

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук

М.В. Белоусов

Томск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Обзор литературы	
1.1 Нарушения липидного обмена: патогенез, эпидемиология, способы терапии.....	10
1.2 Перспектива использования растительных полисахаридов в предупреждении и лечении дислипидемий.....	14
1.3 Современные методы исследования и стандартизации растительных полисахаридов	22
Глава 2. Объекты и методы исследования	
2.1 Объекты исследования.....	33
2.2 Методы исследования	
2.2.1 Выделение полисахаридов из растительного сырья.....	34
2.2.2 Методы химического исследования.....	35
2.2.3 Методы исследования гиполипидемической активности.....	39
2.3 Статистическая обработка результатов	43
Глава 3. Общая характеристика полисахаридных комплексов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной и выбор перспективного объекта исследований	
3.1 Выделение и химическая характеристика полисахаридных комплексов.....	44
3.2 Сравнительное исследование гиполипидемической активности полисахаридных комплексов и выбор перспективного объекта	45
Глава 4. Выделение и химическая структура полисахаридов листьев березы	
4.1 Определение влияния параметров выделения на выход и	

характеристики полисахаридов листьев березы	49
4.2 Выделение основной фракции методом ионообменной хроматографии.....	61
4.3 Фрагментация основной фракции гидролитическими методами	63
4.4 ЯМР-спектроскопия структурных фрагментов основной фракции.....	67
Глава 5. Стандартизация субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана	
5.1 Определение общих фармакопейных параметров качества субстанции по требованиям ГФ XIV.....	71
5.2 Разработка и валидация методик определения параметра «Подлинность»	72
5.3. Разработка и валидация методик определения параметра «Посторонние примеси».....	75
5.4 Разработка и валидация методики количественного определения субстанции.....	78
ВЫВОДЫ.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	114
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	125
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	128

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФС	– активная фармацевтическая субстанция
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ЖК	– желчные кислоты
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИА	– индекс атерогенности
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
ММР	– молекулярно-массовое распределение
M_n	– среднечисленная молекулярная масса
M_w	– средневесовая молекулярная масса
НД	– нормативная документация
НМП	– низкомолекулярные примеси
ПС	– полисахариды
ПСК	– полисахаридный комплекс
ПСfВ	– полисахариды листьев березы
ССЗ	– сердечно-сосудистые заболевания
ТГ	– триглицериды
ТФУ	– трифторуксусная кислота
ХС	– холестерин
ЭХ	– эксклюзионная хроматография
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Терапия сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) представляет наиболее проблемную задачу современной медицины. В ряду основных причин возникновения ССЗ можно выделить атеросклероз. 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, 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 просвет ЖКТ высвобождаются противоионы (например, хлорид-ион), вызывающие нежелательные явления, 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, преимуществом которых является отсутствие токсического действия на человека.

В связи с этим, создание новых высокоэффективных и безопасных гиполипидемических 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 гиполипидемической активности в эксперименте *in vivo*.

Цель: На основании сравнительного исследования гиполипидемической 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 гипополидемиической 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-О-метил-D-галактуронана».

Научная новизна.

1. Впервые проведено сравнительное исследование гипополидемиической 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 гипополидемиической 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 гипополидемиической 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-О-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). Отчет об изучении стабильности приведен в приложении 3. 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-O-метил-D-галактуронана и определение параметров стандартизации субстанции.

Апробация работы.

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 диссертации. 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Нарушения липидного обмена: патогенез, эпидемиология, способы терапии

Атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности во всем мире, при этом дислипидемия является основной причиной их возникновения [1]. Термин дислипидемия относится к нарушению липидного профиля, включая как гиперлипидемию, так и гиполлипидемию [2]. В клинической практике наиболее частыми и, следовательно, наиболее актуальными дислипидемиями являются гиперлипидемии [3]. Высокий уровень холестерина (ХС) в крови обычно является результатом сочетания генетических и экологических факторов риска. Мутация в гене аполипопротеина-В приводит к наследственной гиперхолестеринемии, также известной как семейная [4]. Другими причинами гиперхолестеринемии являются старение (необъяснимое снижение активности рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) при старении), факторы питания (ХС, насыщенные жирные кислоты, трансжирные кислоты и ожирение), менопауза (потеря эстроген-стимулированного синтеза рецепторов ЛПНП после менопаузы) и употребление алкоголя, а также некоторых синтетических лекарственных средств [2]. Таким образом, лечение и профилактика метаболических нарушений липидного обмена являются актуальной задачей для современной медицины.

В течение последних двух десятилетий терапия статинами была стандартом медицинской помощи во всем мире для лечения повышенного уровня ЛПНП – основной цели терапии у пациентов с дислипидемией [5]. Статины уменьшают печеночный биосинтез ХС, конкурентно ингибируя 3'-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (ГМГ-КоА) редуктазу и, следовательно, стимулируя повышенную экспрессию рецепторов ЛПНП, что было продемонстрировано лауреатами Нобелевской премии Голдштейном и Брауном [6]. Тем не менее, многие пациенты

не могут достичь адекватного снижения ЛПНП с помощью одних только статинов, которые считаются безопасными и хорошо переносимыми, однако в реальной клинической практике побочные эффекты возникают у 10-25% пациентов [7]. Терапия статинами вызывает нервные нарушения, такие как головокружение, сонливость, усталость, дисфункция черепных нервов, тремор, потеря памяти, снижение когнитивной функции, парестезии, периферическая невропатия и паралич периферических нервов, а недавние сообщения указывают на то, что статины могут вызывать и острую нефротоксичность [8-9]. Кроме того, некоторые пациенты не переносят статины из-за миотоксичности, которая приводит к широкому спектру состояний, варьирующихся от легкой миалгии до потенциально летального рабдомиолиза или молниеносного рабдомиолиза с острой почечной недостаточностью в результате миоглобинурии [10].

Для этих пациентов в международных руководствах по лечению дислипидемии обычно рекомендуется либо увеличить дозу статина, либо сочетать терапию статинами с другим гиполипидемическим средством, отличающимся по механизму действия [11]. Следовательно, существует значительная потребность в других методах лечения, которые можно использовать в качестве адъювантной терапии статинами (для неадекватно сниженного уровня ЛПНП или ведения смешанных форм дислипидемии) или монотерапии у пациентов, неспособных придерживаться долгосрочной терапии статинами. При этом нестатиновая терапия так же не лишена недостатков, ее краткая характеристика представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Нестатиновая терапия

Препарат	Механизм действия	Побочные эффекты
Эзетимиб	Ингибирование всасывания ХС в кишечнике путем блокирования белка-транспортера Ниманна-Пика типа С1, что приводит к уменьшению доставки экзогенного ХС в печень и запасов ХС в печени. [12]	При монотерапии: диарея, артралгия, инфекции верхних дыхательных путей. [13-14].

Препарат	Механизм действия	Побочные эффекты
Никотиновая кислота (ниацин)	Ингибирование диацилглицерол-ацилтрансферазу-2 приводит к снижению синтеза триглицеридов (ТГ), ограничивается высвобождение ТГ в кровообращение и, следовательно, нарушается секреция липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). [15]	Не достиг широкого применения в клинической практике из-за накопления жира в печени. Гиперемия кожи, повышение уровня глюкозы, мочевой кислоты и печеночных трансаминаз, расстройство ЖКТ. [16]
Омега-3 жирные кислоты (эйкозапентаеновая, докозагексаеновая, а также их метаболический предшественник, α -линоленовая кислота)	Ингибирование синтеза ТГ в печени, снижение продукции и секреции ЛПНП (ЛПОНП) и усиление метаболизма ЛПОНП[17]	Расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта с риском кровотечений. вероятность хронического отравления солями ртути, содержащейся в морских источниках Омега-3 жирных кислот[18-19]
Торцетрапиб, дальцетрапиб, анацетрапиб и эвацетрапиб	Ингибирование белка-переносчика холестерина эфира из более крупные липопротеины (например, хиломикроны, ЛПНП или ЛПОНП) в липопротеины высокой плотности (ЛПВП). [20-21]	Отсутствие влияния на толщину интима-медиа в сонной артерии. Значительное увеличение систолического артериального давления, поскольку препараты данной группы повышают уровень альдостерона.[22-23].

Препарат	Механизм действия	Побочные эффекты
Фибраты (фенофибрат, этофибрат, клофибрат и др.)	Повышение активности липопротеинлипазы эндотелия, увеличение количества рецепторов ЛПНП и стимулирование эндоцитоза ЛПНП печенью. В небольшой степени ингибирование синтеза эндогенного ХС [24].	Противопоказаны при нарушении функций печени, в связи с чем необходимы регулярный скрининг ферментов крови, а также контроль работы почек. Кожная сыпь, расстройства ЖКТ, миопатия. [25].
Моноклональные антитела (алирокумаб и эволокумаб)	Ингибирование пропротеин-конвертазы, субтилизин-кексинового типа 9, что приводит к увеличению метаболизма ЛПНП [26].	Высокая стоимость и подкожное введение, при этом в месте инъекции нередко развивается аллергическая реакция [27].
Холестирамин, колесевелам и колестипол	Связывание желчных кислот (ЖК) в кишечнике посредством анионного обмена, что приводит к снижению энтерогепатической рециркуляции ЖК, что в свою очередь способствует превращению ХС в ЖК в печени. Снижение содержания ХС в гепатоцитах усиливает экспрессию ЛПВП-рецепторов, что приводит к снижению уровня ЛПВП в сыворотке. [28]	Сложное введение (например, дозирование порошка или прием нескольких таблеток), взаимодействие лекарств и побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, которые часто приводят к отмене препарата (частота отмены - 70%).[29].

Таким образом, все перечисленные группы препаратов, хоть и снижают уровень ХС в крови, однако либо обладают рядом побочных эффектов, провоцирующих отмену препарата, либо не приводят к терапевтической цели – снижению смертности от ССЗ. В связи с чем, актуальным является поиск новых лекарственных кандидатов, обладающих высокой терапевтической активностью в отношении метаболизма ХС, но избавленных от нежелательных эффектов.

1.2 Перспектива использования растительных полисахаридов в предупреждении и лечении дислипидемий

Как отмечено в разделе 1.1 многие синтетические лекарственные средства обладают различными побочными эффектами, поэтому клиническое значение растительных препаратов для лечения гиперлипидемии в последние годы привлекает к себе значительное внимание. Различные растительные биологические вещества [30-32], в том числе полисахариды [33-34], показывают многообещающий эффект в снижении гиперхолестеринемии. При этом основными преимуществами растительных препаратов являются эффективность, безопасность, доступность и низкая стоимость [35]. В тоже время, методы химического анализа биологически активных веществ стали более доступны и намного информативнее, позволяя проводить стандартизацию лекарств из растений на высоком уровне. Поэтому полисахариды последнее время стали активно использоваться для фармацевтических разработок, что подтверждается текущими и выполненными контрактами по программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Растительные полисахариды (ПС) с современной точки зрения могут быть рассмотрены в двух аспектах: как пищевые волокна и как пребиотики.

Считается, что Хипсли (1953) впервые применил термин «пищевые волокна» в качестве сокращенного термина для компонентов стенки растительной клетки, которые были устойчивы к гидролизу пищевыми ферментами человека [36]. Описываемые компоненты включали целлюлозу, гемицеллюлозу, лигнин и связанные с ними второстепенные вещества, такие как воски, кутин и суберин. В 1976 году определение пищевых волокон было расширено, с целью включить все неперевариваемые растительные полисахариды (расширение, главным образом, включает в себя растительные запасные сахараиды), такие как камеди, модифицированные целлюлозы, слизи, олигосахараиды и пектины [37]. Пищевые

волокна стимулируют полезные физиологические эффекты, включая снижение уровня ХС и/или глюкозы в крови [38-39].

Пребиотики также рассматриваются в качестве функционального ингредиента питания. Гибсон и Роберфرويد привели следующее определение: «Пребиотик - это избирательно ферментированный ингредиент, который допускает специфические изменения, как в составе, так в активности микрофлоры желудочно-кишечного тракта, что приносит пользу здоровью хозяина» [40-41]. Далее Гибсон с соавторами постулировал три критерия пребиотика, а именно: (а) устойчивость к кислотности желудка, гидролизу ферментами млекопитающих и желудочно-кишечной абсорбции; (б) ферментация кишечной микрофлорой; и (с) селективная стимуляция роста и активности кишечных бактерий, связанных со здоровьем хозяина [42]. В настоящее время пребиотиками, которые отвечают этим трем критериям, являются фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, лактулоза и неперевариваемые углеводы. Неперевариваемые углеводы, как сказано выше, включают высокомолекулярные полисахариды: инулин, целлюлозу, гемицеллюлозу, пектины и камеди.

ПС, в качестве пребиотика и пищевых волокон могут привести к снижению ХС благодаря двум разным механизмам. Во-первых, более низкая абсорбция ХС обусловлена повышенной экскрецией ХС с калом [43]. Другим механизмом является продуцирование короткоцепочечных жирных кислот при селективной ферментации пребиотиков кишечной бактериальной микрофлорой [44]. Таким образом, введение пребиотиков и пищевых волокон в повседневный рацион, вероятно, играет регулирующую роль в модулировании метаболизма ХС.

Использование ПС в терапевтических целях

Данные многочисленных рандомизированных контролируемых исследований и мета-анализов подтвердили гиполипидемическую эффективность и безопасность некоторых полисахаридов. Показано, что полисахарид из дрожжевых стенок, известный как зимозан, уменьшает атерогенные сывороточные липиды при экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной у мышей [45]. Компонент зимозана нейтральный β -глюкан, как показано,

оказывает гиполипидемический эффект на модели атерогенеза, индуцированного полксамером-407 [46]. Его гипохолестеринемический эффект объясняется способностью набухать после перорального приема, образовывать гель, а затем связываться с ХС и предотвращать его всасывание. Помимо этого, полисахариды, в отличие от статинов, являются естественными стимуляторами макрофагов [47]. После эндоцитоза полисахариды способны «активировать» рецепторы ЛПНП и увеличивать поглощение атерогенного ХС. Было показано, что нейтральный полисахарид, состоящий главным образом из маннозы, стимулирует макрофаги *in vivo* посредством его взаимодействия с маннозо-связывающим лектином и вызывает снижение сывороточного ХС [48].

Глюкоманнанные полисахариды, полученные из клубней *Amorphophallus konjac*, проявляют себя не только как гиполипидемические, но и в качестве гипогликемических агентов [49]. Поскольку глюкоманнан набухает в присутствии воды с образованием вязкого геля, который увеличивает время опорожнения желудка и, как следствие, уменьшает постпрандиальный всплеск уровня глюкозы и инсулина в плазме. Снижение постпрандиальной концентрации инсулина подавляет синтез ХС в печени за счет снижения индуцированной инсулином HMG-CoA редуктазы [50].

Пектиновые полисахариды (пектины) - это гетерополисахариды, составляющие 30-40% сухой массы клеточных стенок высших двудольных и однодольных растений, характеризующиеся чрезвычайно сложной и разнообразной структурой в зависимости от вида растения, типа ткани и его возраста. По их составу можно выделить: гомогалактуронан (HG) или линейный гомополимер галактуроновой кислоты; рамногалактуронан I (RG I) представляет собой гетерополимер со скелетом, состоящим из повторяющихся димеров галактуроновой кислоты и рамнозы, к которым присоединены различные боковые сахарные цепи, в основном арабинаны, галактаны и арабиногалактаны различной длины и степени разветвленности; и рамногалактуронан II (RG II), представляющий собой полигалактуронан с многочисленными боковыми цепями со сложной структурой. Значительно менее распространенными, чем

обсуждавшиеся ранее, являются ксилогалактуронан и апиогалактуронан, которые описаны сравнительно недавно, встречаются лишь в некоторых растительных объектах и не считаются типичными [51]. Указанные пектиновые компоненты могут быть соединены ковалентно, создавая пектиновую сеть в клеточной стенке растений. Структура, сформированная таким образом, может быть дополнительно модифицирована ферментами, обнаруженными в клеточной стенке. Наиболее важные модификации включают метилирование, ацетилирование остатков галактуроновой кислоты [52]. Сложная структура пектинов строго определяет их биологические, физические и химические свойства, которые вызывают большой интерес ученых и становится все более обсуждаема. В настоящее время мировое ежегодное производство пектина оценивается в 45000 тонн, что эквивалентно не менее 400 миллионам евро [53]. В пищевой промышленности, среди прочего, используется пектин в качестве гелеобразующего ингредиента при производстве джемов и желе в качестве загустителя, эмульгатора и стабилизатора. Распространенность пектинов в различных пищевых продуктах делает их важным элементом рациона человека. Их ежедневное общее потребление в качестве фруктового и овощного ингредиента и в качестве пищевой добавки с символом E 440 составляет 4-5 г [54].

Последние годы стало известно, что пероральный прием пектина способствует снижению уровня ХС, ТГ, фосфолипидов и свободных жирных кислот в плазме и тканях и позволяет изменять распределение липопротеинов [55]. Особенно благотворное влияние на профиль ЛПНП в плазме оказывают высокометилованные и высокоамидированные пектины [56-57].

Причины, по которым присутствие пектина в рационе значительно снижает уровень ХС и липидов в крови и тканях, разнообразны. На первом плане стоит способность пектина создавать трехмерную структуру геля в желудочно-кишечном тракте, что аналогично с нейтральными полисахаридами. Это значительно замедляет процессы липолиза и деэтерификации ХС и препятствует его всасыванию [58]. Кроме того, добавление в рацион пектинов, особенно высокометилованных, усиливает выведение ЖК с калом. Вероятно, это связано

с тем, что пектины, главным образом НМП, препятствуют образованию в кишечном просвете мицелл ЖК с жирными кислотами и ХС, ограничивая их реабсорбцию и поглощение других компонентов. Другой причиной ограниченной реабсорбции ЖК может быть снижение их растворимости в присутствии пектинов. Как утверждают Донговски и Лоренц, высвобождаемые в больших количествах в результате ферментации пектинов, короткоцепочечные жирные кислоты сильно закисляют среду нижней части пищеварительной системы [59]. Независимо от того, какая из вышеупомянутых причин (ограничение эмульгирования или осаждение подкислением окружающей среды) оказывает большее влияние на пектиновое ингибирование реабсорбции ЖК, это всегда приводит к увеличению ферментов печени, участвующих в регуляции метаболизма ХС и ЖК, следовательно, редуктаз НМГ-СоА и 7β -гидроксилазы [58]. Это означает, что пектины, способствуя увеличению выведения ЖК вместе с калом, усиливают активность метаболического пути, при котором печеночный ХС превращается в ЖК.

Проведённое комплексное исследование в рамках изучения 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* [60], что наиболее выраженную сорбционную активность по отношению к ЖК 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 гипополипидемической активности в эксперименте *in vivo*.

Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall., сем. Розоцветные – *Rosaceae*) произрастает в виде кустарников или деревьев с колючими веточками в умеренных зонах северного полушария. В настоящее время в медицинской практике Российской Федерации применяются только цветки и плоды боярышника, являющиеся фармакопейным сырьем (ГФ XIV) и рекомендованные в качестве кардиотонического средства [61]. Наиболее изученным сырьем боярышника являются плоды, экстрактивные комплексы которых проявляют в экспериментах кардиотоническое, антиоксидантное, диуретическое и антидепрессантное действие [62-66]. При этом, замена в растительных сборах плодов боярышника на его листья приводила к росту антиоксидантной активности, что связывается авторами с высоким содержанием флавоноидов [67]. Также, показано, что настой листьев боярышника проявляет более высокую антиаритмическую и противофибрилляторную активность по сравнению с фармакопейной настойкой плодов боярышника [68].

Люцерна посевная (*Medicago sativa* L., семейство Бобовые - *Fabaceae*) - многолетнее травянистое растение, традиционно используется как ценная кормовая культура [69]. Люцерна до настоящего времени не включена в раздел лекарственного растительного сырья в Государственной Фармакопее РФ, однако встречается в фармакопеях некоторых стран Западной Европы как понижающее ХС средство, например, во французской фармакопее присутствует статья «Fresh, whole flowering plant *Medicago sativa* L.» (рус. Свежее, цельное растение *Medicago sativa* L.).

Полезные свойства травы люцерны, как кормовой культуры, неоднократно доказаны в ряде научных работ. Так, экстракты люцерны обладают противовоспалительным, антиоксидантным и эстрогеноподобным эффектами [70].

Береза (*Betula pendula* Roth. (*Betula verrucosa* Ehrh.), *Betula pubescens* Ehrh., сем. березовых – *Betulaceae*) - листопадное дерево с белой корой. Фармакопейное сырье (ГФ XIV) - почки, листья, чага. Препараты листьев березы оказывают умеренно выраженное мочегонное, желчегонное и спазмолитическое действие,

обладают антисептическим, противогрибковым, ранозаживляющим, противовоспалительным свойствами [61,71-72]. Основными действующими веществами листьев березы являются фенольные соединения, прежде всего флавоноиды (гиперозид, авикулярин, 3-D-дигалактозид мирицетина и др.) [61,71-73].

Таблица 2 – Характеристика растительных объектов

	Ареал произрастания	Заготовка	Данные о гипополидемической активности
Береза	Ареал охватывает практически всю России (исключением являются Крайний Север и Южные районы). Наиболее распространена и обильна по всей европейской части России её средней полосы, а также в Западной Сибири.	Заготовка производится во время плановой рубки леса, что подразумевает комплексную и безотходную переработку.	Настой листьев березы благоприятно влияет на биохимические показатели крови, а в частности снижает уровень ХС [74]. Листья березы входят в состав биологической добавки «Холестефит» для снижения уровня ХС.
Боярышник	Ареал охватывает СНГ, западную Сибирь и Казахстан. [75]	В отличие от цветков и плодов, заготовка листьев требует меньших трудозатрат и характеризуется более длительным периодом заготовки. [76]	Спиртовой экстракт листьев боярышника проявлял значительные ингибирующие эффекты на всасывание ТГ [77]. Введение порошка плодов и листьев боярышника вызывало снижение уровней глюкозы и ХС, ЛПНП, ЛПВП у пациентов с диабетом 2 типа [78].
Люцерна	Европа, Кавказ, Сибирь, Дальний Восток, Малая и Центральная Азия, Америка. [79]	При достаточном орошении с 1 га можно получить до 150 ц сухого сырья. [80]	Содержание общего ХС, особенно ТГ и неэтерифицированных жирных кислот у кроликов и крыс, получавших в рацион траву люцерны, было ниже по сравнению с

			<p>кроликами, которых не кормили люцерной [81-82].</p> <p>Сок свежей травы люцерны или свежепророщенной люцерны, настоей травы рекомендуют при заболеваниях, связанных с нарушением липидного обмена, и заболеваниями сосудов и сердца [83-84].</p> <p>Разработана биодобавка Антихолестерин (Состав мг/капс.: экстракт люцерны - 350,0, L-карнитин - 50,0.), которая снижает уровень ХС в плазме крови [85].</p>
--	--	--	---

Как показано в таблице 2 все указанные растения имеют значительные сырьевые запасы, обширный ареал произрастания. Полисахариды, выделенные из данных объектов, проявляют *in vitro* выраженную гипополипидемическую активность.

