ровкина К.И., Головченко В.В., Шашков А.С. // Сборник материалов IV Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология». – 2018. – С. 113-114.

18. Власов, С.С. Определение оптимальных технологических параметров получения водорастворимых полисахаридов березы повислой (*Bétula péndula*) / С.С. Власов, К.И. Ровкина // Сборник XXI Всероссийской конференции молодых учёных-химиков (с международным участием). – 2018. – С. 466

19. Ровкина, К.И. Подбор условий реакции для количественного определения полисахаридов березы пушистой / К.И. Ровкина // Сборник XXII Всероссийской конференции молодых учёных-химиков (с международным участием). – 2019. –С. 166

20. Буйко, Е.Е. Способность полисахаридов березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) связывать желчные кислоты в механизме их гипополипдемического действия. / Е.Е. Буйко, О.А. Кайдаш, К.И. Ровкина // Материалы XX международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулева студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – 2019. – С. 307.

21. Ровкина, К.И. Определение количественного содержания желчных кислот в желчи методом ВЭЖХ. / К.И. Ровкина, Д.А. Исаков // Материалы XX международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулева студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – 2019. – С. 327.

22. Ровкина, К.И. Количественное определение полисахаридов листьев березы методом спектрофотометрии. / К.И. Ровкина // Материалы XX международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулева

студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – 2019. – С. 328.

23. Ровкина, К.И. Полисахариды калусных культур василька шероховатого. / К.И. Ровкина, А.Н. Савельева // Материалы XX международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулева студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – 2019. – С. 329.

Ровкина Ксения Игоревна (Россия)

**Разработка и стандартизация активной фармацевтической субстанции гиполипидемического действия на основе полисахаридов высших растений флоры Сибири**

Проведено сравнительное исследование гиполипидемической активности *in vivo* полисахаридов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной. Определено влияние параметров выделения полисахаридов из листьев березы на выход, содержание низкомолекулярных примесей и молекулярные характеристики. Установлена структура полисахаридов листьев березы, обладающих гиполипидемической активностью. Разработаны параметры стандартизации активной фармацевтической субстанции на основании установленной структуры полисахаридов листьев березы и разработана методика их количественного определения методом спектрофотометрии.

Rovkina Kseniya Igorevna (Russia)

**Development and standardization of active pharmaceutical substance of hypolipidemic action based on polysaccharides of Siberia higher plants**

A comparative study of the lipid-lowering activity *in vivo* of polysaccharides of birch leaves and hawthorn, aerial parts of alfalfa was carried out. The influence of the parameters of the isolation of polysaccharides from birch leaves on the yield, the content of low molecular weight impurities, and molecular characteristics was determined. The structure of polysaccharides of birch leaves with lipid-lowering activity was established. The standardization parameters of an active pharmaceutical substance based on the established structure of birch leaf polysaccharides and methodology for their quantitative determination by spectrophotometry have been developed.

Автор выражает глубокую благодарность и признательность д.фарм.н., руководителю центра внедрения технологий СибГМУ Гурьеву А.М., к.х.н., заведующему лабораторией контроля качества СибГМУ Кривошекову С.В. за помощь, оказанную на всех этапах выполнения исследования. Искренне благодарю всех сотрудников Отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН, оказавших содействие в химической характеристике полисахаридов, и отдельно д.х.н., доц. Головченко В.В.