Таким образом, выделение полисахаридных комплексов (ПСК) из листьев боярышника, березы и надземной части люцерны, с последующей очисткой от низкомолекулярных примесей и проведение скринингового исследования гипополипидемической активности *in vivo* с целью выявления перспективного объекта для разработки новой активной фармацевтической субстанции на его основе является актуальной задачей фармацевтической науки.

1.3 Современные методы исследования и стандартизации растительных полисахаридов

Полисахариды – это полимеры, которые синтезируются у растений, животных и микроорганизмов, как правило, состоят из 10 и более моносахаридов, соединенных гликозидными связями, образующих неразветвленные (линейные) или разветвленные цепи [86]. Полисахариды представляют собой класс макромолекулярных соединений, содержащих множество гидроксильных групп. Таким образом, они легко растворяются в воде, особенно при нагревании, из-за образования водородных связей с молекулами воды. В органических растворителях водородные связи с полисахаридом образуются значительно сложнее, поэтому растворимость полисахаридов снижается в присутствии органического растворителя. По этому принципу при добавлении спиртового раствора к водному концентрату полисахаридов они выпадают в осадок [87]. Таким образом метод водной экстракции и осаждения спиртом прост, удобен, относительно дешев и пригоден для промышленного производства фармацевтических субстанций. Наиболее сложным этапом получения ПС является очистка от примесей. Часто перед экстракцией сырья для удаления сапонинов, фенольных и липофильных соединений используют предварительную экстракцию хлороформом, этилацетатом, спиртом этиловым или метиловым и др. агентами (например, с помощью хлороформа – метод Севага), а также ферментативный гидролиз [88-89]. Для очистки ПС, выделенных из растительного сырья, от низкомолекулярных примесей используют диализ, гельфильтрацию и ультрафильтрацию [90-92]. Нередко исследованию одного ПС мешают другие, содержащиеся в образце, для их удаления может быть использован ферментативный гидролиз (использование специфических энзимов, например, амилаза для удаления крахмала), фракционирование (гельфильтрация, ультрафильтрация, ионообменная хроматография, фракционное осаждение органическими растворителями) и др [93-94].

В случае, когда белок не удаляется методами очистки, говорят о ковалентной связи между ПС и белком (подобно животному хондроитину [95]), наличие которой было установлено методом атомно-силовой микроскопии [96]. Поэтому, а также для контроля чистоты получаемых препаратов, существует множество методов количественного определения белка [97]. Для анализа образцов полисахаридов — чаще всего используют методы Лоури [98] и Бредфорда [99] в виду их высокой чувствительности, простоты и изученности [97].

Методы количественного определения ПС

Гравиметрический метод рекомендован ГФ XIV для количественного определения ПС. Данный метод заключается в постадийной экстракции, осаждении этиловым спиртом с последующим взвешиванием полученного осадка [100]. Наиболее значимым недостатком гравиметрического метода является низкая селективность, которая объясняется присутствием примесных веществ в осадке (белки, фенольные соединения и т.д.), при этом необходимо учитывать вероятность неполного осаждения ПС [101]. Помимо этого, метод длителен и трудоемок, так как связан с рутинными процедурами фильтрования, центрифугирования, сушки и доведения до постоянной массы.

Спектрофотометрические методы обычно обеспечивают более точное и быстрое определение содержания ПС в меньших количествах анализируемого материала. Эти методы основаны на измерении светопоглощения комплексов различных веществ с продуктами кислотного гидролиза и окисления ПС при определенной длине волны, так ОФС.1.2.3.0019.15 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом» предлагает 3 варианта методик:

1. Метод, основанный на образовании комплекса антрона с гидроксиметилфурфуролом, образующимся при расщеплении ПС до моносахаридов в присутствии кислоты серной. [102].
2. Метод, основанный на цветной реакции с пикриновой кислотой, протекающей с образованием пикраминовой кислоты в результате восстановления группы NO_2 до NH_2 [103].

3. Метод, основанный на образовании комплекса зеленого цвета орцина с фурфуролом, образующимся при нагревании пентоз (или их фосфорных производных) с кислотами [104].

Методы определения с пикриновой кислотой и с орциновым реактивом не нашли широкого применения в стандартизации ПС, т.к. основаны на определении только восстанавливающих сахаров (с пикриновой кислотой) или только пентоз (с орциновым реактивом). Антронный метод (рисунок 1) напротив, отличается универсальностью и специфичностью в отношении широкого спектра моносахаридов, встречающихся в составе природных ПС, что делает его привлекательным для использования в стандартизации растительных препаратов. К недостаткам метода можно отнести нестабильность реагента (антрон в концентрированной серной кислоте).

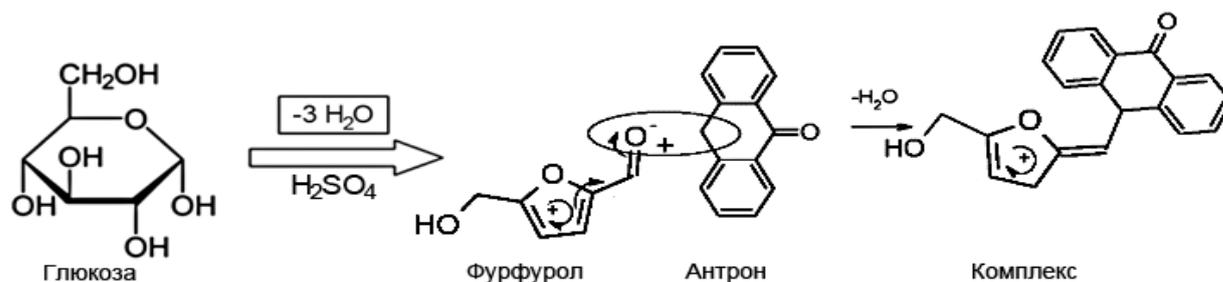


Рисунок 1 – Реакция образования комплекса антрона с продуктом окисления моносахаридов.

Наиболее используемым, однако не включенным в ГФ XIV, является фенол-серный метод и его различные модификации [105-106]. Также необходимо учитывать, что чувствительность к тому или иному реагенту у разных моносахаров отличается, соответственно показатели поглощения хромофорных комплексов, образованных различными сахарами, также могут отличаться, что будет влиять на точность измерений. Так, Saha S.K. и Brewer C.F. предложили использовать различные калибровочные прямые для ПС, образованных разными моносахаридами [107]. Таким образом, при количественном определении ПС необходимо учитывать их состав и чувствительность применяемого реактива.

Необходимо отметить, что данные методы не позволяют селективно количественно определять содержание нейтральных и кислых сахаров. Оценить

содержание уроновых кислот в ПС сложнее, чем их нейтральных аналогов. Это связано с тем, что в кислых гидролитических условиях высвобождение уроновых кислот затруднено из-за относительно более высокой стабильности их гликозидных связей, что приводит к неполному гидролизу [108]. Для избирательного определения уроновых кислот используют следующие хромогены: 3,5-диметилфенол [109] и карбазол [110]. При этом, использование 3,5-диметилфенола позволяет селективно определять содержание галактурановой и глюкуроновой кислот, а влияние нейтральных моносахаридов, присутствующих в исходном ПС, оказывается минимальным, однако комплекс, образующийся с реагентом, наименее устойчив. Реакция карбазола с уроновыми кислотами имеет стабильную интенсивность окраски во времени, но влияние нейтральных сахаров является максимальным среди описанных методов [111]. Небольшое количество сульфаминовой кислоты подавляет образование комплекса карбазола с нейтральными моносахарами без существенной потери чувствительного обнаружения уроновых кислот [112]. Также описано, что тетраборат натрия увеличивает чувствительность к D-глюкуроновой кислоте, значительно увеличивая интенсивность окраски реакционной смеси. Таким образом, при исследовании ПС с высоким содержанием нейтральных моносахаридов для более точного и надежного результата предпочтительнее использовать 3,5-диметилфенол или карбазол с модификаторами.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) также является надежным методом определения содержания уроновых кислот, хотя он требует трудоемкой дериватизации до летучих производных и восстановления карбоксильной группы до спиртового гидроксила. Дериватизация в триметилсилильные производные не требует восстановления кислот, однако эти производные менее стабильны по сравнению с ацетатами [113].

Моносахаридный состав

Начальной стадией структурного анализа полисахарида является изучение его мономерного состава и установление типов связей мономерных звеньев между собой. В химии полисахаридов мономерный анализ принято называть

моносахаридным, он должен прежде всего установить, из каких мономеров построен полисахарид. Для этого необходимо расщепить его до моносахаридов, т.е. разорвать все гликозидные связи. Важнейшая реакция, с помощью которой такой результат может быть достигнут это кислотный гидролиз гликозидных связей. Анализ состава имеет важное значение для контроля качества используемых в медицине полисахаридов [114].

Существует несколько методов высвобождения моносахаридов из полисахаридов, которые включают метанолиз, ферментативный гидролиз и кислотный гидролиз. Willför et al. сравнили эти методы в межлабораторном исследовании и показали, что наибольший выход нейтральных моносахаридов наблюдался при использовании кислотного гидролиза, в то время как метанолиз предотвращал деградацию кислых моносахаридов [115]. Ферментативный гидролиз является альтернативой в тех случаях, когда моносахариды легко разлагаются, такие как сиаловые кислоты [116]. Процедуру кислотного гидролиза проводят с использованием соляной, серной или трифторуксусной (ТФУ) кислот при повышенных температурах [117-119]. Серную кислоту (H_2SO_4) используют реже, например, чтобы разорвать сильные β -1,4-гликозидные связи целлюлозы [120]. В последнее время гидролиз ТФУ является наиболее часто применимым методом выделения моносахаридов, благодаря своей эффективности при разрыве гликозидных связей, не вызывая разрушения образующихся моносахаридов, и благодаря своей летучести, что сводит к минимуму ее влияние на последующие процедуры [121]. Однако степень гидролиза зависит не только от применяемых кислот, но и от условий гидролиза (температура, время, количество уроновых кислот). В последнее время в качестве инструмента для сокращения времени процесса стали применять микроволновое излучение [122]. Таким образом, необходимо исследовать условия, обеспечивающие полный гидролиз, для анализа моносахаридного состава полисахаридов с различными структурными характеристиками, при этом кинетику гидролиза как правило оценивают простыми и доступными методами, такими как тонкослойная или бумажная хроматография [123].

Принимая во внимание свойства моносахаридов, ПС затруднительно анализировать хроматографическими методами из-за их низкой летучести, отсутствия хромофорных групп или очень схожей полярности. Таким образом, для анализа с помощью ГХ, моносахариды должны быть дериватизированы, чтобы увеличить их летучесть. Кроме этого, в процессе дериватизации можно улучшить параметры ионизации, что важно в случае использования в качестве детектора масс-спектрометр. Для ГХ существует три основных типа реакций получения дериватов моносахаридов: силилирование, ацилирование и метилирование [124-126]. Метилирование – наименее часто используемый метод, ввиду нестабильности дериватов, сложности, трудоемкости и времязатратности процедуры пробоподготовки. Силильные производные также нестабильны и на хроматограмме каждому моносахариду соответствует несколько пиков в связи со стереоизомерией, что приводит к внесению погрешности, обусловленной дополнительными расчетами. Метод ацетилирования лишен вышеуказанных недостатков, в связи с чем последние десятилетия наиболее часто применяется при исследовании моносахаридного состава ПС.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – более универсальный инструмент, обладающий большей гибкостью благодаря различным механизмам разделения и детекторам, которые можно использовать. Кроме того, метод ВЭЖХ один из часто встречающихся в государственной фармакопее РФ для установления подлинности, примесей и количественного определения. Наиболее распространенный в аналитической и фармацевтической практике ультрафиолетовый детектор применим, однако имеет низкую чувствительность к молекулам сахаров [127]. По этой причине углеводы часто дериватизируются группой, поглощающей ультрафиолет, например, этиловым эфиром п-аминобензойной кислоты [128]. Жидкостная хроматография позволяет упростить анализ, разделяя немеченые моносахариды, для этого было предложено множество хроматографических методов, включая лигандообменную хроматографию, графитированные углеродные колонки и жидкостную хроматографию с гидрофильным взаимодействием [129-131]. Также

высокоэффективная анионообменная хроматография нашла применение в анализе углеводов [132], ввиду наличия гидроксильных групп у моносахаридов, благодаря которым они проявляют слабые кислотные свойства и могут быть ионизированы в сильнощелочных условиях ($\text{pH} > 12$). Таким образом, они могут быть разделены с помощью анионообменной хроматографии (неподвижная фаза – четвертичные аммониевые смолы). После разделения недериватизированных сахаров необходимо применение специфических детекторов, таких как импульсный амперометрический детектор (наиболее чувствительный, позволяет определять следовые количества сахаров до пикомолей), дифференциальный рефрактометр, детектор испарительного рассеяния света (ELSD-детектор), детектор заряженных аэрозолей и масс-спектрометр [133-137].

Капиллярный электрофорез, так же используемый для анализа моносахаридного состава ПС, как и большинство хроматографических методов требует дериватизации сахаров, например, 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном, для увеличения чувствительности и лучшего разделения [138]. Методы детектирования - амперометрия, УФ-спектрометрия [139-140]. Капиллярный электрофорез является мощным методом разделения, который обеспечивает высокое разрешение, высокую эффективность, хорошую селективность и короткое время анализа, однако его сложно назвать стандартным инструментом анализа ПС в фармацевтике, в отличие от более доступных хроматографических и спектральных методов. Особенности ввода пробы приводят к ухудшению воспроизводимости по сравнению с методом ВЭЖХ, а время удерживания значительно зависит от состояния внутренней поверхности капилляра и, соответственно, подвержено постоянному изменению, особенно при анализе образцов, состоящих из множества компонентов схожих по структуре. Таким образом, для стандартизации препаратов на основе ПС метод капиллярного электрофореза не нашел широкого применения.

Молекулярная масса

При стандартизации высокомолекулярных соединений одной из важнейших характеристик является молекулярная масса, которая с одной стороны говорит о подлинности, с другой - о чистоте исследуемого препарата.

Известно, что гипополидемическое действие полисахаридов зависит от их молекулярной массы [141], ввиду чего ее определение является одной из основополагающих характеристик для стандартизации субстанции полисахаридной природы.

Вискозиметрический метод, основанный на способности макромолекул повышать вязкость раствора тем больше, чем выше молекулярная масса растворенного вещества – наиболее доступный метод в широкой области значений молекулярных масс [142]. Для расчетов необходимо предварительное определение констант **K** и **a** [143]. Постоянная **K** зависит от температуры и природы полимера и растворителя. Показатель **a** связан с конформацией макромолекулы в растворе.

$$\eta = KM^a$$

Таким образом, к недостаткам метода можно отнести неточность, связанную с внешними факторами (температура) и используемым растворителем.

Другим методом, широко используемым для растительных ПС, является эксклюзионная хроматография (ЭХ). ЭХ основана на проникновении веществ через смолы с определенным размером пор и структурой [144]. Для получения удовлетворительных результатов необходимо тщательно подобрать условия анализа: подходящий элюент, скорость потока, температуру, длину колонки, размер пор носителя. Помимо этого, важно выбрать стандарты, подходящие для исследуемых молекул, так как разделение по методу ЭХ основано не на значении молекулярной массы, а на действительном размере разделяемых молекул.

В качестве стандартов используют декстраны для линейных ПС, пуллуланы – для разветвленных [145-147]. Однако проблема с разветвленными ПС заключается в том, что стандарты должны быть с той же химической структурой и степенью разветвленности, что и у образца, который анализируется, в

противном случае полученная молекулярная масса будет являться относительной. Последние усовершенствования метода связаны с комбинацией ЭХ с вискозиметрическим детектором [148]. Однако наибольшее распространение для целей анализа ПС получил рефрактометрический детектор. Таким образом, метод ЭХ, предложенный ГФ XIV для определения молекулярной массы и молекулярно-массового распределения биополимеров, в фармацевтическом анализе может служить одной из мер стандартизации препаратов растительных ПС.

Порядок связей

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) становится критически важным для точной характеристики ПС. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса является одним из самых мощных аналитических инструментов для выяснения структуры углеводов, с помощью которой можно определить структуру ПС, и в то же время самым сложным. Поскольку ПС представляют собой полимеры, они имеют большое количество ядер и демонстрируют значительно больше резонансов, чем маленькие органические молекулы. Это делает их спектры ЯМР очень трудными для интерпретации. Только в 70-х годах с развитием двумерной (2D) ЯМР-спектроскопии можно было всерьез заняться макромолекулярным ЯМР [149-150]. В 2D-спектроскопии резонансы ЯМР разделены не по одной частоте или оси химического сдвига, а по двум частотам (или химическому сдвигу). В частности, 2D ЯМР-спектроскопия позволяет проявить скрытые резонансы и четко идентифицировать гораздо больше пиков. Результатом двумерного спектра является не серия пиков (как видно из 1D ЯМР), а совокупность пятен, каждое из которых соответствует атому или взаимодействию между атомами. 2D ЯМР-спектроскопия может быть легко распространена на три или даже четыре измерения [149] ЯМР-спектроскопия может использоваться для определения типа, количества и пропорций различных остатков моносахаридов, а также конфигурации и положения связи в полимере [150-152].

Поскольку полисахарид часто имеет высокую молекулярную массу, сигналы на ЯМР-спектре могут быть уширенными, а высокое содержание урновых кислот и вовсе перекроет значительную часть сигналов нейтральных моносахаридов. При установлении строения ПС широко используют метод частичной деструкции молекулы, позволяющий получать более узкие сигналы. Связи, образованные нейтральными моносахаридами, чаще всего разрывают путем частичного гидролиза ТФУ. При анализе структуры пектиновых полисахаридов, богатых урновыми кислотами, образующими более прочную связь, используют ферментативный гидролиз [153].

Таким образом, применение метода ЯМР-спектроскопии имеет ряд преимуществ, таких как избирательность и высокая чувствительность, простота подготовки пробы и проведения анализа, кроме того, данный метод анализа является неразрушающим. Главным недостатком метода является сложность интерпретации спектров ЯМР полисахаридов, которая требует хорошей базы данных эталонных спектров и надлежащего использования методов ЯМР.

Значительно более трудоемким и времязатратным является метод метилирования. Существует ряд методов получения метилированных производных для анализа методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, но большинство из них следуют тем же базовым процедурам, которые приведены на рисунке 2.

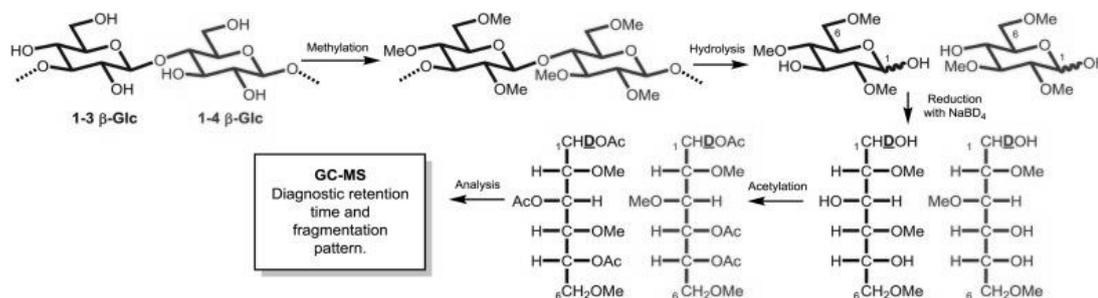


Рисунок 2 – Химизм метилирования полисахаридов

Обеспечение полного метилирования полисахарида перед переходом к последующим этапам имеет важное значение для получения надежных результатов. Чаще всего, полноту метилирования определяют методом ИК-спектроскопии, отслеживанием исчезновения полосы в области -ОН (3000–

3500 см⁻¹) спектра [154]. При этом как и в случае ЯМР-анализа, избыточное содержание уроновых кислот в образце препятствует метилированию, в связи с чем необходимо уменьшить содержание кислых моносахаридов до эквивалентного нейтральным сахарам [155].

В идеале, должны быть синтезированы аутентичные эталонные стандарты для каждого производного, чтобы обеспечить качественное обнаружение и количественную оценку с использованием коэффициентов отклика, полученных из калибровочных кривых [156]. Для идентификации чаще всего пользуются опубликованными спектрами или онлайн-ресурсами. Однако, поскольку на полученные данные влияют настройки масс-спектрометра и используемого напряжения ионизации, рекомендуется сравнивать экспериментальные данные, выполненные на том же оборудовании, в тех же условиях, что и образцы.

Таким образом, анализ данных литературы о методах исследования ПС выявил, с одной стороны, их многообразие, обусловленное сложностью исследуемых объектов, а с другой – отсутствие унифицированных методик стандартизации препаратов, на основе ПС. Из чего следует, что актуальной задачей является разработка индивидуальных подходов к стандартизации, которые бы учитывали особенности химической структуры определяемого вещества.

Глава 2 Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили полисахариды (ПС), выделенные из сырья 3-х видов растений, которые по данным предварительного эксперимента *in vitro*, обладают выраженными гиполипидемическими свойствами и применяются в народной медицине для снижения уровня холестерина.

1. Листья березы (береза повислая (береза бородавчатая) – *Betula pendula* Roth. (*Betula verrucosa* Ehrh.) и береза пушистая – *Betula pubescens* Ehrh., сем. березовых – *Betulaceae*) заготовлены в июне 2016-2018 гг. в окрестностях с. Мельниково Томской области.

2. Листья боярышника кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall., сем. Розоцветные – *Rosaceae*) заготовлены в июле 2016-2018 гг. в окрестностях с. Александровское Томской области.

3. Надземная часть люцерны посевной (*Medicago sativa* L., сем. Бобовые – *Fabaceae*) собрана в июле 2016-2018 гг. в окрестностях д. Воронино Томского района.

После сбора сырье сушили на воздухе, под навесом, при температуре 15-25 °С, в течение 3-10 суток.

Исследуемые образцы упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации (ГОСТ 17768-90 и ГФ XIV, ОФС.1.1.0011.15 Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение полисахаридных комплексов из растительного сырья

Выделение полисахаридных комплексов (ПСК) из растительного сырья проводили по общепринятому методу [157]. Навеску сырья (10,0 г) заливали 200 мл воды очищенной и 0,5 мл кислоты хлороводородной концентрированной (рН=4,0), нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов при периодическом перемешивании. Далее оставляли для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывали через многослойный тканевый фильтр. Фильтрат упаривали под вакуумом при температуре не более 45 °С до 50 мл. Сгущенный раствор приливали к 150 мл спирта этилового (об. 95%) и оставляли на 12 часов при 4 °С. Отстоявшийся раствор центрифугировали (10 минут 4400 об/мин), промывая 95%-ным спиртом этиловым. Затем осадок растворяли в 100 мл воды очищенной при быстром перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем полученный раствор вновь центрифугировали (20 минут 4400 об/мин) и упаривали до 30 мл. Полученный раствор диализировали с использованием полупроницаемой мембраны Thermo Scientific SnakeSkin с размером пор 3,5 кДа в течение 48 часов против воды очищенной при комнатной температуре, заменяя воду на свежую каждые 12 часов [158]. После диализа раствор замораживали и высушивали на лиофилизаторе IShin BioBase MCFD8508. Схема выделения ПСК из лекарственного растительного сырья изображена на рисунке 3.

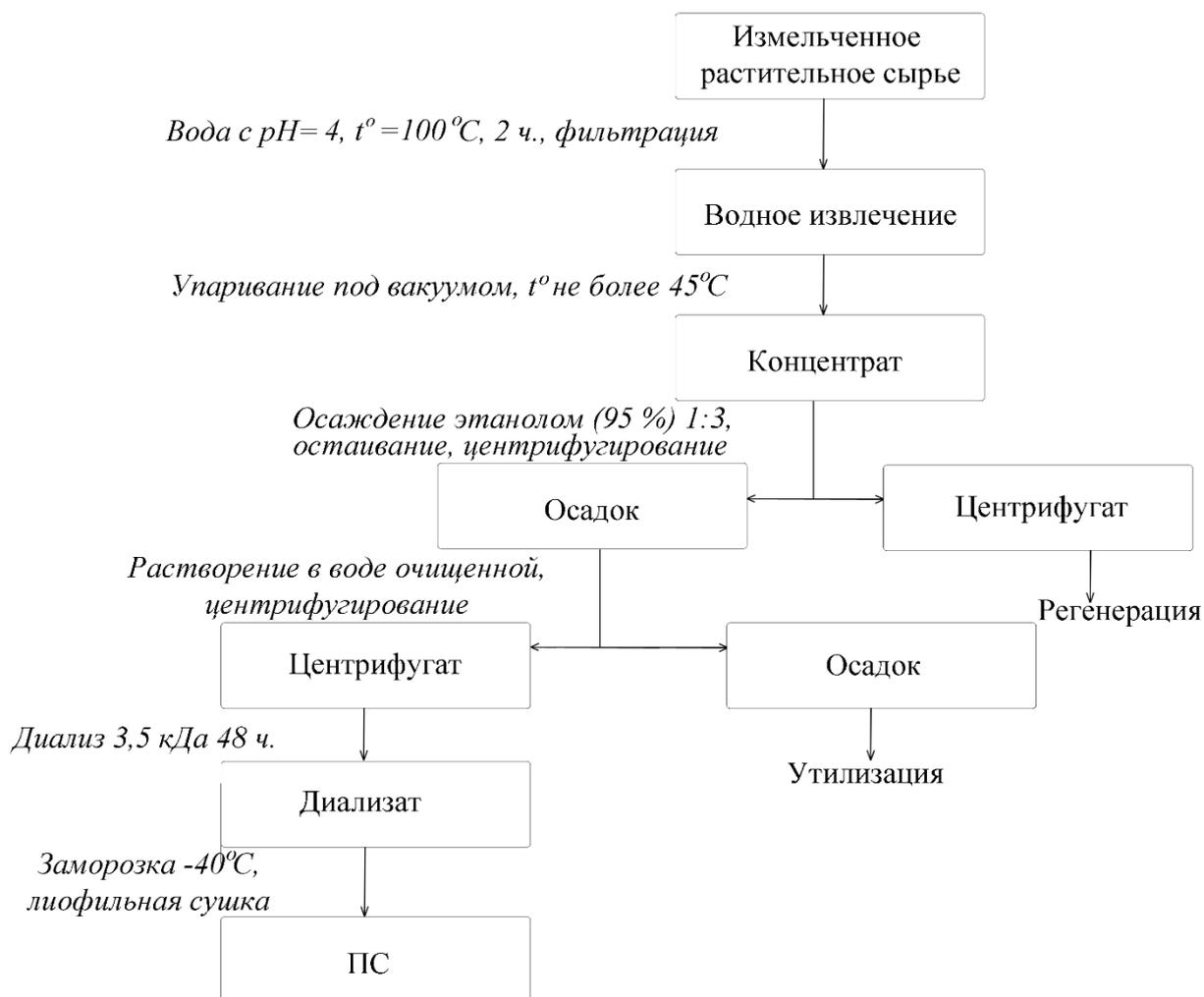


Рисунок 3 – Схема выделения ПСК из растительного сырья

2.2.2 Методы химического исследования

Общие аналитические методики

Общее содержание углеводов в ПСК изучаемых растений определяли спектрофотометрическим фенол-серным методом [105]. Для количественного определения белковых примесей использовали метод Лоури [98], количество белка в растворах образцов рассчитывали по градуировочному графику, построенному для бычьего сывороточного альбумина (БСА, Biosera, Франция). Примеси нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрическим методом [159]. Содержание нуклеиновых кислот (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19} \times 10,3 \times 6$$

Где, A_{270} и A_{290} – значения оптической плотности, измеренные при соответствующих длинах волн.

Содержание уроновых кислот определяли по реакции ПС с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной H_2SO_4 с использованием градуировочного графика для D-галактуроновой кислоты («Sigma Aldrich», США). Поглощение измеряли на двух длинах волн - 400 и 450 нм [160]. Измерения оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (United products & instruments, США).

Моносахаридный состав определяли после гидролиза полисахаридов, для этого к навеске (3–5 мг) полисахарида добавляли 2М раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) (1 мл), содержащую мио-инозитол (0,5 мг/мл) в качестве внутреннего стандарта. Смесь инкубировали в течение 5 ч при 100 °С. Избыток кислоты удаляли упариванием гидролизата до отсутствия запаха кислоты. Смесь моносахаридов восстанавливали добавлением натрия боргидрида (5 мг) в аммиачной среде. Полученные полиолы упаривали с добавлением метанола до образования сухого остатка. Далее получали ацетаты полиолов и идентифицировали их методом ГЖХ на хроматографе Varian 450-GC (Varian, США), оборудованном пламенно-ионизационным детектором. ГЖХ проводили на капиллярной колонке VF-5 MS (Varian, США; 0,25 мм, 30 м) с использованием градиентного программирования температуры: 175 °С (1 мин) до 250 °С (2 мин), со скоростью 3 °С/мин. Аналогичные процедуры проводили со стандартами моносахаридов: глюкоза, рамноза, галактоза, арабиноза, ксилоза, манноза («Sigma Aldrich», США).

Молекулярную массу образцов полисахарида (3 мг/мл) определяли с помощью ВЭЖХ на аналитическом хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США), оснащенного рефрактометрическим детектором Shodex RID 101 (Dionex, Япония). Колонка TSKgel GMPW 7,5 мм×30 см. Термостатирование 30 °С со скоростью потока 1 мл/мин. Колонку уравнивали 0,1 М раствором

хлорида натрия, и элюирование проводили тем же раствором. Молекулярную массу полисахаридов определяли по времени удерживания, в соответствии с градуировочными значениями, определенными по стандартным образцам пуллуланов с молекулярной массой (M_w) 342-708000 Да («Polymer Standards Service GmbH», Германия).

Методы структурно-химической характеристики

Определение состава уроновых кислот проводили методом нисходящей бумажной хроматографии. Для этого 5 мг ПС помещали в ампулу, добавляли 1 мл 2 М ТФУ и термостатировали в сухожаровом шкафу в течение 5 часов. Гидролизат наносили на бумагу «Filtrak FN8» и хроматографировали нисходящим методом в системе н-бутанол-пиридин-вода (6:4:3) в сравнении с известными стандартами D-глюкуроновой и D-галактуриновой кислот («Sigma Aldrich», США). Проявляли хроматограммы анилинфталатным реактивом, затем активировали при температуре 100-110 °С в сушильном шкафу в течение 5 минут.

Для фракционирования образец полисахаридов (ПСfВ) (98,3 мг) растворяли в 0,01 М растворе NaCl и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой марки DEAE 52 (Servacel, США) форма OH⁻, 40×3 см. В качестве подвижной фазы использовали растворы NaCl в режиме градиентного элюирования с увеличением концентрации 0,01; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 моль/л, скорость потока подвижной фазы составлял 1,0 мл/мин [161]. Фракции собирали с 10-минутными интервалами с использованием системы низкого давления Pharmacia Biotech (Швеция) с коллектором фракций F-RAC-100, насосом P-50, Uvicord SII, Recorder REC 101. Фракции собирали и анализировали по методике Смита [105], а фракции, соответствующие отдельным пикам на кривой элюирования, объединяли, концентрировали упариванием на роторном испарителе, диализировали через полупроницаемые мембраны с размером пор 3,5 кДа для удаления NaCl и лиофилизировали.

Ферментативный гидролиз проводили растворением 50 мг ПСfВ-3 в воде (5 мл) для получения 1 %-ного раствора и добавляли пектиназу (5 мг) (Sigma, активность 690 единиц/г). Полученную смесь оставляли на магнитной мешалке

при комнатной температуре. Процесс гидролиза каждый час контролировали с помощью реакции Нельсона-Самоджи для оценки содержания восстанавливающих сахаров [162]. Концентрация восстанавливающих сахаров возрастала в течение 4 часов, после чего вышла на плато (рисунок 4).

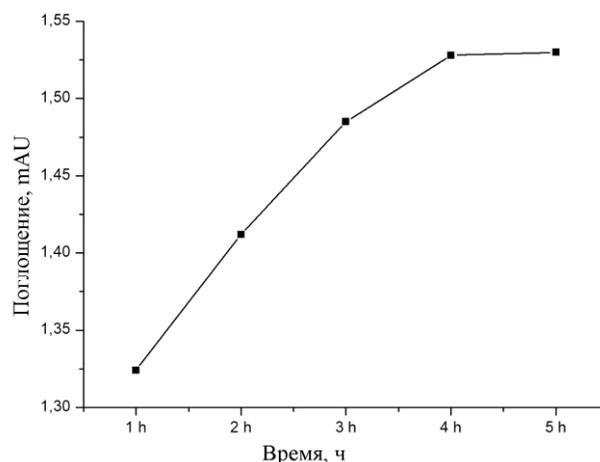


Рисунок 4 – Кинетическая кривая ферментативного гидролиза

По окончании гидролиза пектиназу инактивировали нагреванием при 100 °С в течение 5 минут и осадок удаляли центрифугированием. Полученный раствор концентрировали и добавляли три объема 96% этанола для получения осадка нерастворимого полисахарида. Полученный полисахарид отделяли центрифугированием, растворяли в очищенной воде и лиофилизировали с получением фрагментов ПСfВ. Супернатант затем концентрировали и использовали бумажную хроматографию, чтобы продемонстрировать присутствие галактуроновой кислоты.

Далее для выделения гомогенных фрагментов ПСfВ остаток после ферментативного гидролиза фракционировали на колонке, заполненной сефакрилом S-300 (GE, Дания). ПСfВ-3Е (33 мг) растворяли в воде (3 мл) и раствор хроматографировали на колонке 1,5×85 см, элюент – очищенная вода, скорость элюирования 0,3 мл/мин. Фракции, соответствующие отдельным пикам на кривой элюирования, объединяли, концентрировали и лиофилизировали с получением двух фракций полисахаридов: основная из них, как ПСfВ-3Е2

26,96 мг, K_{av} 0,21 и минорная высокомолекулярная фракция ПСfВ-3Е1 выход 3,2 мг, K_{av} 0. Коэффициент K_{av} рассчитывали по следующей формуле:

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}$$

где:

V_R – удерживаемый объем;

V_0 – свободный объем колонки вне гранул сорбента, определяется по объему элюирования «голубого декстрана» с молярной массой 2106 Да;

V_t – объем пустой колонки.

Количество метоксигрупп определяли, как описано ранее [163], используя градуировочный график для метанола. Спектрофотометрирование проводили при длине волны 412 нм. Степень этерификации рассчитывали как отношение содержания метоксильных групп к содержанию галактуроновой кислоты.

Для анализа фракционированный образец остатка ферментаивного гидролиза ПСfВ-3Е2 растворяли в дейтерированной воде (99,9% атомов D, Sigma-Aldrich) и лиофильно высушивали. Процедуру повторяли дважды для удаления остатков воды. Затем растворяли в 500 мкл D₂O с 0,5 мкл ацетона (99,96 % атомов D, Sigma Aldrich) в качестве эталона для калибровки химического сдвига (dH 2,225 м.д., dC 31,45 м.д.). Все гомо- и гетероядерные ЯМР-эксперименты образцов проводились на спектрометре Bruker DRX Avance II 600 МГц (Германия) при температуре зонда, обеспечивающей минимальное перекрытие сигнала дейтерированной воды с сигналами полимера (313 К). ЯМР спектры получены с использованием стандартного программного обеспечения Bruker.

2.2.3 Методы исследования гипополипидемической активности

Эксперимент выполнен на 48 крысах самках массой 200–240 г линии Wistar первой конвенциональной категории, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей ФГБНУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга» (г. Томск). Животных содержали в условиях

свободного доступа к воде и пище (температура воздуха вивария – $20 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность воздуха – не более 80%). Для моделирования у крыс хронической гиперлипидемии готовили специальный корм, гарантирующий 45 % энергии за счет животного жира (2,5% холестерина; 0,5% холевой кислоты; 0,1% 2-тиоурацила), следующим образом: 2,5 г ХС (Sigma-Aldrich, США); 0,5 г холевой кислоты (Sigma-Aldrich, США) и 0,1 г 2-тиоурацила (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 16 г топленого масла в стакане при нагревании и соединяли с 81 г стандартного корма. Включение холевой кислоты в диету необходимо для стимулирования эмульгации липидов в кишечнике, что благоприятно сказывается на усвоении потребляемого жира и влияет на транскрипцию генов, регулирующих процесс метаболизма липопротеинов [164]. Калорийность полученного корма составляла 503 ккал на 100 г.

Экспериментальные крысы получали атерогенную диету в течение 28 суток. На 29-42 сутки эксперимента крысы соответствующих групп вводили перорально ПС березы, боярышника или люцерны в дозировке 200 мг/кг в виде раствора 0,5 % крахмальной слизи. Референс-препарат симвастатин (Sigma-Aldrich, США) вводили животным в дозе 10 мг/кг. Крысы контрольной группы получали стандартный лабораторный корм и эквивалентные количества 0,5 % раствора крахмальной слизи.

На 15 сутки после начала перорального введения ПС или симвастатина, после голодания в течение 12 ч крыс декапитировали после CO_2 -асфиксии. В сыворотке крови определяли уровень общего ХС, ЛПНП и ЛПВП.

Содержание общего ХС измеряли с помощью ферментативного набора «Cholesterol» (Chronolab, Испания) согласно протоколу, прилагаемого к набору. Определение концентрации ХС основано на сопряженных реакциях, в которых ХС из состава эфиров высвобождается под влиянием холестеринэстеразы. Далее при участии холестериноксидазы ХС окисляется. Образующаяся H_2O_2 совместно с пероксидазой формирует окислительное азосочетание 4-аминоантипирина и

фенола с образованием красителя. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию ХС в сыворотке крови и определяется спектрофотометрически при длине волны 505 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия).

Количество ЛПВП в сыворотке крови регистрировали прямым методом с использованием ферментативных наборов «HDLCholesterol Direct» (Chronolab, Испания). Метод основан на селективной солюбилизации ЛПВП детергентом. ЛПВП вступает в последующие реакции, катализируемые холестеринэстеразой, холестериноксидазой и хромогеном, с образованием хинониминового красителя (другие фракции липопротеинов удаляются детергентом). Интенсивность окраски пропорциональна концентрации ЛПВП и определяется спектрофотометрически при длине волны 585 нм.

Содержание ЛПНП в сыворотке крови оценивали прямым спектрофотометрическим методом с использованием ферментативного набора «LDLCholesterol Direct» (Chronolab, Испания). Анализ выполняли в 2 этапа: сначала удаляли липопротеины, кроме ЛПНП, затем определяли концентрацию ЛПНП. Эфиры ХС метаболизируются ферментом холестеринэстеразой с образованием ЛПВП и ЖК. ЛПВП окисляется холестериноксидазой, в результате чего образуются 4-холестенон и H_2O_2 . H_2O_2 взаимодействует с N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3,5-диметоксиаланином и 4-аминоантипирином [84]. В последней реакции образуется хинониминный краситель, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации ЛПНП и определяется при длине волны 555 нм.

Индекс атерогенности (ИА) отражает отношение содержания ХС в атерогенных липопротеинах к антиатерогенным. Он используется для совокупной характеристики спектра липидов в плазме крови и оценке риска развития атеросклероза. На основе полученных экспериментальных данных вычисляли ИА по формуле [165]:

$$\text{ИА} = \frac{(\text{общий ХС} - \text{ЛПВП})}{\text{ЛПВП}}$$

где ИА – индекс атерогенности; общий ХС – общий холестерол; ЛПВП - холестерол в липопротеинах высокой плотности; ЛПНП - холестерол в липопротеинах низкой плотности.

2.3 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ «StatSoft Statistica v 6.0». Для всех выборок проверена гипотеза нормальности распределения по величине коэффициента асимметрии и коэффициента эксцесса. Для количественных показателей вычисляли среднее значение (\bar{X}) и стандартную ошибку среднего (m). Для качественных признаков определяли частоту (%). Достоверность различий между показателями оценивали с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Проверка гипотезы о равенстве средних проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Даннета. Допустимым уровнем значимости считали $p < 0,05$ [166].

Глава 3. Общая характеристика полисахаридных комплексов листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной и выбор перспективного объекта исследований

3.1 Выделение и химическая характеристика полисахаридных комплексов

Первой задачей нашего исследования являлось выделение ПСК из листьев березы и боярышника кроваво-красного, надземной части люцерны посевной, характеристика их химического состава, сравнительное исследование гипополидемической активности и выбор объекта для дальнейших исследований.

Выделение ПСК для скрининга проводили по классической для полисахаридов из растительного сырья схеме. Полученные ПСК представляли собой легкие, воздушные порошки от бледно-желтого до бежевого цвета. Для всех изучаемых ПСК определено содержание общих углеводов и урановых кислот, примесных веществ, таких как белок и нуклеиновые кислоты. Хроматографическими методами определены моносахаридный состав и молекулярные массы. Характеристика ПСК представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристики ПСК изучаемого сырья

	ПСК боярышник	ПСК береза	ПСК люцерна
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
Урановые 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
Mw, кДа	413,7±19,9	310,2±15,1	366,8±14,9

Для всех ПСК характерно высокое содержание компонентов углеводной природы, а также невысокое содержание примесей белка и нуклеиновых кислот,

что говорит об эффективности выбранного подхода для выделения и очистки ПСК из растительного сырья. Все ПС в своем составе содержат уроновые кислоты (от 19,1 до 55,9 %), при этом высоким содержанием отличается образец, полученный из листьев берёзы. Различается и состав нейтральных моносахаридов, так, мажорным моносахаридом ПС листьев боярышника является галактоза, содержание которой в других полученных образцах значительно ниже – в 4 раза меньше. В составе ПС, выделенных из листьев берёзы, преобладает наряду с уроновыми кислотами рамноза, отсутствие которой показано в ПС боярышника и люцерны. А в составе ПС люцерны преобладает арабиноза. Наименьшей молекулярной массой характеризовался образец ПСК берёзы. Для сравнения профиля гетерогенности нами рассчитан коэффициент полидисперсности $K = \frac{M_w}{M_n}$ для каждого образца ПСК. Наиболее гомогенный образец ПСК выделен из надземной части люцерны посевной ($K=9,8$). ПСК листьев берёзы напротив характеризовались наибольшей гетерогенностью ($K=20,6$). K для ПСК, выделенных из листьев боярышника, составил 14,2.

3.2 Сравнительное исследование гипополипидемической активности полисахаридных комплексов и выбор перспективного объекта

Для изучения гипополипидемической активности новых веществ широко используют способ моделирования гиперлипидемии с помощью длительного (5-6 недель) кормления экспериментальных животных высокожировой диетой, богатой холестерином [167].

Для оценки гипополипидемических свойств ПСК изучаемых растений нами проведено исследование их влияния на уровень общего ХС, ЛПНП и ЛПВП в сыворотке крови крыс при экспериментальной хронической гиперлипидемии, вызванной атерогенной диетой [168]. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние ПСК березы, боярышника, люцерны и симвастатина на уровень общего ХС, ЛПНП и ЛПВП в сыворотке крови крыс на фоне атерогенной диеты

Экспериментальные группы	Общий ХС, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ЛПВП, ммоль/л
Стандартная лабораторная диета	1,54±0,07	0,25±0,02	0,72±0,07
Атерогенная диета	7,77±0,38*	1,23±0,15*	1,91±0,28*
Атерогенная диета + ПСК березы	4,69±0,49*	0,60±0,05*	1,55±0,24
Атерогенная диета + ПСК боярышника	5,65±0,55*	0,89±0,09*	1,70±0,21
Атерогенная диета + ПСК люцерны	6,84±0,59	1,08±0,11	1,75±0,31
Атерогенная диета + симвастатин	4,18±0,36*	0,45±0,05*	1,52±0,15

Примечание: * – $p < 0,05$ для атерогенной диеты по сравнению с стандартной диетой, для полисахаридов и симвастатина по сравнению с атерогенной диетой; n – количество животных в группе

В сыворотке крови животных, получавших в течение 6 недель атерогенную диету, увеличивалось содержание общего ХС в 5 раз преимущественно за счет увеличения ЛПНП, при этом уровень ЛПВП в сыворотке крови возрастал в 2,6 раза (таблица 4). Рассчитанный по формуле ИА на фоне вызванной атерогенной диетой гиперлипидемии составлял $3,06 \pm 0,35$, что существенно превосходило его значение у животных, получавших стандартный корм ($1,13 \pm 0,15$) (рисунок 5).

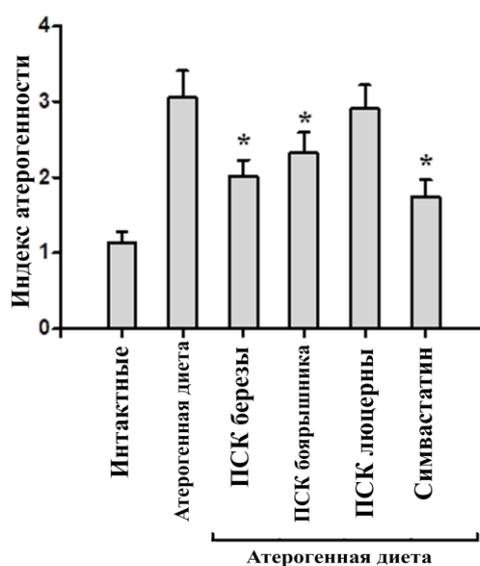


Рисунок 5 – Влияние курсового применения ПСК березы, боярышника, люцерны и симвастатина на индекс атерогенности

Препарат сравнения симвастатин снижал повышенный на фоне атерогенной диеты уровень ХС в сыворотке на 46,2 %, что обусловлено, главным образом, ингибированием ГМГ-КоА редуктазы, а также способностью статинов повышать его экскрецию с фекалиями [169]. Симвастатин существенно уменьшал (63,4 %) повышенный на фоне атерогенной диеты уровень ЛПНП, при этом достоверно не изменял уровень ЛПВП.

Введение ПСК березы приводило к снижению уровня общего ХС на 39,6 % ($p < 0,05$) и, в большей степени, в проатерогенной фракции ЛПНП (50,4 %). Концентрация ХС в антиатерогенной фракции ЛПВП снижалась в меньшей степени, при этом ИА значительно уменьшался и составлял $2,02 \pm 0,21$. ПСК боярышника оказывали менее выраженное гиполипидемическое действие. При их применении ИА составлял $2,32 \pm 0,28$. ПСК люцерны практически не оказывали гиполипидемического действия на фоне атерогенной диеты.

Таким образом, при изучении гиполипидемического действия исследуемых ПСК было установлено, что ПСК листьев березы в дозе 200 мг/кг обладает выраженной активностью, значительно превышающей подобные показатели у ПС надземной части люцерны и листьев боярышника, и сопоставимой активностью с референтным препаратом симвастатином. Соответственно, в качестве непосредственного объекта для дальнейших исследований нами был выбран ПСК листьев березы.

Выводы к главе 3

1. Выбранная методика выделения ПСК позволяет получать высокий выход полисахаридов с минимальным содержанием примесей.
2. Все исследуемые ПСК отличаются по компонентному составу, количеству уроновых кислот, нейтральных моносахаридов и примесей (белок, нуклеиновые кислоты). Высоким содержанием галактозы ($38,88 \pm 2,0$ %) характеризуются ПС боярышника, арабинозы ($48,31 \pm 3,86$ %) – ПС люцерны. В ПС березы определено наибольшее содержание уроновых кислот ($55,94 \pm 3,4$ %). Менее значительно различие по их молекулярным массам, при этом ПСК березы характеризуются наибольшей степенью полидисперсности ($K=20,6$).
3. Установлено, что ПСК листьев березы, ПСК листьев боярышника, ПСК надземной части люцерны посевной влияют в разной степени на уровень ХС, ЛПНП и ЛПВП *in vivo*. ПСК листьев березы в дозе 1,5 г /100 г атерогенного корма обладает выраженной активностью, значительно превышающей аналогичные показатели у ПСК надземной части люцерны и листьев боярышника, и сопоставимой активностью с симвастатином.
4. Перспективным объектом исследования для разработки средства коррекции нарушений липидного обмена по результатам проведенных нами исследований является полисахаридный комплекс листьев березы ввиду его высокой гиполипидемической активности.

Глава 4. Выделение и исследование химической структуры полисахаридов листьев березы

4.1 Определение влияния параметров выделения на выход и характеристики полисахаридов листьев березы

Ввиду сложности строения природных полисахаридов не существует универсальных методик их выделения из растительного сырья, поэтому является актуальной задачей разработка методики, позволяющей выделить ПС с высоким выходом при сохранении структуры. Для определения влияния параметров на выход и показатели качества конечного продукта провели ряд экспериментов, в каждом из которых изменяли только один параметр [170]. В качестве критериев оценки влияния исследуемых параметров использовали:

1. Выход (% от количества исходного растительного сырья) – экономический показатель, обуславливающий рациональность технологического подхода и конечную себестоимость готового продукта. Определяли гравиметрически в пересчете на воздушно-сухое сырье в процентах (X) и вычисляли по формуле:

$$X(\%) = \frac{m_{\text{ПСfВ}} \times 100}{m_{\text{нав}} \times (100 - W)} \times 100$$

где $m_{\text{ПСfВ}}$ – масса высушенных полисахаридов листьев березы, г;

$m_{\text{нав}}$ – масса навески сырья, г;

W – влажность сырья.

2. Содержание белка определяли методом Лоури.

3. Молекулярно-массовое распределение ПСfВ характеризует степень деградации макромолекулы, определяли методом эксклюзионной хроматографии на хроматографе Ultimate 3000 с рефрактометрическим детектированием.

4. Степень очистки от низкомолекулярных примесей (НМП) определяли методом ИК-спектроскопии на ИК-Фурье спектрометре ФСМ 1201 [171]. Для

контроля степени очистки от НМП, а именно низкомолекулярных фенольных соединений, получены ИК-спектры образцов, очищенных различными методами. Для каждого спектра рассчитаны отношения оптических плотностей ($1610/1630 \text{ см}^{-1}$) при волновых числах 1610 см^{-1} (валентные колебания ароматических $\text{C}=\text{C}$) к 1630 см^{-1} (валентные колебания $>\text{C}=\text{O}$ карбоксильной группы) [172-173].

В первую очередь, параметром, значительно влияющим на выход и качество ПС, является степень измельчения сырья, которая приводит к ускорению процесса диффузионного извлечения экстрактивных веществ, что соответственно обеспечивает полноту их выхода. [174]

Таблица 5 – Влияние размера частиц сырья на выход ПСfВ и содержание белка.

Фракция	Выход ПСfВ, %	Соедржание белка, %
1 (менее 1,2 мм)	1,86±0,09	3,05±0,31
2 (1,2-2 мм)	3,01±0,33	2,16±0,18
3 (2-3 мм)	2,86±0,21	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

Согласно данным таблицы 5, 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. Использование наиболее измельченного сырья (менее 1,2 мм) привело 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. Кроме того, наиболее мелкие частицы сырья создают трудности при дальнейшей фильтрации [175]. Крупные частицы сырья в свою очередь труднее смачиваются, а полезная площадь поверхности снижается, в результате чего выход ПС снижается.

Известно, что в растительном сырье ПС могут находиться в связанном виде

(например, с ионами металлов) и не полностью извлекаются нейтральным растворителем [176]. Для повышения растворимости кислых ПС используют подкисление экстрагента, например, добавлением хлористоводородной кислоты, низкие концентрации которой способствуют разрушению солей кислых галактуронанов и переходу их в растворенное состояние [177]. Однако, наличие сложноэфирных связей в полимерных звеньях галактуроновой кислоты резко снижает кислотные свойства и способность ПС к связыванию с ионами металлов во внутриклеточном матриксе, что оказывает существенное влияние на динамику его извлечения из растительного сырья в зависимости от pH экстрагента. В качестве экстрагента использовали воду очищенную, подкисленную хлористоводородной кислотой до значения pH 2,0; 4,0; и воду очищенную без добавления хлористоводородной кислоты pH 6,5-7,0.

Таблица 6 – Влияние pH экстрагента на выход и молекулярную массу ПСfВ.

Значение pH экстрагента	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение (ММР)		Содержание белка, %
		W, %	M _w , кДа	
2,0	2,77±0,19	3,16	307,1	2,10±0,12
		75,14	179,2	
		21,7	141,3	
4,0	2,99±0,23	11,65	366,4	1,91±0,10
		62,90	361,1	
		25,45	144,0	
6,5-7,0	2,91±0,25	26,13	422,5	1,24±0,05
		63,07	371,0	
		10,80	161,0	

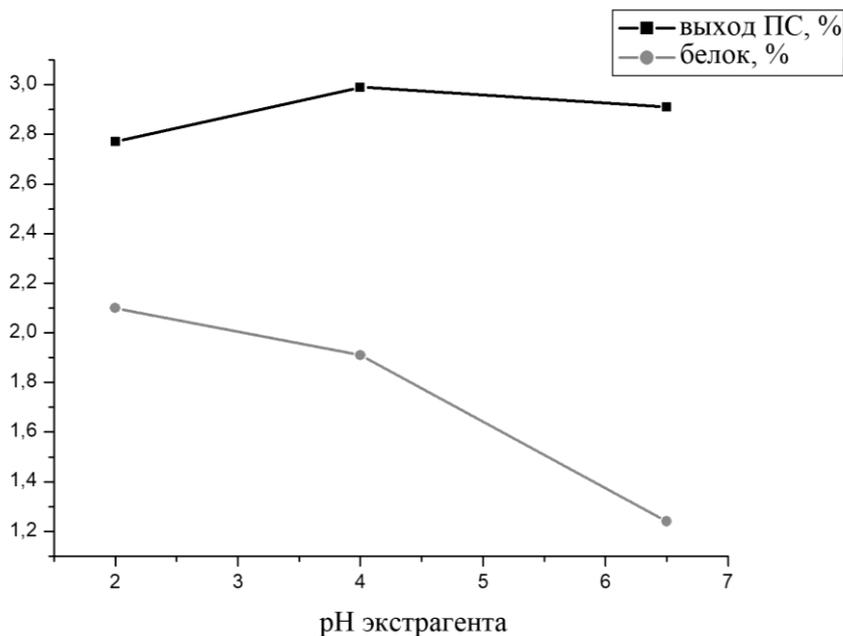


Рисунок 6 – Влияние pH экстрагента на выход ПС и белка

Фракции образцов (таблица 6), экстрагируемых водой очищенной (pH 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. Содержание примесей белка увеличивалось со снижением pH экстрагента, что, возможно, связано с активацией кислых гидролаз и разрывом кислотолабильных связей, вызывающих разрушение клеточной стенки. Так же длительное воздействие кислоты при высокой температуре, по-видимому, нарушало структурную целостность полимера и, очевидно, вызывала деградацию углеводных цепей, образованных остатками нейтральных моносахаридов [178]. Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что значение pH экстрагента не оказывает существенного влияния на суммарный выход ПСfВ, но влияет на его качество – содержание белка и ММР (рисунок 6).

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 pH=7) и растительного сырья (листьев березы). В эксперименте исследовали

следующие значения соотношений «сырье:экстрагент» : 1:10; 1:20; 1:30; 1:40.

Таблица 7 – Влияние соотношения сырья:экстрагент на выход ПСfВ

Соотношение «сырье:экстрагент»	Выход ПСfВ, %
1:10	1,68±0,11
1:20	2,87±0,22
1:30	2,91±0,23
1:40	2,88±0,18

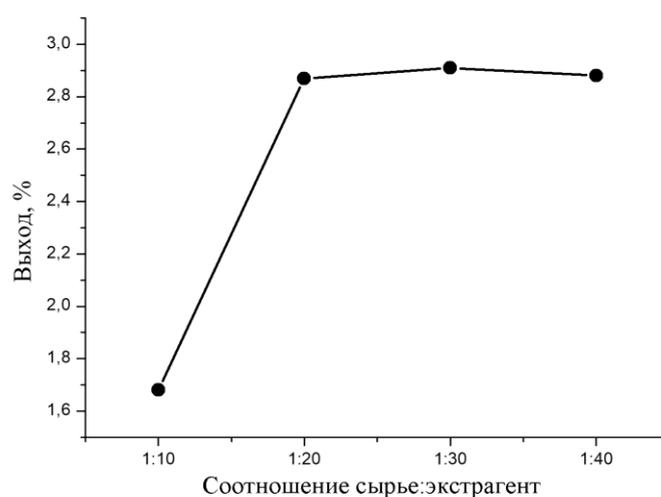


Рисунок 7 – Зависимость выхода ПСfВ от соотношения «сырье:экстрагент»

Из результатов эксперимента (таблица 7, рисунок 7) 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. Таким образом, использование соотношений «сырье:экстрагент» 1:30 и 1:40 не приводит к увеличению выхода продукта и усложняет технологического процесс, связанный с упариванием большего количества растворителя.

Температурный режим экстракции может оказывать существенное влияние на выход и качество конечного продукта. Изменение температуры может повлечь за собой как увеличение выхода продукта, так и его снижение, за счет разрушения ПС при высоких температурных значениях. 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).

Таблица 8 – Влияние температурного режима экстракции на выход и молекулярные массы ПСfВ

Температура экстракции, С	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение	
		W, %	M _w , 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 8) 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 ПС, что может оказывать влияние как на ММР, так и суммарный выход ПС.

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.

Упаривание экстракта является критической стадией процесса получения ПСfВ, так как полупродукт на данном этапе подвергается длительному воздействию повышенной температуры. С одной стороны, это может повлечь за собой снижение выхода конечного продукта и деградацию макромолекул ПС, что может привести к потере биологически-активных свойств, с другой стороны, сгущение экстракта при низкой температуре сопровождается большими временными и другими ресурсными затратами. 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.

Таблица 9 – Влияние температуры упаривания экстракта на выход и молекулярные массы ПСfВ

Температура упаривания экстракта, С	Время упаривания, мин.	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение	
			W, %	M _w , 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 (таблица 9), 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.

От степени упаривания экстракта напрямую зависит эффективность последующей стадии спиртового осаждения и недостаточное сгущение экстракта может привести к увеличению потерь конечного продукта и необоснованно высокому расходу осаждающего агента (этанола). При изучении влияния степени упаривания экстракта на выход ПСfВ получали 4 серии экстракта листьев березы, которые упаривали на роторном 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 была исключена из эксперимента, и сделан вывод о нецелесообразности 5 кратного упаривания экстракта. Различия в выходе ПСfВ при разной степени упаривания экстракта незначительны и составляют 0,1-0,2 % (таблица 10).

Таблица 10 – 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 расходованию 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. Таким образом, оптимальная.

Выделение ПС из сгущенного водного извлечения (концентрата) проводят методом осаждения. Соотношение количеств концентрата и осаждающего агента оказывает влияние на эффективность технологии – так, недостаточное количество этанола может привести к неполному осаждению ПСfВ из водного раствора, а использование избытков этанола ведет к необоснованному удорожанию конечного продукта. Кроме того, 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.

Таблица 11 – Влияние соотношения концентрат:этанол на выход и молекулярные массы ПСfВ

Соотношение «концентрат:этанол»	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение	
		W, %	M _w , кДа
1:2	2,04±0,17	75,12	401,2
		20,80	333,1
		4,08	110,9
1:3	3,39±0,26	19,48	404,7
		48,46	347,1
		32,06	183,2
1:4	3,41±0,27	24,56	406,6
		38,82	321,8
		36,62	189,4

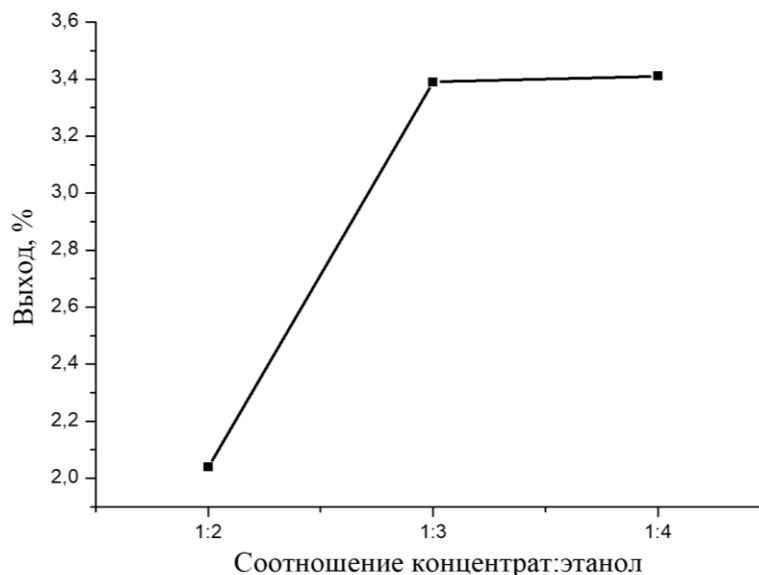


Рисунок 8 – Зависимость выхода ПСfВ от соотношения «концентрат:этанол».

Из данных эксперимента (таблица 11, рисунок 8) 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).

Макромолекулы ПС в растворе существуют в виде аморфного клубка, заполняемого растворенным в воде НМП (например, фенольными и терпеновыми соединениями), соосаждаемыми вместе с ПС, что требуют дальнейшей очистки последних. Комплекс используемых методов очистки включает промывку осадка ПС этанолом (*M1*), ультрафильтрацию (*M2*) и диализ растворов ПС (*M3*). Для очистки брали навески образцов (по 10 г, каждый в трех повторностях), полученных на стадии осаждения после центрифугирования.

M1. Образец помещали в круглодонную колбу и добавляли 150 мл 96 % этанола. Повышение температуры способствует ускорению процесса массопереноса и растворения низкомолекулярных примесей, однако, как показано в предыдущих экспериментах, высокая температура негативно сказывается на структуре, а, следовательно, и качестве получаемых веществ. Поэтому

целесообразно проводить процесс очистки при температуре водяной бани 50 °С при активном перемешивании в течение 1 часа. Далее осадок отфильтровывали и растворяли в воде очищенной.

М2. Образец растворяли в 500 мл воды, раствор подвергали ультрафильтрации с использованием кассеты VivaFlow 50, 5,000 MWCO PES с перистальтическим насосом MASTERFLEX L/S Economi, с периодическим добавлением воды очищенной в исходный образец и определением электропроводности фильтрата. Процесс завершали, когда электропроводность фильтрата достигала значения электропроводности воды очищенной (0,8-1,0 мкСм/см).

М3. Образец растворяли в 100 мл воды, полученный раствор помещали в диализный мешок Thermo Scientific Snake Skin с размером пор 3,5 кДа. Раствор ПСfВ диализировали против воды очищенной со сменой среды каждые 8 часов и контролем ее электропроводности с помощью кондуктометра Mettler Toledo FG3. Процесс завершали, когда электропроводность диализной среды достигала значения электропроводности воды очищенной (0,8-1,0 мкСм/см). После очистки, образцы замораживали при -40 °С. Подготовленный образец лиофилизировали в течение 48 часов на лиофильной сушке IIShin Bio Base MCFD 8508.

При анализе ИК-спектров ПСfВ, полученных при использовании различных методов очистки от НМП, выявлено, что наименее эффективным методом является промывка горячим этанолом, отношение $1610/1630 \text{ см}^{-1}$ составило 0,70, а для образца, очищенного М3 - 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.

Таким образом, исследованы процессы экстракции полисахаридов из растительного сырья, а также влияние критических факторов стандартных методик на их деградацию. В результате проведённого исследования разработана

методика, заключающаяся в следующем: навеску измельченных листьев березы массой 25 г смешивают с 500 мл воды очищенной (pH=7) и проводят экстракцию при температуре 50 °С (2 часа). Извлечение упаривают в 4 раза на роторном испарителе (50 °С и 25 мбар). К полученному густому извлечению медленно при перемешивании прибавляют 96 % этанол (соотношение «концентрат:этанол» - 1:3). Полученный влажный осадок растворяют в воде, очищают и концентрируют с помощью кассет VivaFlow 50, 5,000 MWCO PES. Раствор ПСfВ замораживают при -40 °С, высушивают с помощью лиофильной сушки при давлении менее 0,001 Атм в течение 2 суток. Таким образом, оптимизированная методика позволяет достичь высокого выхода ($3,41 \pm 0,27$ %) ПСfВ с высокими значениями молекулярной массы (рисунок 9) и наименьшим содержанием НМП.

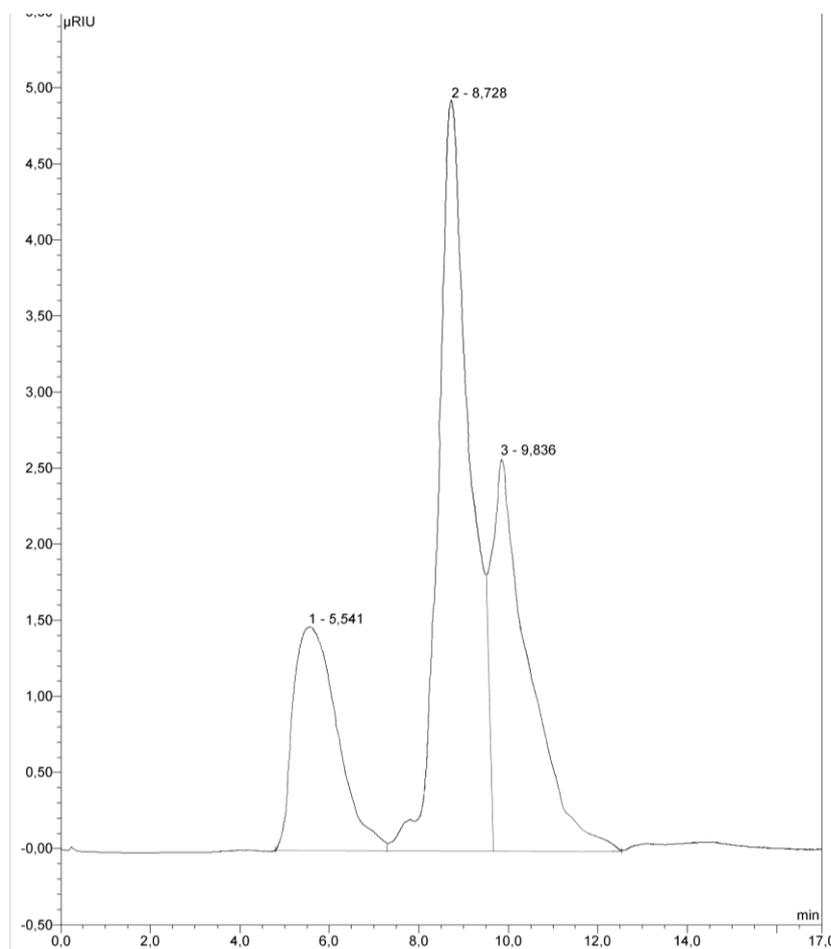


Рисунок 9 – Эксклюзионная хроматограмма ПСfВ, выделенных по разработанной методике

4.2 Выделение основной фракции методом ионообменной хроматографии

Для структурной характеристики необходимо установить состав уроновых кислот, для этого использовали нисходящую бумажную хроматографию. Таким образом в составе ПСfВ идентифицирована галактуроновая кислота, а моносахаридный состав в целом типичен для пектиновых полисахаридов.

Как видно из ВЭЖХ-анализа (рисунок 9) полученные по оптимизированной методике ПСfВ имеют гетерогенный профиль элюирования с тремя пиками, поэтому для дальнейшего изучения химической структуры необходимо дополнительно провести фракционирование, чтобы выделить отдельные фракции полисахаридов с близкими химическими свойствами. Для этой цели, был использован метод хроматографии на DEAE-целлюлозе (в ОН-форме), в основе которого лежит эффект разделения макромолекул ПС по количеству уроновых кислот, из которых они образованы. Содержание углеводов в каждой пробирке определяли фенол-серным методом, белок – методом Лоури. По полученным данным строили хроматограмму элюирования (рисунок 10.).

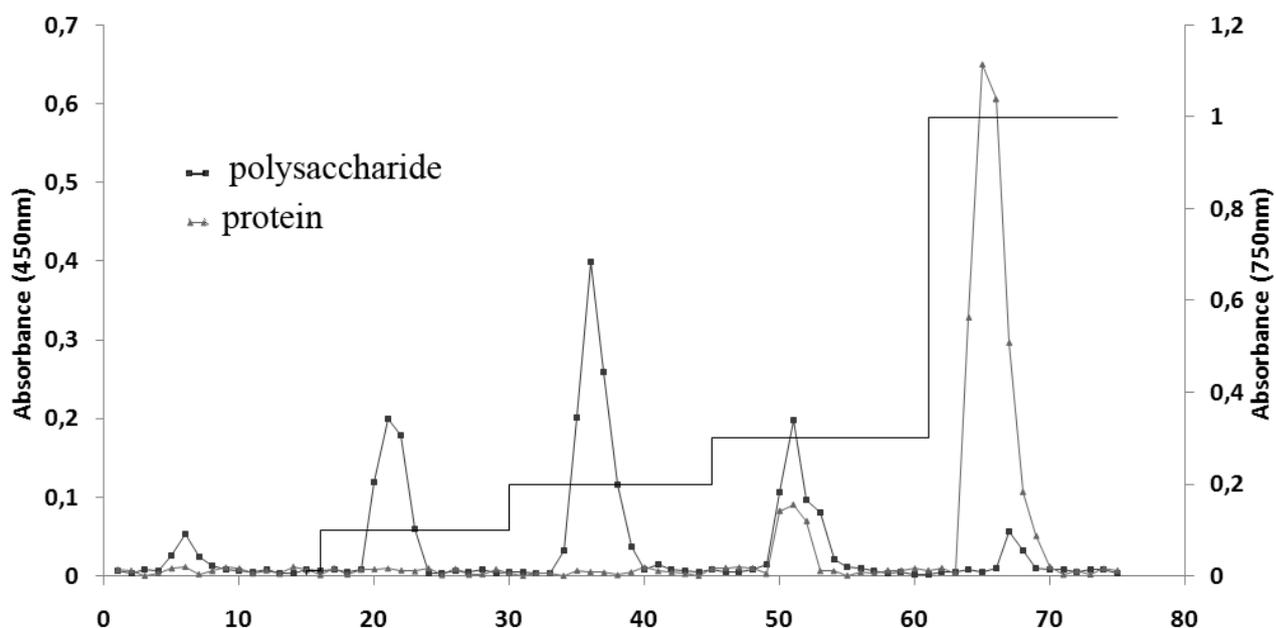


Рисунок 10 – кривая элюирования полисахаридов и белка на DEAE-целлюлозе

В результате было получено 5 объединенных фракций. Высушенные фракции взвешивали и определяли выход. В результате мажорной фракцией

определены ПС, элюированные 0,2 М раствором NaCl, выход которых превышает 50 % от массы исходной навески ПСfВ. Для полученных фракций были определены моносахаридный состав, содержание уроновых кислот, молекулярные массы по описанным методикам в разделе 2.2.2 (таблица 12). Практически весь белок, содержащийся в качестве примеси, элюирован 0,5 М раствором NaCl, что свидетельствует об отсутствии ковалентных связей между белковым и полисахаридным компонентами.

Таблица 12 – Характеристика фракций ПС березы после ионообменной хроматографии

ПС	Выход, %	Содержание, % ^c				M _w , кДа	M _n , кДа	M _w /M _n
		GalA	Rha	Ara	Gal			
ПСfВ	-	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	n.d.		
ПСfВ -2	17,05±1,18	54,4±2,4	11,6	3,3	16,8	n.d.		
ПСfВ -3	59,28±3,92	59,1±3,0	22,5	5,6	6,7	174,9	27,1	6,45
ПСfВ -4	13,16±1,27	70,7±4,0	10,5	0,9	4,0	n.d.		
ПСfВ -5	1,54±0,02	73,2±4,4	9,4	0,8	3,8	n.d.		

*GalA – галактуронозная кислота, Rha – рамноза, Ara – арабиноза, Gal – галактоза.

Как видно из таблицы 12, все полученные фракции сходны по составу и различаются лишь соотношением моносахаридов. Во всех фракциях преобладает в составе галактуронозная 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.

4.3 Фрагментация основной фракции гидролитическими методами

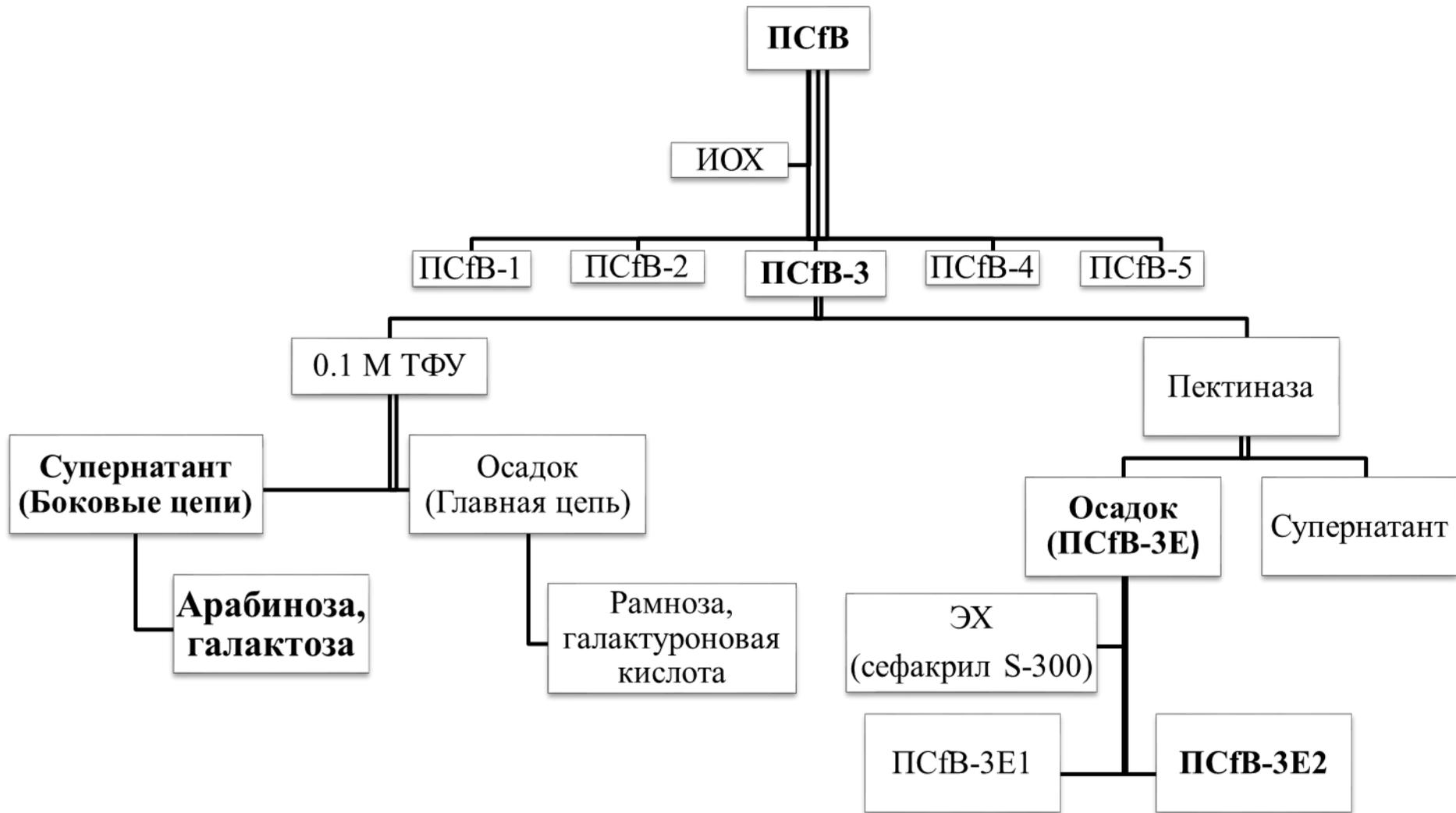
Для решения проблемы характеристики полисахаридов, вызванной их сложной структурой и чрезвычайно большими молекулярными массами (от нескольких тысяч до нескольких миллионов Да), использован подход "bottom-up" [179], заключающийся в последовательной деградации макромолекулы ПС начиная от постепенного удаления боковых цепей до выделения регулярно повторяющегося звена главной углеводной цепи. Общая схема структурного анализа представлена на рисунке 11. ПСfВ-3 представляет собой разветвленный пектиновый полисахарид, для характеристики боковых цепей нами использовался прием частичного кислотного гидролиза. ТФУ в низких концентрациях (0,01-1 моль/л) при сравнительно невысоких температурах (50-80 °С) [180], который позволяет разрывать кислотолабильные связи между остатками нейтральных моносахаридов, благодаря которым образованы боковые разветвления.

Гидролиз 1. Для этого навеску (106 мг) ПСfВ-3 помещали в ампулу, добавляли 10 мл 0,05 М ТФУ, ампулу запаивали, оставляли в термостате на 2 часа при 80 °С. По окончании гидролиза, ампулу вскрывали, количественно переносили в мерный стакан и добавляли 4х-кратный избыток этилового спирта 96 %, осаждали в течение 1 часа при 4 °С. Образовавшийся осадок центрифугировали, растворяли, упаривали до удаления остатков ТФУ и высушивали лиофильно. Супернатант упаривали на роторном испарителе в предварительно взвешенной колбе, для определения выхода и состава олиго- и моносахаридов. Таким образом, выход низкомолекулярных гидролизатов составил 6,8 %. Анализ моносахаридного состава методом ГЖХ показал наличие арабинозы и галактозы, что говорит о мягких условиях гидролиза, не разрушающих главную углеводную цепь. Анализ состава высокомолекулярной фракции показал присутствие рамнозы, арабинозы и галактозы, что говорит о незаконченности процессе отделения боковых звеньев и необходимости продолжения процесса гидролиза в более жестких условиях.

Гидролиз 2. Лиофильно высушенный остаток после гидролиза 1 (97,8 мг) помещали в ампулу и добавляли 10 мл 0,1 М ТФУ и повторяли процедуру как описано в пункте *Гидролиз 1*. Далее анализировали полученный осадок высокомолекулярной фракции и супернатант смеси низкомолекулярных сахаров. В составе супернатанта, как и в первом случае обнаружены галактоза и арабиноза, тогда как показано их отсутствие в осадке, что говорит о законченном процессе выделения главной углеводной цепи. Выход ПСfВ-3 после частичного гидролиза составил 87,5 % (92,75 мг).

Таким образом, определено, что боковые звенья пектинового полисахарида, выделенного из листьев березы образованы участками арабиногалактана, присоединённых к главной углеводной цепи через нейтральный моносахарид - рамнозу.

Для дальнейшего анализа структуры главной углеводной цепи необходимо провести ферментативный гидролиз для: а) удаления избыточного содержания галактуроновой кислоты за счет гидролиза участков гомогалактуронана, б) выделения низкомолекулярного регулярного звена, репрезентативно характеризующего общую структуру. Полисахарид-разрушающие ферменты являются незаменимыми инструментами для изучения структуры пектина, основной причиной чего является специфичность этих ферментов по сравнению с химическими методами, которые менее специфичны. В анализе пектиновых полисахаридов важное значение имеет фермент полигалактуроназа (пектиназа), избирательно расщепляющая гликозидные связи D-галактуроновой кислоты.



унок 11 – Схема структурного анализа ПС березы

Ферментативный гидролиз с α -1,4-D-полигалактураназой, обладающей эндо- и экзоактивностями, использовали для анализа главной углеводной цепи ПСfВ-3. В результате бы получен ПСfВ-3Е (выход 75,3 % исходного ПСfВ-3), устойчивый к действию пектиназы. Образец ПСfВ-3Е характеризовался значительным количеством галактурановой кислоты (таблица 12) с высоким содержанием метоксильных групп - 5,8 %, при этом степень метиловой этерификации составляла 65,3%. Существенное содержание метоксильных групп, по-видимому, способствует стабильности полисахаридных фрагментов во время ферментативного гидролиза. Было показано, что углеводная цепь ПСfВ-3Е состоит из остатков галактурановой кислоты, рамнозы, арабинозы и галактозы в качестве основных компонентов (таблица 13). Полисахарид ПСfВ-3Е имел гетерогенный профиль элюирования (рисунок 12), поэтому фракцию ПСfВ-3Е последовательно разделяли гель-проникающей хроматографией на колонке с сефакрилом S-300 при элюировании водой. Как показал анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ полученная фракция отличалась высокой гомогенностью (рисунок 12), что говорит об эффективности выбранных методов пробоподготовки. Полисахарид ПСfВ-3Е1 имел на хроматограмме симметричный одиночный пик (рисунок 12). В результате полисахарид ПСfВ-3Е1 (выход 81,7 % ВА1-3Е и 30,3 % ПСfВ) был получен в качестве основного компонента полисахаридной фракции ВА1-3Е.

Таблица 13 – Характеристика гидролизатов мажорной фракции полисахаридов листьев березы

ПС	Выход, %	GalA	Rha	Ara	Gal	Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/Mn
		%						
ПСfВ-3Е	75,3	55	32,9	7,8	9,8	171,1	18,7	9,2
ПСfВ-3Е1	9,7	76	16,1	0,8	6,6	281,4	17,7	2,4
ПСfВ-3Е2	81,7	50	28,5	7,2	14,0	156,3	7,4	2,1

*GalA – галактурановая кислота, Rha – рамноза, Ara – арабиноза, Gal – галактоза.

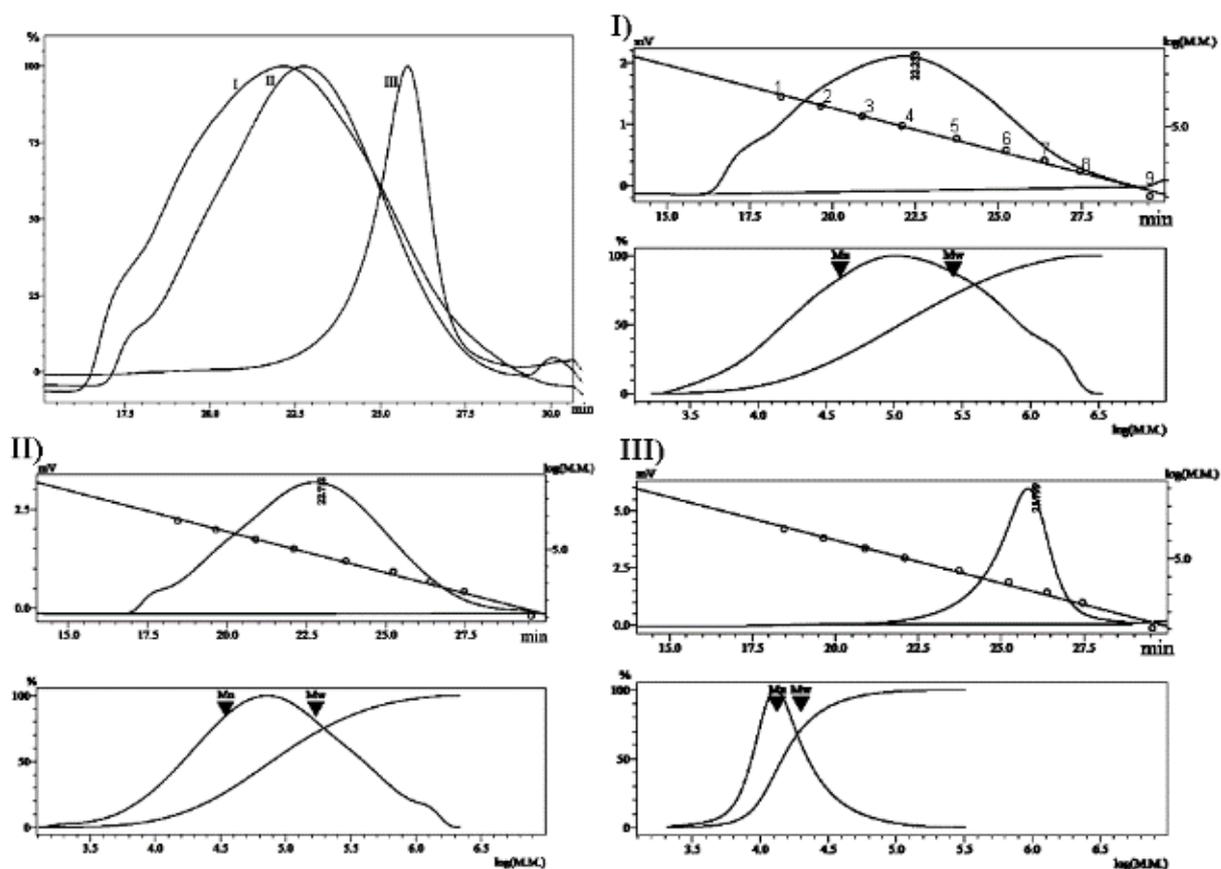


Рисунок 12 – Эксклюзионные хроматограммы фракций ПСfВ-3Е (I), ПСfВ-3Е1 (II), ПСfВ-3Е2 (III) с калибровочной кривой.

В качестве стандартов использованы пуллуланы с Mw 800; 404; 200; 110; 50; 22; 12; 6; 1,3 и 0,3 кДа (PSS Polymer Standards Service GmbH, Германия), которые были обозначены 1-10, соответственно.

4.4 ЯМР-спектроскопия структурных фрагментов основной фракции

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

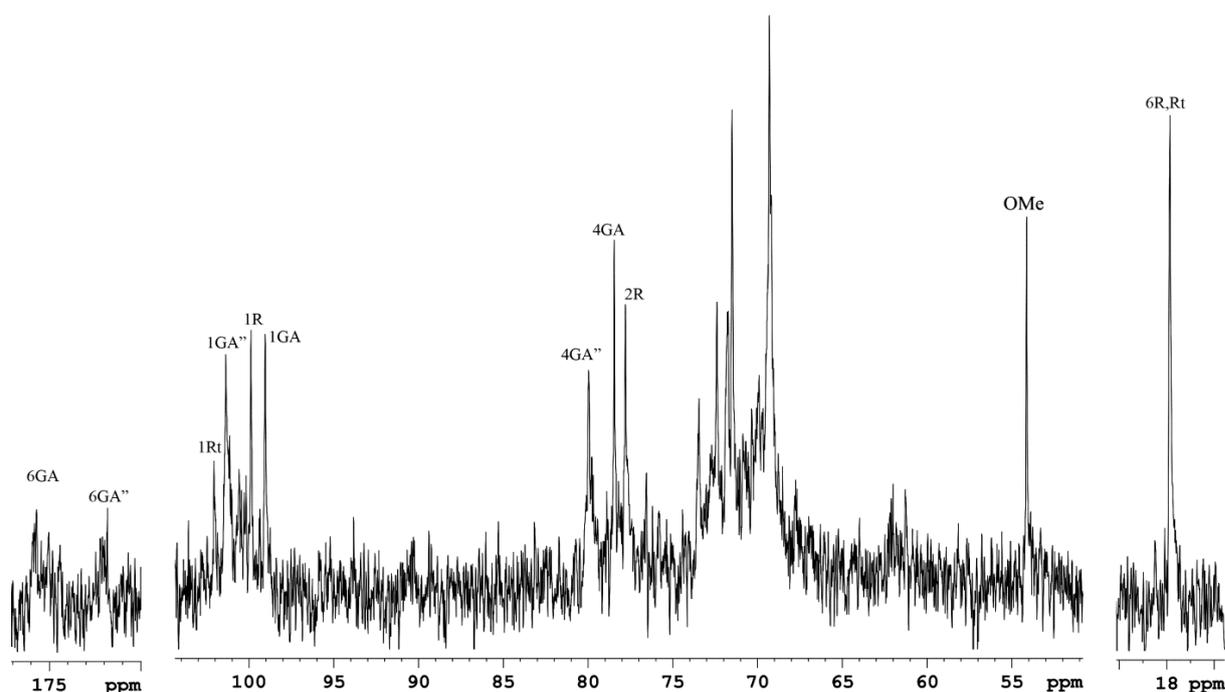


Рисунок 13 – Спектр ^{13}C – ЯМР фрагмента ПСfВ-3Е2

В аномерных областях спектров ЯМР ^{13}C полисахарида (рисунок 13) присутствовали уширенные сигналы различной интенсивности. Обнаружены четыре основных сигнала рамнопиранозильных и галактуронопиранозильных остатков. Два интенсивных сигнала при 100 и 98,9 в спектре ЯМР ^{13}C аномерной области были идентифицированы как соответствующие 2-О-замещенные рамнопиранозильные остатки (R) и 4-О-замещенные галактуронопиранозильные остатки (GA) рамногалактуронана-I [181-183]. Дополнительный интенсивный сигнал при 101,5 м.д. был обнаружен в спектре, который был идентифицирован как соответствующие метилэтерифицированные 4-О-связанные галактуронопиранозильные остатки (GA'') области НГ [184]. Сигналы C1 невосстанавливающих концевых рамнопиранозильных остатков (Rt) при 102,1 были идентифицированы в спектрах [185-186]. Другие диагностические области включают сигналы COOH при δC 175,8 и COOCH₃ 172,8 м.д., [187-191] кроме того, обнаружен интенсивный сигнал атома углерода метоксильной группы (COOCH₃) при δC 54,3 м.д. [192-193].

Таблица 14 – Химические сдвиги сигналов ЯМР-спектра фрагмента полисахарида листьев березы.

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

Таким образом, согласно анализу ЯМР-спектра репрезентативного фрагмента ПСfВ его основная углеводная цепь представлена L-рамнопиранозил-6-метил-D-галактуронаном.

Выводы к главе 4

1. Изучены процессы экстракции полисахаридов из растительного сырья, а также влияние критических факторов стандартных методик на их деградацию. В результате проведённого исследования разработана методика, позволяющая достичь высокого выхода ($3,41 \pm 0,27$ %) ПСfВ с высокими значениями молекулярной массы и наименьшим содержанием НМП.

2. Методом ионообменной хроматографии выделена мажорная фракция полисахаридов листьев березы для дальнейшей структурно-химической характеристики. Выявлено, что выделенные полисахариды представляют собой смесь полимергомологов.

3. Методом частичного гидролиза установлено, что боковые цепи образованы участками арабиногалактана. Методом ферментативного гидролиза, с последующим фракционированием, выделен репрезентативный фрагмент полисахаридов листьев березы и охарактеризован с помощью ЯМР-спектроскопии. Таким образом, главная углеводная цепь представляет собой повторяющиеся участки, образованные L-рамнопиранозил-6-метил-D-галактуронаном.

Глава 5. Стандартизация субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

5.1 Определение общих фармакопейных параметров качества субстанции по требованиям ГФ XIV

Описание: ПС листьев березы представляет собой бежевую пористую массу, медленно растворимую в воде с образованием вязкого прозрачного раствора, без запаха, без вкуса.

Тяжелые металлы. Определение примесей тяжелых металлов в субстанции проводили согласно ГФ XIV издания (ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»). Содержание тяжелых металлов не должно превышать значений, приведенных в ОФС. Исследуемые нами образцы субстанции соответствовали требованиям ГФ XIV.

Потерю в массе при высушивании определяли прокаливанием навески ПС в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С по ГФ XIV, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» на пяти образцах субстанции, каждая в трех повторностях. Потеря в массе при высушивании находилась в диапазоне от 5,0 до 7,6 %.

Поэтому предложено внести в нормативную документацию (НД) показатель потеря в массе при высушивании не более 8%.

Микробиологическая чистота. Оценку микробиологической чистоты проводили на пяти образцах субстанции по методике, изложенной в ГФ XIV ОФС.1.2.4.0002.15, категория 3.2. В результате исследования 5 образцов субстанции установлено, что по числу аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, энтеробактерий, устойчивых к желчи, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* и бактерий кишечной группы образцы соответствуют нормативным требованиям ГФ XIV.

5.2 Разработка и валидация методик определения параметра «Подлинность»

Для установления подлинности ПС листьев березы использовали следующие методики:

1. Качественная реакция:

0,05 г ПС растворяли в 2 мл воды очищенной, добавляли 200 мкл 2 % раствора фенола и 2 мл концентрированной кислоты серной, в результате реакции наблюдали красно-оранжевое окрашивание [105].

2. 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_{XL} 300×7,8 мм («Supelco», Япония), подвижная фаза – 0,1 М раствор NaCl, 1,0 мл/мин. Регистрацию компонентов проводили с помощью рефрактометрического детектора.

Молекулярно-массовое распределение ПС листьев березы должно соответствовать хроматограмме, представленной на рисунке 14.

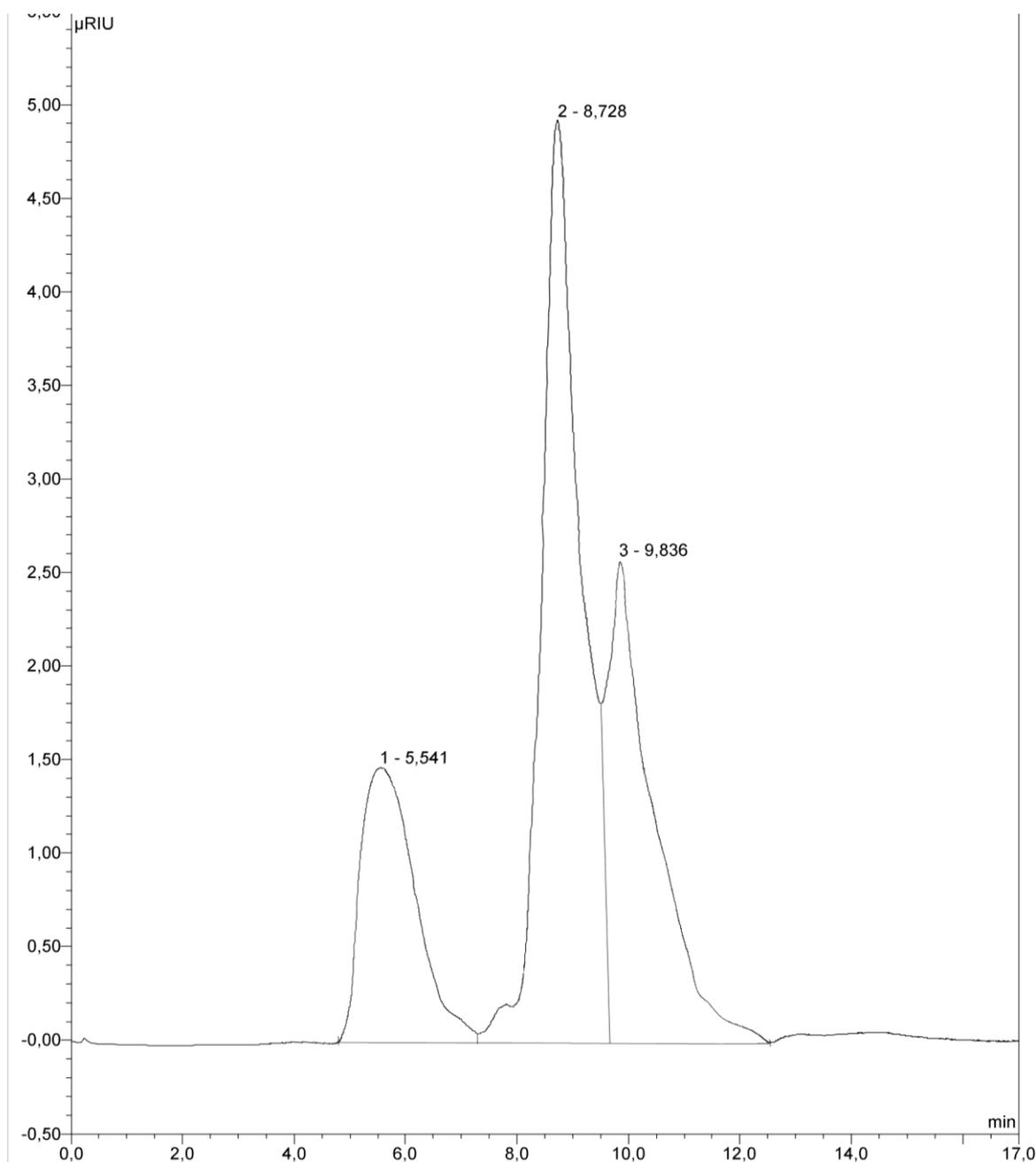


Рисунок 14 – Хроматограмма образца ПС листьев березы

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

3. ИК-спектроскопия

ИК-спектроскопия является информативным методом, с помощью которого возможно определение подлинности фармацевтических субстанций, за счет проведения полной идентификации вещества и определения наличия примесей. Нами использован наиболее распространенный метод записи ИК-спектра – в таблетке с калия бромидом (ОФС.1.2.1.1.0002.15) рисунок 15.

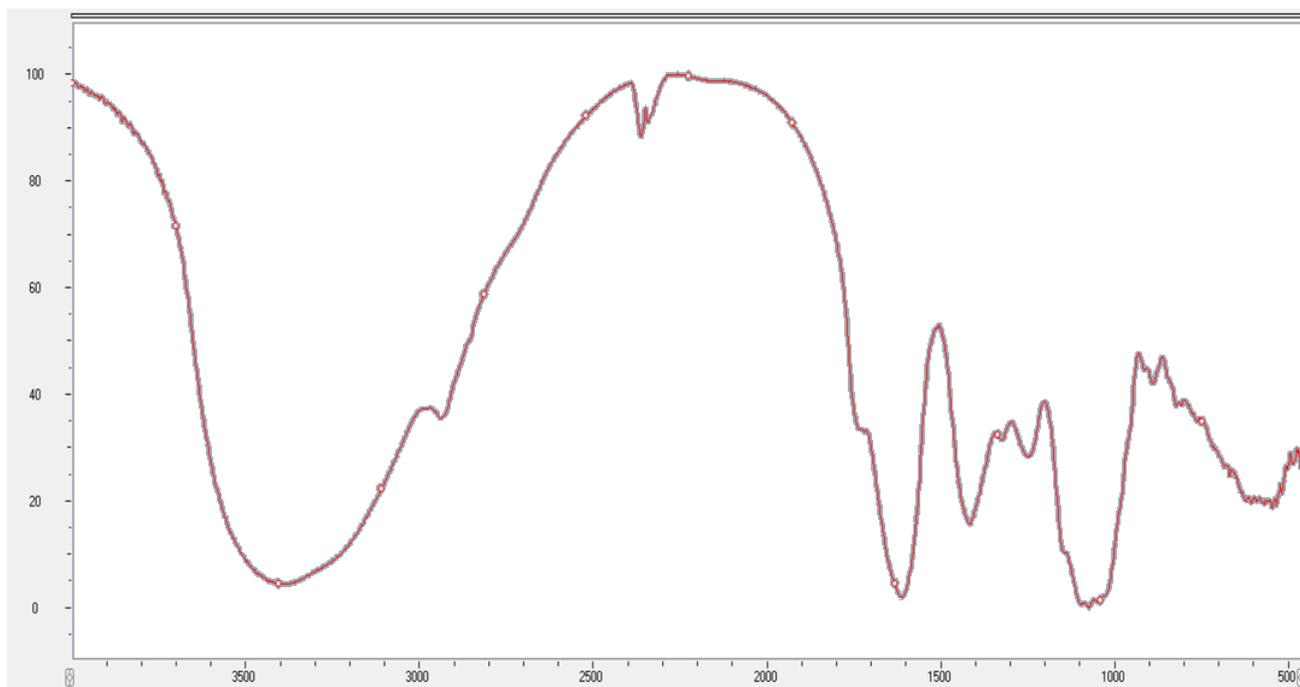


Рисунок 15 – ИК-спектр таблетки KBr с L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронатом

В ИК-спектре идентифицирована широкая интенсивная полоса поглощения в области 3100-3600 cm^{-1} , характерная для ν колебаний гидроксильных групп С-ОН и валентных С-Н групп. Но наиболее информативной областью в ИК-спектроскопии полисахаридов является область от 1800-1000 cm^{-1} , в которых наблюдаются две интенсивные полосы поглощения 1747 и 1609 cm^{-1} , характерные для метоксилированных и кислых сахаров. Полоса поглощения при 1418 cm^{-1} соответствует валентным колебаниям С-Н связей, полоса поглощения при 1240 cm^{-1} деформационным колебаниям С-О связей в галактуроновой кислоте. Так же в этой области можно идентифицировать кольцевые колебания С-С связей при 1017 cm^{-1} с валентными колебаниями С-ОН боковых групп при 1147 cm^{-1} и С-О-С гликозидных связей полисахаридов при 1100 cm^{-1} [161].

5.3. Разработка и валидация методик определения параметра «Посторонние примеси»

Белок

Как уже было отмечено ранее, методика выделения полисахаридов не позволяет полностью избавиться от примесей в виде белка, поэтому контроль данного параметра необходим для стандартизации субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана. Для оценки данного параметра нами выбран метод Лоури, рекомендованный ГФ XIV.

Приготовление испытуемого раствора: 0,1 г ПС (точная навеска) растворяли в воде очищенной в мерной колбе на 100 мл. Аликвоту полученного раствора объемом 10 мл переносили в мерную колбу на 100 мл и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Далее раствор анализировали согласно методу 2(А), описанному в ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка». Содержание белка в исследуемой пробе определяли по градуировочному графику для БСА.

Установлено, что содержание белка в субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в пересчете на БСА не превышает 1,2 %.

Поэтому предложено внести в НД показатель содержание примесей белка не более 1,5 %.

Остаточные органические растворители

На последней стадии получения субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана применяется этиловый спирт, остаточное содержание которого в субстанции необходимо контролировать. Предельно допустимое содержание остаточных органических растворителей нормировано в ГФ XIV ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители». Этиловый спирт относится к веществам 3 класса опасности, предельно допустимое содержание которого не должно превышать 50 мг/сутки. Для разработки методики использован метод газовой хроматографии, рекомендованный ОФС.1.1.0008.15. В процессе разработки методики нами подобраны рабочие условия пробоподготовки субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана и хроматографического определения

этанол с использованием в качестве внутреннего стандарта изопропилового спирта (СТХ 0024-03, «Экрос-Аналитика», Россия). Расчет содержания этанола предложено проводить методом внутреннего стандарта в диапазоне 10 – 1000 ppm.

Приготовление испытуемого раствора. Переносят 5,0 г (точная навеска) субстанции L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана в стеклянный стакан объемом 50 мл, приливают 10 мл метилового спирта и помещают в ультразвуковую ванну на 20 минут, после чего содержимое стакана количественно переносят на фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Фильтруют в мерную колбу на 50 мл, промывая не менее 2 раз осадок свежими порциями метанола. Добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 11,7 мг/мл. После доводят объем до метки чистым метанолом.

Приготовление раствора внутреннего стандарта 11,7 мг/мл. Ампулу (3 мл) СТХ пропанола-2 отчищают от этикетки и загрязнений, протирая ацетоном, и сушат на воздухе, после чего взвешивают на аналитических весах. Вскрыв ампулу, содержимое переливают в мерную колбу на 100 мл и трижды промывают ампулу чистым метанолом, смывы переливают в мерную колбу. Ампулу сушат и снова взвешивают. По разности масс рассчитывают количество пропанола-2. Содержимое колбы доводят до метки чистым метанолом (раствор А). В мерную колбу, вместимостью 10 мл переносят 5 мл раствора А, содержимое колбы доводят до метки метанолом (раствор внутреннего стандарта).

Срок годности раствора А – 6 месяцев; раствора внутреннего стандарта – 14 дней.

Объем вводимой пробы 1 мкл. В качестве неподвижной фазы выбрана колонка из плавленого кварца размером 0,32 мм×30 м, покрытой слоем 1,8 мкм фазы HP5. В качестве газа-носителя используется гелий с линейной скоростью порядка 35 см/с и коэффициентом деления потока 1:5. Детектирование осуществлялось с помощью пламенно-ионизационного детектора.

Температура колонки поддерживается на уровне 40 °С в течение 20 минут, затем повышается со скоростью 10 °С/мин до 240 °С и поддерживается в течение 20 минут. Температура инжектора и детектора поддерживается на уровне 140 и 250 °С,

соответственно. Условия могут быть изменены при сохранении требуемого разрешения между хроматографическими пиками.

$$C_{\text{этанол}} = \frac{S_{\text{этанол}} \times m_{\text{СТХ}}(\text{мг})}{S_{\text{СТХ}} \times m_{\text{ФС}}(\text{г}) \times 200}$$

где, $C_{\text{этанол}}$ – содержание этанола в фармацевтической субстанции, мг/г;

$S_{\text{этанол}}$ – площадь пика этанола на хроматограмме испытуемого раствора;

$m_{\text{СТХ}}$ – масса СТХ пропанола-2, взятая для приготовления стандартного раствора, мг;

$S_{\text{СТХ}}$ – площадь пика пропанола-2 на хроматограмме испытуемого раствора;

$m_{\text{ФС}}$ – масса фармацевтической субстанции, взятая для приготовления испытуемого раствора, г;

200 – коэффициент разбавления.

Разработанная методика была валидирована: определены показатели линейности (рисунок 16), прецизионности, правильности и точности (таблица 15).

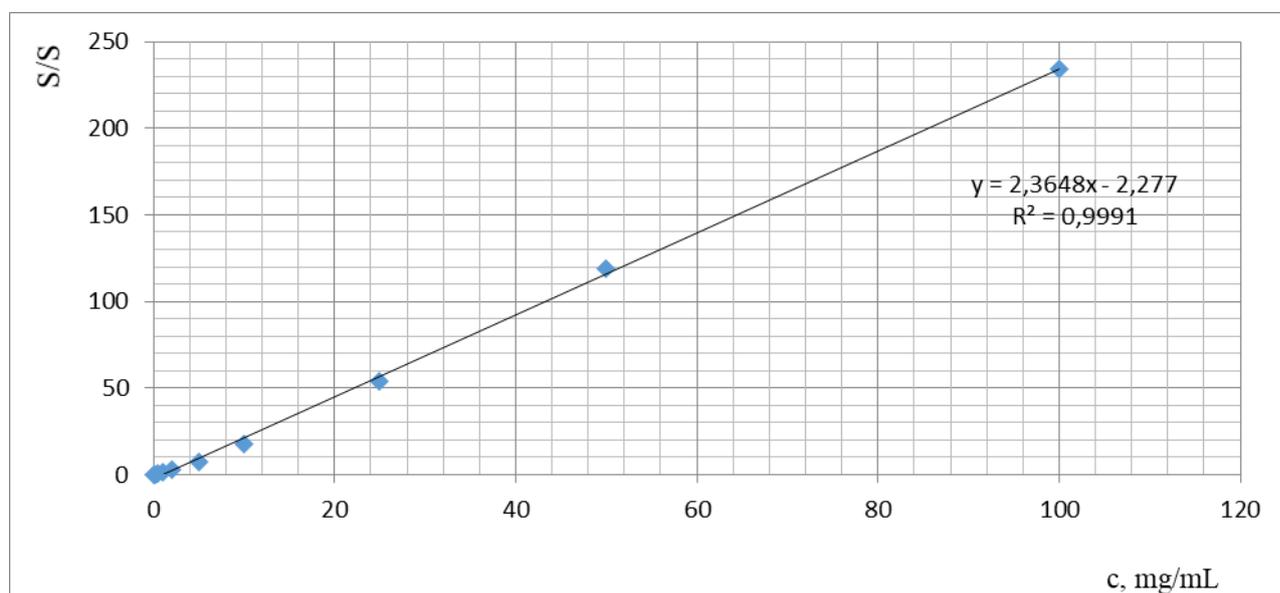


Рисунок 16 – График зависимости отношения пиков этанола и внутреннего стандарта (изопропилового спирта) от концентрации этанола в диапазоне концентраций 0,1 – 100,0 мг/мл

Таблица 15 – Валидационные характеристики методики количественного определения этанола

диапазон линейности	0,1 – 100 мг/мл
повторяемость	1,57 %;
воспроизводимость	2,80 %;
правильность	99,38 %

5.4 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.

На первом этапе исследования нами подобраны условия подготовки пробы для анализа - гидролиза L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана. Для одновременного проведения процессов гидролиза макромолекулы ПС и окисления образующихся моносахаридов до производных фурфурола чаще всего используют растворы H_2SO_4 (98–70 %) [194]. На результат гидролиза-окисления ПС влияют следующие факторы: время процесса, концентрация гидролизующего агента и температура нагревания. Влияние каждого параметра оценивали последовательно.

В первую очередь определяли время наиболее полного гидролиза-окисления. Для этого к 3 мл раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана ($C=0,1$ мг/мл), охлажденным на ледяной бане, добавляли 3 мл 98% H_2SO_4 и нагревали на

водяной бане (100 °С) в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 минут. Полученные растворы вновь охлаждали и добавляли по 3 мл реактива 0,2 % антрона. Содержимое пробирок перемешивали и немедленно нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Оптическую плотность измеряли в максимуме поглощения при длине волны 625 нм.

Далее оценена степень влияния концентрации серной кислоты (80, 90, 98 %) на интенсивность гидролиза-окисления при инкубировании в течение 30 минут. Определено, что использование концентраций менее 80 % приводят к выпадению в осадок антрона. Как видно из диаграммы (рисунок 17), степень гидролиза ПСfВ возрастает с увеличением концентрации серной кислоты, таким образом в методике следует использовать 98 % раствор.

Определение оптимального времени нагревания для проведения процесса гидролиза-окисления полисахаридов показало, что при увеличении времени с 10 до 30 минут происходит увеличение поглощения испытуемого раствора и достигается максимального значения при нагревании в течение 30 минут, а при увеличении времени до 40 минут происходит снижение оптической плотности испытуемого раствора, что объясняется деструкцией и озолением. Поэтому рекомендовано использовать время нагревания 30 минут (рисунок 17).

На последнем этапе нами установлена степень влияния температуры водяной бани на гидролиз L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана. Изучены температуры нагревания водяной бани: 60, 80 и 100 °С. Полученные данные показали, что с ростом температуры степень гидролиза увеличивается, поэтому в разрабатываемой методике целесообразно использовать кипящую водяную баню.

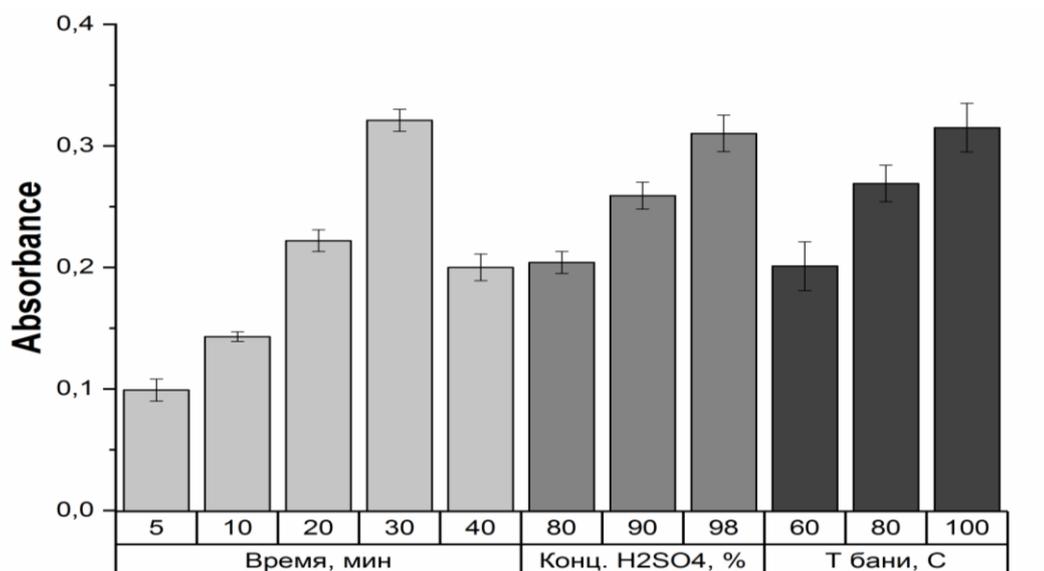


Рисунок 17 – Зависимость оптической плотности комплексов гидролизатов ПСfВ с антроном от времени нагревания, концентрации H₂SO₄, температуры водяной бани

Таким образом, нами разработаны оптимальные условия пробоподготовки L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана для проведения количественного определения с антроновым реактивом [195], алгоритм которого представлен на рисунке 18.



Рисунок 18 – Блок-схема разработанной методики количественного определения ПСfВ.

Нами получены электронные спектры (рисунок 19) продуктов реакции стандартов моносахаридов с антроном в разработанных условиях, входящих в состав исследуемой субстанции. Спектры поглощения комплексов антрона с продуктами окисления рамнозы и галактозы имел максимум поглощения при длине волны 625 ± 2 нм, что соответствует литературным данным [196-197]. Однако на спектрах галактурановой кислоты и арабинозы отсутствовали полосы поглощения при длине волны 625 ± 2 нм, о чем свидетельствовало отсутствие зеленой окраски растворов.

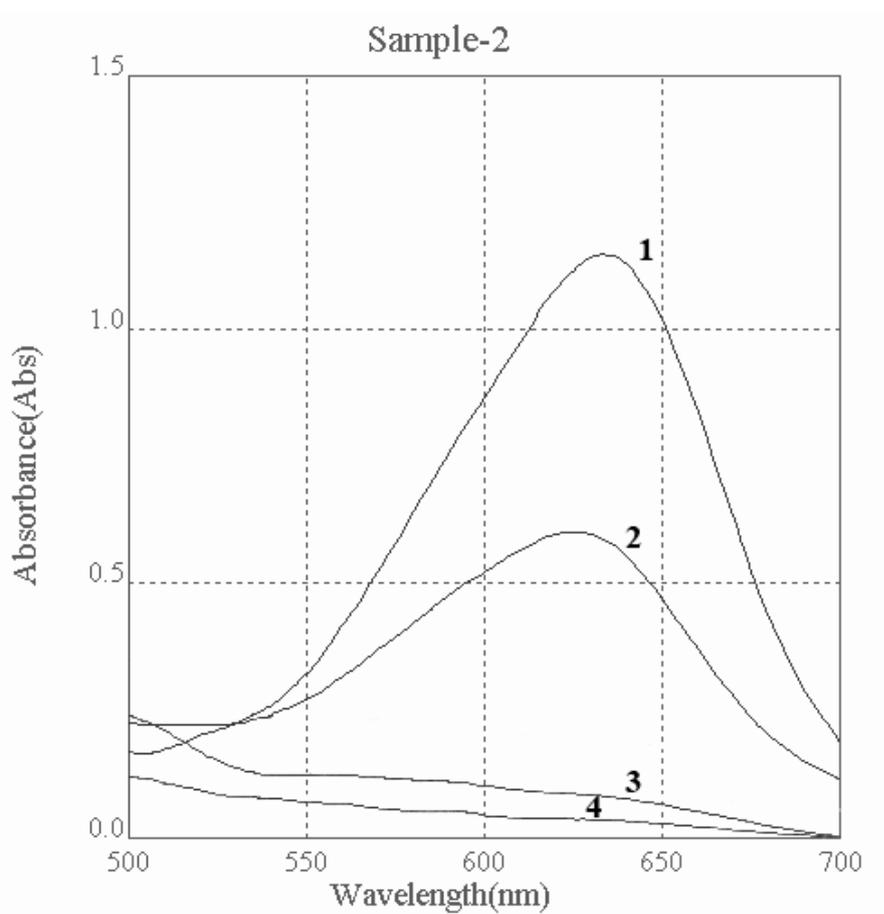


Рисунок 19 – Электронные спектры модельных растворов моносахаров 1 мг/мл с антроном в разработанных условиях (1 – рамноза, 2 – галактоза, 3 – арабиноза, 4 – галактурановая кислота)

Таким образом, показана возможность использования рамнозы в качестве стандартного вещества. Для расчета содержания ПС предложено использовать формулу:

$$X\% = \frac{m_0 \times Abs_1 \times P \times 3}{Abs_0 \times m_1 \times (1 - W/100)}$$

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 проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [198].

Специфичность методики заключается, в том числе, в ее способности достоверно определять анализируемое вещество в присутствии веществ, которыми легко можно фальсифицировать препарат. Такими фальсификаторами для L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана могут являться коммерчески доступные моносахара и пектиновые полисахариды. Специфичность разработанной методики определяли, изучая влияние рамнозы и яблочного пектина на проведение и результаты определения. Согласно разработанной методике проведен анализ с использованием в качестве испытуемых растворов:

1. L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронан;
2. L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронан+рамноза;
3. L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронан+яблочный пектин;
4. Яблочный пектин.

В эксперименте показано, что добавка мономера – рамнозы удаляется на стадии ультрафильтрации (ввиду ее низкой молекулярной массы), поэтому ее присутствие в анализируемой пробе не влияет на поглощение при аналитической длине волны (рисунок 20). Молекулярная масса яблочного пектина, аналогично L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронану превышает порог отсекающего фильтра в 100 кДа, однако на величину оптического поглощения яблочный пектин не оказывал

влияния. Таким образом, можно сделать вывод, что разрабатываемая методика валидна по показателю специфичность.

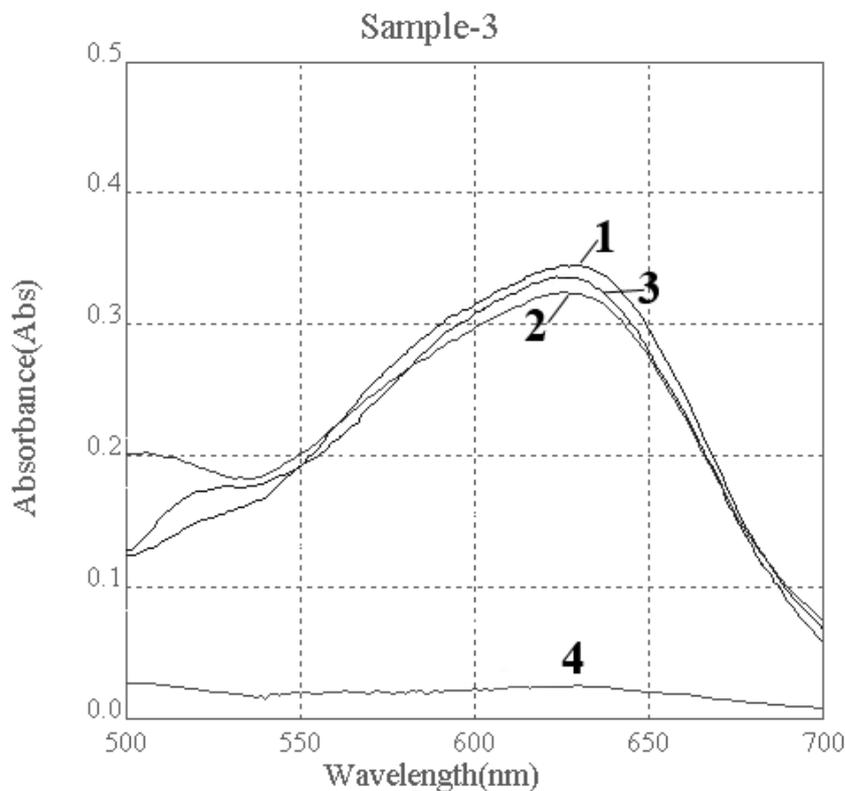


Рисунок 20 – Электронные спектры, полученные при определении специфичности (1. L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронан; 2. L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронан+рамноза; 3. L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана+яблочный пектин; 4. Яблочный пектин.)

Линейность и аналитическую область методики определяли на пяти уровнях концентраций стандартных растворов (0,04, 0,06, 0,08, 0,10 и 0,12 мг/мл), для этого аликвоту 0,4-1,2 мл раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана (1,0 мг/мл) помещали в пробирку Vivaspin Turbo 4 и центрифугировали 10 минут при $4,4 \times 10^3$ об/мин, после чего добавляли 2 мл воды и повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатант количественно переносили в мерную колбу на 10 мл, доводили объем раствора до метки водой. Определяли оптическую плотность растворов при длине волны 625 нм. По полученным значениям оптической плотности строили градуировочный график.

Аналитическая область, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал содержаний L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана от 40 до 120 %. Уравнение $Abs=4,794 \times C - 0,0381$, 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 20).

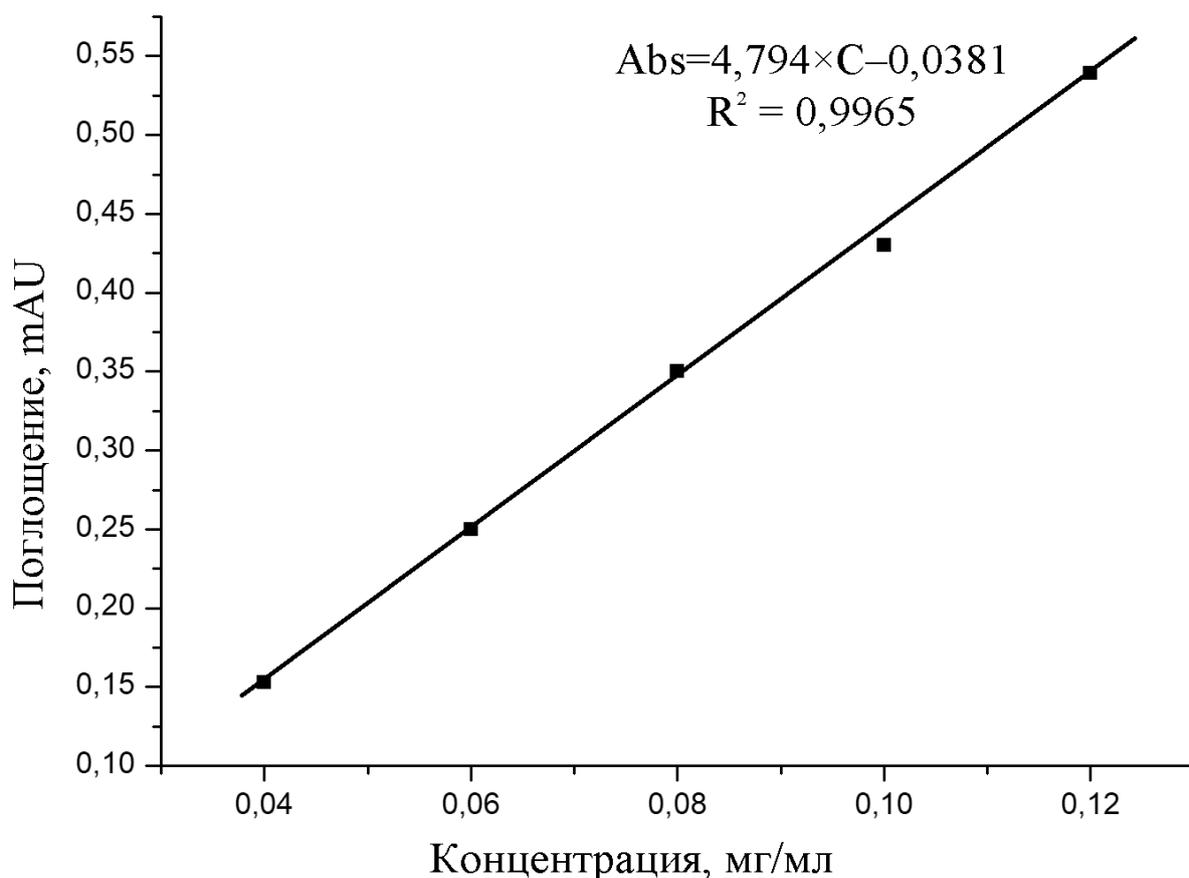


Рисунок 21 – Градуировочный график L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

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 (δ , %) результатов. Результаты определения правильности методики представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Оценка правильности методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

Содержание ПСfВ в растворе, мг/мл		δ , %	$\bar{\delta}$, %
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 советовала навеска 80 мг (80 %), среднему 100 мг (100 %) и нижнему 120 мг (120 %).

Анализ полученных данных оценки повторяемости (таблица 17) 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 17 – Оценка повторяемости методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

$X_{ист}$ %	$X_{ср}$, %	S_x	ΔX	σ_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 условиях разработанной методики анализа сходимость в условиях повторяемости (σ_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 неравенство $F_{расч.} < F(0,025, 5, 5)$ принимали нуль-гипотезу и рассчитывали относительное отклонение (RSD%, σ_R) по выборке n=12 (таблица 18).

Таблица 18 – Оценка воспроизводимости методики количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана

$X_{ист}$ %	$X_{ср,j}$, %		F	S_x	σ_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 специфичность, линейность, правильность и прецизионна в условиях повторяемости и воспроизводимости. Таким образом, методика количественного спектрофотометрического определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана может быть включена в НД на субстанцию полисахаридов листьев березы.

По разработанной и валидированной методике проанализировано 5 серий активной фармацевтической субстанции, содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в которой находилось в диапазоне 98,8-99,8 %.

Выводы к главе 5

1. Определены параметры качества активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов листьев березы, растворимость, подлинность (реакция с фенол-серным реактивом, определение молекулярно-массового распределения компонентов ПСК методом эксклюзионной ВЭЖХ, ИК-спектроскопия); чистота (определение примесей белка – не более 1,5 %); количественное определение – не менее 98,5 %; потеря в массе при высушивании – не более 8%; предельно допустимое содержание тяжелых металлов не должно превышать значений, приведенных в ОФС.1.5.3.0009.15.; микробиологическая чистота (соответствие требованиям ОФС.1.2.4.0002.15, категория 3.2).

2. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в активной фармацевтической субстанции.

3. Методика количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана соответствует требованиям 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 %).

4. Определенные параметры стандартизации L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана позволили составить проект нормативной документации «Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-О-алкил-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 тоже время, установлено, что снижение pH 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 %, галактурановая 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-О-метил-D-галактуранана.

5. Разработана методика количественного определения L-рамнопиранозил-6-О-алкил-D-галактуранана 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-О-метил-D-галактуранана (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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на широкий круг гиполипидемических препаратов и терапевтических мишеней, на сегодняшний день актуальным является разработка оригинальных отечественных лекарственных препаратов растительного происхождения, лишенных побочных эффектов.

В данной работе представлены результаты разработки фармацевтической субстанции, которые могут лечь в основу нового гиполипидемического препарата группы секвестрантов желчных кислот, которые на сегодняшний момент отсутствуют в реестре лекарственных средств РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yusuf, S. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries / S. Yusuf, S. Hawken, S. Ounpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos, L. Lisheng // *The Lancet*. – 2004. – Vol.364, № 9438. – p. 937-952.
2. Welty, F.K. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. / F.K. Welty // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2014. – Vol. 25. – P. 161-168.
3. Kopin, L. Dyslipidemia / L. Kopin, H. Lowenstein // *Annals of Internal Medicine*. – № 167. – P. 81-96.
4. van Aalst-Cohen, E.S. Clinical, diagnostic, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia / E.S. van Aalst-Cohen, A.C. Jansen, S. de Jongh, P.R. de Sauvage Nolting, J.J. Kastelein // *Seminars in Vascular Medicine*. – 2004. – Vol.1, № 4. – P. 31-41.
5. Catapano, A.L ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias / A.L Catapano., I. Graham, G. De Backer, O. Wiklund, M. J. Chapman, H. Drexel, A. W. Hoes, C. S. Jennings, U. Landmesser, T. R. Pedersen, Ž. Reiner, G. Riccardi, M.-R. Taskinen, L. Tokgozoglu, M. Verschuren, C. Vlachopoulos, D. A. Wood, J. L. Zamorano, M.-T. Cooney // *European Heart Journal*. – 2016. – Vol. 37, № 39. – P. 2999-3058.
6. Goldstein, J.L. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins / J.L. Goldstein, M.S. Brown // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, № 1. – P. 161-172.
7. Zhang, H. Discontinuation of statins in routine care settings: a cohort study / H. Zhang, J. Plutzky, S. Skentzos, F. Morrison, P. Mar, M. Shubina, A. Turchin // *Annals of Internal Medicine*. – 2013. – Vol.158, № 7. – P. 526-534
8. Thompson, P.D. Statin-associated side effects / P.D. Thompson, G. Panza, A. Zaleski, B. Taylor // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2016. – Vol.67, № 20. – P. 2395-2410.
9. Sakaeda, T. Statin-associated muscular and renal adverse events: data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system / T. Sakaeda, K.Kadoyama, Y. Okuno // *PLoS One*. – 2011. – Vol.6, № 12. – P. 1-5.

10. Драпкина, О.М. Миопатия как побочный эффект терапии статинами: механизмы развития и перспективы лечения / О.М. Драпкина, Е.М. Чернова // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2015. – № 11(1). – С. 36-101.
11. Jacobson, T.A. The National Lipid Association Recommendations for Patient-centered Treatment of Dyslipidemia. / T.A. Jacobson // J Clin Lipidol. - 2015. – Vol. 9. – P.1-122.
12. Lioudaki, E. Ezetimibe; more than a low density lipoprotein cholesterol lowering drug? An update after 4 years. / E. Lioudaki, E. Ganotakis, D. Mikhailidis // Curr Vasc Pharmacol. – 2011. – Vol. 9. – P. 62-86.
13. Jia X. Poststatin Lipid Therapeutics: A Review / X. Jia, P. Lorenz, C. M. Ballantyne // Methodist Debaquey Cardiovasc J. – 2019. – Vol.15, № 1. – P. 32–38.
14. Цека, О.С. Некоторые особенности проведения липиднормализующей терапии в современных условиях. / О.С. Цека, Ю.П. Перепонов, Л.Л. Кириченко, Е.С. Дорофеева. // Медицина экстремальных ситуаций. – 2011. - №2. - С. 49-53.
15. Kelly, M.S. Pharmacologic approaches for the management of patients with moderately elevated triglycerides (150-499 mg/dL) / M.S. Kelly, C. Beavers, J.D. Bucheit, E.M. Sisson, D.L. Dixon // Journal of Clinical Lipidology. – 2017. – Vol.11, № 4. – P. 872-879.
16. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – P. 3143-3421.
17. Bays, H.E. Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications / H.E. Bays, A.P. Tighe, R. Sadovsky, M.H. Davidson // Expert Review of Cardiovascular Therapy. – 2008. – Vol.6, № 3. – P. 391-409.
18. Lavie, C.J. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases / C.J. Lavie, R.V. Milani, M.R. Mehra, O. Ventura // Journal of the American College of Cardiology. – 2009. – Vol.54, № 7. – P. 585-594.
19. Bradberry, J.C. Overview of omega- 3 fatty acid therapies / J.C. Bradberry, D.E. Hilleman // PT. – 2013. – Vol.38, № 11. – P. 681-691.

20. Kastelein, J.J.P. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia / J. Kastelein, S.I. van Leuven, L. Burgess, G.W. Evans, J.A. Kuivenhoven, P.J. Barter., J.H. Revkin, D.E. Grobbee, W.A. Riley, C.L. Shear, W.T. Duggan, M.L. Bots // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol.356, № 16. – P. 1620-1630.
21. Ranalletta, M. Biochemical characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitors / M. Ranalletta, K.K. Bierilo, Y. Chen, D. Milot, Q. Chen, E. Tung, C. Houde, N.H. Elowe, M. Garcia-Calvo, G. Porter, S. Eveland, B. Frantz-Wattley, M. Kavana, G. Addona, P. Sinclair, C. Sparrow, E.A. O'Neill, K.S. Koblan, A. Sitlani, B. Hubbard, T.S. Fisher // *Journal of Lipid Research*. – 2010. – Vol.51, № .9. – P. 2739-2752.
22. Barter, P.J. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events / P.J. Barter, M. Caulfield, M. Eriksson, S.M. Grundy, J.J. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J.C. Tardif, D.D. Waters, C.L. Shear, J.H. Revkin, K.A. Buhr, M.R. Fisher, A.R. Tall, B. Brewer // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol.357, № 21. – P. 2109-2122.
23. Fayad, Z.A. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial / Z.A. Fayad., V. Mani, M. Woodward, D. Kallend, M. Abt, T. Burgess, V. Fuster, C.M. Ballantyne, E.A. Stein, J.-C. Tardif, J.H.F. Rudd, M.E. Farkouh, A. Tawakol // *Lancet*. – 2011. – Vol.378, № 9802. – P. 1547-1559.
24. Klop, B. A physician's guide for the management of hypertriglyceridemia: the etiology of hypertriglyceridemia determines treatment strategy / B. Klop, J. Wouter Jukema, T.J. Rabelink, M. Castro Cabezas // *Panminerva Medica*. – 2012. – Vol.54, № 2. – P. 91-103.
25. Карпов, Ю.А. Место фенофибрата в профилактике и лечении атеросклероза: современное состояние вопроса / Ю.А. Карпов, Е.В. Сорокин // *Атмосфера. Новости кардиологии*. – 2015. – №3. – С. 24-29.
26. Stawowy, P. Inhibition of PCSK9: a novel approach for the treatment of dyslipidemia. / P. Stawowy, I.A. Just, E. Kaschina // *Coronary Artery Disease*. – 2014. – Vol.25, № 4. – P. 353-359.

27. McKenney, J.M. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. / J.M. McKenney, M.J. Koren, D.J. Kereiakes, C. Hanotin, A.-C. Ferrand, E.A. Stein // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2012. – Vol.59, № 25. – P. 2344-2353.
28. Shiau, Y.F. Bile Salt Binding Properties of Commonly Used Gastrointestinal Drugs: Maalox, Carafate, and Questran / Y.F. Shiau, J.P. Schenkein, H.J. Liu, M.R. Khouri, J.B. Watkins // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.77, № 6. – P.527-530.
29. Kamal-Bahl, S.J. Discontinuation of lipid modifying drugs among commercially insured United States patients in recent clinical practice / S.J. Kamal-Bahl, T. Burke, D. Watson, C. Wentworth // *American Journal of Cardiology*. – 2007. – Vol.99, № 4. – P.530-534.
30. Ramachandran, A. Manisenthilkumar Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats / A. Ramachandran, Rajasekaran, K. *Asian Pac. // J. Trop. Biomed.* – 2012. Vol. 2. – P. 262-268.
31. Close, K.G. Masood β -Cell protective efficacy, hypoglycemic and hypolipidemic effects of extracts of *Achillea millifolium* in diabetic rats / K.G. Close, B.A. Mustafa, S. Ganai, M.Y. Akbar, A. Dar // *Chinese J. Nat. Med.* – 2012. – Vol.10, №3. – P. 185-189.
32. Гюльбякова, Х.Н. Разработка технологии и исследование жидкого экстракта бузины черной (*Sambucus nigra* L.) / Х.Н. Гюльбякова // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2014. – № 3 (49). – С. 51-52.
33. Tang, Z. Hypolipidemic and antioxidant properties of a polysaccharide fraction from *Enteromorpha prolifera* / Z. Tang, H. Gao, S. Wang, S. Wen, S. Qin // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – Vol. 58. – P. 186-189
34. Zha, X.-Q. Polysaccharides in *Laminaria japonica* (LP): extraction, physicochemical properties and their hypolipidemic activities in diet-induced mouse model of atherosclerosis // X.-Q. Zha, J.-J. Xiao, H.-N. Zhang, J.-H. Wang, L.-H. Pan, X.-F. Yang, J.-P. Luo // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 134. – P. 244-252.

35. Cox, P.A. The ethnobotanical approach to drug discovery / P.A. Cox, M.J. Balick // *Sci Am.* – 1994. – Vol. 270, №6. – P. 82-7.
36. Hipsley, E. H. Dietary “fibre” and pregnancy toxæmia. / E. H. Hipsley // *Brit. Med.* – 1953. – Vol. 2. – P. 420.
37. Trowell, H. C. Dietary fiber redefined / H. C. Trowell, D. Southgate, T. M. S. Wolever, A. R. Leeds, M. A. Gassull, D. J. Jenkins // *A. Lancet.* – 1976. – Vol. 967. – P.76-79.
38. Brown, L. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis / L. Brown, B. Rosner, W.W. Willett, F.M. Sacks // *Am J Clin Nutr.* – 1999. – Vol. 69. №1. – P. 30-42.
39. Surampudi, P. Lipid Lowering with Soluble Dietary Fiber / B. Enkhmaa, E. Anuurad, L. Berglund // *Curr Atheroscler Rep.* – 2016.- Vol. 18, № 12. – P.75.
40. Gibson, G.R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics / G.R. Gibson, M.B. Roberfroid // *J. Nutr.* – 1995. – Vol. 125. – P.1401–1412.
41. Roberfroid, M. Prebiotics: The concept revisited. / M. Roberfroid // *Am. Soc. Nutr.* – 2007. – Vol. 137. – P. 830S–837S.
42. Gibson, G.R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics / G.R. Gibson, H.M. Probert, J.V. Loo, R.A. Rastall, M.B. Roberfroid // *Nutr. Res. Rev.* – 2004. – Vol. 17. – P. 259–275.
43. Dongowski, G. Intestinal steroids in rats are influenced by the structural parameters of pectin / G. Dongowski, A. Lorenz J. // *Nutr. Biochem.* – 2004. – Vol. 15. – P. 196-205.
44. Causey, J.L Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal, environment in hypercholesterolemic men / J.L. Causey, J.M. Feirtag, D.D. Gallaher, B.C. Tunland, J.L. Slavin // *Nutr. Res.* – 2000. – Vol. 20. – P.191–201.
45. Malik, P. Zymosanmediated inflammation impairs in vivo reverse cholesterol transport / P. Malik, S.Z. Berisha, J. Santore, C. Agatista-Boyle, G. Brubaker, J.D. Smith // *J. Lipid Res.* – 2011. – Vol. 52, № 5. – P.951-957.
46. Korolenko, T.A. Influence of atorvastatin and carboxymethylated glucanm on the serum lipoprotein profile and MMP activity of mice with lipemia induced by poloxamer

- 407 / T.A. Korolenko, F.V. Tuzikov, M.S. Cherkanova, T.P. Johnston, N.A. Tuzikova, V.M. Loginova, E.E. Filjushina, V.I. Kaledin // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 90, №2. – P. 141-153
47. Napolitano, M. Role of macrophage activation in the lipid metabolism of postprandial triacylglycerol-rich lipoproteins / M. Napolitano, S. Sennato, K.M. Botham, F. Bordi, E. Bravo // *Exp. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 238, №1. – P. 98-110.
48. Matthijsen, R.A. Macrophage-specific expression of mannose-binding lectin controls atherosclerosis in low-density-lipoprotein receptor-deficient mice / R.A. Matthijsen, M.P. de Winther, D. Kuipers, I. van der Made, C. Weber, M.V. Herias, M.J. Gijbels, W.A. Buurman // *Circulation.* – 2009. – Vol. 119. – P. 2188-2195.
49. Vuksan, V. Beneficial effects of viscous dietary fiber from konjac-mannan in subjects with the insulin resistance syndrome / V. Vuksan, J.L. Sievenpiper, R. Owen, J.A. Swilley, P. Spadafora, D.J. Jenkins, E. Vidgen, F. Brighenti, R.G. Josse, L.A. Leiter, Z. Xu, R. Novokmet // *Diabetes Care.* – 2000. – Vol. 23. – P. 9-14.
50. Lakshmanan, M.R. Stimulation of insulin of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis activity. / M.R. Lakshmanan, C.M. Nepokroeff, G.C. Ness, R.E. Dugan, J.W. Porter // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. – Vol. 50. – P. 704-710.
51. Caffall, K.H. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. / K.H. Caffall, D. Mohnen // *Carbohydr. Res.* – 2009. – Vol. 344. - P. 1879-1900.
52. Voragen, A.G. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. / A.G. Voragen, G.J. Coenen, R.P. Verhoef, H.A. Schols // *Struct. Chem.* – 2009. – Vol. 20. – P. 263-275.
53. Novosel'skaya, I. L. Trends in the science and applications of pectins. / I. L. Novosel'skaya, N. L. Voropaeva, L. N. Semenova, S. Sh. Rashidova // *Chemistry of Natural Compounds* January. – 2000. Vol. 36, №1. – P. 1–10.
54. Willats, W.G. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. / W.G. Willats, J.P. Knox, J.D. Mikkelsen // *Trends Food Sci. Technol.* – 2006. – Vol. 17. – P. 97-104.

55. Sudheesh, S. Lipid-lowering action of pectin from *Cucumis sativus*. / S. Sudheesh, N.R. Vijayalakshmi // *Food Chem.* – 1999. - Vol. 67. – P. 281-286.
56. Snchez, D. Highly methoxylated pectin improves insulin resistance and other cardiometabolic risk factors in Zucker fatty rats. / D. Snchez, B. Muguerza, L. Moulay, R. Hernandez, M. Miguel // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – Vol. 56. – P. 3574-3581.
57. Marounek, M. Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. / M. Marounek, Z. Volek, A. Synytsya, J. Copikova // *Physiol. Res.* – 2007. – Vol. 56. – P. 433-442.
58. Koseki, M. Effects of gum arabic and pectin on the emulsification, the lipase reaction, and the plasma cholesterol level in rats. / M. Koseki, K. Tsuji, Y. Nakagawa, M. Kawamura, T. Ichikawa, M. Kazama, M. Kitabatake // *Agric. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 53. – P. 3127-3132.
59. Dongowski, G. Intestinal steroids in rats are influenced by the structural parameters of pectin. / G. Dongowski, A. Lorenz // *J. Nutr. Biochem.* – 2004. – Vol. 15. – P. 196-205.
60. Feng, Z. Modified soluble dietary fiber from black bean coats with its rheological and bile acid binding properties / Z. Feng, W. Dou, S. Alaxi, Y. Niu, L. Yu // *Food Hydrocolloids.* – 2017. – Vol. 62. – P. 94-101.
61. Куркин, В.А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических вузов факультетов / В.А. Куркин. – Самара, 2007. – 1239 с.
62. Chang, Q. Hawthorn. / Q. Chang, Z. Zuo, F. Harrison, M. Chow // *The Journal of Clinical Pharmacology.* – 2002. – Vol. 42, №6. – P. 605–612.
63. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина. - Самара: ООО «Офорт», ЕБОУ ВПО СамЕМУ Минздравсоцразвития России, 2012. - 290 с.
64. Куркин, В.А. Диуретическая и антидепрессантная активность густого экстракта боярышника кроваво-красного / В.А. Куркин, А.В. Куркина, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева, Т.В. Морозова // *Бюллетень сибирской медицины.* - 2015. - Т. 14, № 3. - С. 18-22.
65. Юшкова, Е.И. Зависимость антиоксидантной активности плодов боярышника обыкновенного (*Crataegus rhipidofilla*) от сроков хранения. / Е.И. Юшкова, Н.И.

- Ярован, Н.Н. Полехина // Тенденции развития науки и образования. - 2017. - № 28-2. - С. 41-43.
66. Базитова, А.А. Изучение антидепрессантной активности препаратов боярышника кроваво-красного / А.А. Базитова, И.В. Устюжанина // Сборник материалов «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» XI Всероссийская (85-я Итоговая) студенческая научная конференция СНО с международным участием. –Самара, 2017. – С. 39-40.
67. Хасанова, С.Р. Влияние листьев боярышника кроваво-красного на биологическую активность растительных сборов / С.Р. Хасанова, А.П. Потанина, Н.В. Кудашкина // Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине». – Москва, 2016. – С. 540-542
68. Трофимова, С.В. Изучение антиаритмической активности листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, Н.Ж. Басченко, Т.А. Сапожникова, Р.Ю. Хисамутдинова // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Том 6, № 2. – С. 299-302.
69. Витковский, Г.В. Урожайность многолетних бобовых трав на дерновоподзолистых почвах в западном регионе республики Беларусь. / Г.В. Витковский, В.И. Поплевко, В.Н. Алексеев, А.А. Козлов // Земледелие и селекция в Беларуси. – 2018. – № 54. – С. 215-221.
70. Кароматов, И. Д. Люцерна перспективное лекарственное растение / И.Д. Кароматов, Х.Б. Ибатов, М.К.У. Амонов // Биология и интегративная медицина. – 2017. – №4. – С. 196-203.
71. Молоковский, Д.С. Фармакологическая активность отвара листьев березы бородавчатой *Betula pendula* Roth / Д.С. Молоковский, Г.И. Дьячук // Российский биомедицинский журнал – 2006. – Т. 7. – С. 73 -93.
72. Куцик, Р.В. Береза бородавчатая (Береза повислая). / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук // Провизор. – 2001. – № 10. – С. 17-20

73. Стеняева, В. В. Сравнительное фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.) : диссертация ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Стеняева Виктория Викторовна. – Самара, 2005. – 128 с.
74. Васильцова, И.В. Коррекция биохимического статуса крыс растительными экстрактами. / И.В. Васильцова, Т.И. Бокова // Инновации и продовольственная безопасность. – 2016. – № 4 (14). – С. 15-19.
75. Кучеров Е.В., Лазарева Д.Н. Целебные растения и их применение. - Уфа, 1993. – 288 с.
76. Куркин, В. А. Исследования по разработке методики стандартизации листьев боярышника кроваво-красного / В. А. Куркин, Т. В. Морозова, О. Е. Правдивцева // Химия растительного сырья. – 2017. – №3. – С. 169-173.
77. Wang, T. Regulation effects of *Crataegus pinnatifida* leaf on glucose and lipids metabolism. / T. Wang T., Y. An, C. Zhao, L. Han, M. Boakye-Yiadom, W. Wang, Y. Zhang // J Agric Food Chem. – 2011. – Vol. 59, №9. – P. 4987-94.
78. Abdulrahim, J. Effects of Hawthorn on HbA1C and lipids levels in Jordanian diabetic patients (Type2). / A. J. Abdulrahim, M. Al-Shawabkeh. // Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. – 2017. – Vol. 10, №2. – P. 822-825.
79. Жуковский, П.М. Культурные растения и их сородичи. Л.: Колос, 1971. – 752 с.
80. Гатаулина, Г.Г. Растениеводство: учебник / Г.Г. Гатаулина, П.Д. Бугаев, В.Е. Долгодворов; под ред. Г.Г. Гатаулиной. – М.: ИНФРА-М, 2018. – 608 с
81. Yanaura, S. Effect of alfalfa meal on experimental hyperlipidemia. / S. Yanaura, M. Sakamoto // Nippon Yakurigaku Zasshi. – 1975. – Vol. 71, №5. – P. 387-393.
82. Dal Bosco, A. Effect of dietary alfalfa on the fatty acid composition and indexes of lipid metabolism of rabbit meat. / A. Dal Bosco, C. Mugnai, V. Roscini, S. Mattioli, S. Ruggeri, C. Castellini. // Meat Science. – 2014. – Vol. 96. – P. 606–609.
83. Ужегов, Г. Н. Лечебное питание при различных заболеваниях. / Г. Н. Ужегов. – М. : Эксмо, 2015. – 126 с.
84. Маркова, А. В. Травник: золотые рецепты народной медицины / А. В. Маркова. — М.: Эксмо; Форум, 2007. — 928 с.

85. Погожева, А. В. Препарат люцерны как антиатеросклеротическое средство для лечения сердечно-сосудистой патологии / А. В. Погожева, Н. В. Аныкина, Т. Г. Давыдова. // Лечащий врач выпуск. – 2011. - №5. – С. 90-94.
86. Liu, J. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. / J. Liu, S. Willför, C. Xu // *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. – 2015. – Vol. 5, №1. – P. 31–61.
87. Hong-chang, L. W. Body phase study of polysaccharide extraction process. Purple Salvia / L. W. Hong-chang // *Taishan Medical College*. – 2007. – Vol. 28. – P. 251–252.
88. Sevag, M. G. Deproteinization and removal of capsular polysaccharides / M. G. Sevag // *Biochem. Z.* – 1934. – Vol. 273. – P. 419-423.
89. Sanz, M. L. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates / M. L. Sanz, I. Martinez-Castro // *J. Chromatography*. – 2007. – Vol. 1153. – P. 74-89.
90. Sun, H. Fractionation of polysaccharides from rapeseed by ultrafiltration: Effect of molecular pore size and operation conditions on the membrane performance / H. Sun, D. Qi, J. Xu, S. Juan, C. Zhe. // *Separation and Purification Technology*. – 2011. – Vol. 80, № 3. – P. 670-676.
91. Xie, J. H. Separation of water-soluble polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* by ultrafiltration process / J. H. Xie, M.-Y. Shen, S.-P. Nie, Q. Zhao, M.-Y. Xie // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. - Vol. 101. – P. 479-483.
92. Brochu, M. Isolation and characterization of major polysaccharides from maple sugar. / M. Brochu, C.-P. Lafrance, E. Landry, M. Maheux. // *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. – 2019. – Vol. 17. – P. 100-104.
93. Liu, H.L. Structure characteristics of an acidic polysaccharide purified from banana (*Musa nana* Lour.) pulp and its enzymatic degradation / H.L. Liu, Y.M. Jiang, H.S. Yang, B. Yang // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 101. – P. 299-303.
94. Chaves, P. F. Chemical characterization of fructooligosaccharides, inulin and structurally diverse polysaccharides from chamomile tea. / P. F. Chaves, M. Iacomini, L. M. C. Cordeiro. // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 214. – P. 269-275.

95. Heaney-Kieras, J. The Covalent Linkage of Protein to Carbohydrate in the Extracellular ProteinPolysaccharide from the Red Alga *Porphyridium cruentum* / J. Heaney-Kieras, L. Rodent, D. J. Chapman // *Biochem. J.* – 1977. – Vol. 165. – P. 1-9.
96. Kirby, A.R. Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. / Kirby A.R., MacDougall A.J., Morris V.J. // *Carbohydr. Polym.* – 2008. – Vol. 71. – P. 640–647.
97. Пономарева, С.А. Сравнительный анализ спектрофотометрических методик определения массовой доли белка в образцах пектиновых полисахаридов. / С.А. Пономарева, В.В. Головченко, О.А. Патова, Е.В. Ванчикова, Ю.С. Оводов // *Биоорганическая химия.* – 2015. – Т. 41, № 2. – С. 154.
98. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 19. – P. 265–275.
99. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254
100. Бубенчикова, В.Н. Разработка методики количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой. / В.Н. Бубенчикова, И.В. Степнова, М.С. Шкабунова // *Фармация.* – 2018. – Т. 67, № 5. – С. 19-23.
101. Муравьев, А.А. Растворимость хитина и хитозана в ионных жидкостях разного строения. / А.А. Муравьев, А.М. Бочек, Н.П. Новоселов, В.А. Петрова // *Известия высших учебных заведений. Технология легкой промышленности.* – 2012. – Т. 17, № 3. – С.67-71.
102. Koehler, L. H. Differentiation of Carbohydrates by Anthrone Reaction Rate and Color Intensity. / L. H. Koehler. // *Anal. Chem.* – 1952. – Vol. 24. – P. 1576-1579.
103. Тринеева, О. В. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной. / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин. // *Вестник ВГУ, Серия: химия. биология. Фармация.* – 2017. – № 1. – С. 164-169.
104. Dreywood, R. Qualitative test for carbohydrate material. / R. Dreywood // *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition.* – 1946. – Vol. 18. – P. 499.

105. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith. // *Analytical Chemistry*. – 1956. – Vol. 28. – P. 350-356.
106. Zhang, Y.-Y. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in green tea. / Y.-Y. Zhang, B. Zhang. // *Food. Sci.* – 2016. – Vol. 37. – P. 158-163.
107. Saha, S. K. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol–sulfuric acid method / S. K. Saha, C. F. Brewer // *Carbohydr. Res.* – 1994. – Vol. 254. – P. 157- 167.
108. Aman, P. Cell wall polysaccharides: Structural, chemical, and analytical aspects. / P. Aman, E. Westerlund. // *Carbohydrates in Food*. – 1996. – Vol.4. – P. 191-226.
109. Scott, R.L. Colorimetric determination of Hexuronic acids in plant materials. / R.L. Scott // *Analytical Chemistry*. – 1979. – Vol. 51. – P. 936-941.
110. Bitter, T. A modified uronic acid carbazole reaction. / T. Bitter, H.M. Muir // *Analytical Biochemistry*. – 1962. – Vol. 4. – P. 330-334.
111. Yapo, B.M. On the colorimetric-sulfuric acid analysis of uronic acids in food materials: Potential sources of discrepancies in data and how to circumvent them. / B.M. Yapo // *Food Analytical Methods*. – 2012. – Vol. 5. – P. 195-215.
112. Filisetti-Cozzi, T.M. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. / T.M. Filisetti-Cozzi, N.C. Carpita // *Anal Biochem.* – 1991. – Vol. 197, №1. – P. 157-62.
113. Larre-Larrouy, M.C. Determination of carbohydrates in two ferrallitic soils: Analysis by capillary gas chromatography after derivatization by silylation. / M.C. Larre-Larrouy, C. Feller // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1997. – Vol. 2. – P. 1585-1589.
114. Wikiera, A. Development of complete hydrolysis of pectins from apple pomace. / A. Wikiera, M. Mika, A. Starzynska-Janiszewska, B. Stodolak // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 172. – P. 675-680.
115. Willför, S. Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides – a comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. / Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J.,

- Laine C., Suurnäkki A., Saake B., Uotila K., Simolin H., Hemming J., Holmbom B. // *Ind. Crops Prod.* – 2009. – Vol. 29. – P. 571-580.
116. Markely, L.R.A. A high-throughput method for quantification of glycoprotein sialylation. / Markely L.R.A., Ong B.T., Hoi K.M., Teo G., Lu M.Y., Wang D.I. // *Anal. Biochem.* – 2010. – Vol. 407. – P. 128-133.
117. Bertaud, F. Evaluation of acid methanolysis for analysis of wood hemicelluloses and pectins. / F. Bertaud, A. Sundberg, B. Holmbom // *Carbohydrate Polymers.* – 2002. – Vol. 48. – P. 319-324.
118. De Ruiter, G.A. Carbohydrate analysis of water-soluble uranic acid-containing polysaccharides with high-performance chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. / G.A. De Ruiter, H.A. Schols, A.G.J. Voragen, F.M. Rombouts // *Analytical Biochemistry.* – 1992. – Vol. 185. – P. 176-185.
119. Saeman, J.F. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. // J.F. Saeman, W.E. Moore, R.L. Mitchell, M. Millet // *Tappi.* – 1954. – Vol. 37. – P. 336-343.
120. Wang, Q. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. / Q. Wang, Y. Fang // *Journal of Chromatography B.* – 2004. – Vol. 812. – P. 309–324.
121. Corsaro, A. Microwave-assisted Chemistry of Carbohydrates. / A. Corsaro, U. Chiacchio, V. Pistara, G. Romeo // *Current Organic Chemistry.* - 2004. – Vol. 8, №6. – P. 511–538.
122. Boual, Z. Partial Characterization and Hydrolysis Procedure of Water Soluble Polysaccharides Extracted from Onesaharian Medicinal Plant: *Malva aegyptiaca* L. / Z. Boual, A. Kemassi, A. O. El Hadj Khelil, P. Michaud, M. Didi. // *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 2. – P.420-424.
123. Dammak, M. I. Characterization of polysaccharides from *Prunus amygdalus* peels: Antioxidant and antiproliferative activities. / M. I. Dammak, I. Chakroun, Z. Mzoughi, S. Amamou, H. Majdoub // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2018. – Vol. 119. – P. 198-206.

124. Tang, M. Purification, characterization and tyrosinase inhibition activity of polysaccharides from chestnut (*Castanea mollissima* Bl.). / M. Tang, F. Hou, Y. Wu, Y. Liu, J. Ouyang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 131. – P. 309-314.
125. Khramova, D.S. Chemical composition and immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from the ground thistle *Cirsium esculentum* Siev. / D.S. Khramova, V.V. Golovchenko, A.S. Shashkov, D. Otgonbayar, A. Chimidsogzol, Yu.S. Ovodov // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 126. – P. 870-877.
126. Chen, Y.-C. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides. / Y.-C. Chen, Y.-J. Wu, C.-Y. Hu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 133. – P. 575-582.
127. Wang, W.T. Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast-atom bombardment-mass spectrometry, and exoglycosidase digestion. / W.T. Wang, N.C. LeDonne Jr., B. Ackerman, C.C. Sweeley // Anal Biochem. – 1984. – Vol. 141. – P. 366-381.
128. Suzuki, J. Analysis by high-performance anion-exchange chromatography of component sugars as their fluorescent pyridylamino derivatives. / J. Suzuki, A. Kondo, I. Kato, S. Hase, T. Ikenaka // Agric Biol Chem. – 1991. – Vol. 55. – P. 283-284.
129. Koizumi, K. High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns. / K. Koizumi // Journal of Chromatography A. – 1996. – Vol. 720. - P. 119-126.
130. Fu, Q. Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography. / Q. Fu, T. Liang, Z. Li, X. Xu, Y. Ke, Y. Jin // Carbohydrate Research. – 2013. – Vol. 379. – P.13-17.
131. Košťálová, Z. Structural characterisation of polysaccharides from roasted hazelnut skins. / Z. Košťálová, Z. Hromádková // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 286. – P. 179-184.
132. Rocklin, R.D. Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. / R.D. Rocklin, C.A. Pohl // J. Liq. Chromatogr. – 1983. – Vol. 6. – P. 1577-1590.

133. Hammad, L.A. Multiple-reaction monitoring liquid chromatography mass spectrometry for monosaccharide compositional analysis of glycoproteins. / L.A. Hammad, M.M. Saleh, M.V. Novotny, Y. Mechref // *Journal of American Society for Mass Spectrometry*. – 2009. – Vol. 20. – P. 1224-1234.
134. Hutchinson, J.P. Investigation of polar organic solvents compatible with Corona charged aerosol detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. / J.P. Hutchinson, T. Remenyi, P. Nesterenko, W. Farrell, E. Groeber, R. Szucs, G. Dicinoski, P.R. Haddad // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 750. – P. 199-206.
135. Lopes, J.F. Simultaneous chromatographic separation of enantiomers, anomers and structural isomers of some biologically relevant monosaccharides. / J.F. Lopes, E.M.S.M. Gaspar // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – Vol. 1188. – P. 34-42.
136. Townsend, R.R. High-performance anionexchange chromatography of oligosaccharides using pellicular resins and pulsed amperometric detection. / R.R. Townsend, M.R. Hardy, O. Hindsgaul, Y.C. Lee // *Anal. Biochem.* – 1988. – Vol. 174. – P. 459-470.
137. Smith, K.D. Structural elucidation of the N-linked oligosaccharides of glycoproteins using high pH anionexchange chromatography, in: R.J. Sturgeon (Ed.), K.D. Smith, E.F. Hounsell, J.M. McGuire, M.A. Elliott, H.G. // *Elliott Advances in Macromolecular Carbohydrate Research*. – 1997. – Vol. 1. – P. 65-91.
138. Chen, J. Optimized hydrolysis and analysis of Radix Asparagi polysaccharide monosaccharide composition by capillary zone electrophoresis. / J. Chen, F. Yang, H. Guo, F. Wu, X. Wang // *Journal of Separation Science*. – 2015. – Vol. 38. – P. 2327-2331.
139. Wang, Q. Determination of the compositions of polysaccharides from Chinese herbs by capillary zone electrophoresis with amperometric detection / Q. Wang, F. Ding, N. Zhu et al. // *Biomed. Chromatogr.* – 2003. – Vol. 17. – P. 483-488.
140. Goubet, F. An investigation of pectin methylesterification patterns by two independent methods: capillary electrophoresis and polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis / F. Goubet // *Carbohydr. Res.* – 2005. – Vol. 340. – P. 1193-1199.

141. Zhang, J. A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats. / J. Zhang, W. Zhang, B. Mamadouba, W. Xia // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2012. – Vol. 51, № 4. – P. 504-508.
142. Хабаров, В.Н. Значение параметра молекулярной массы гиалуроновой кислоты в препаратах для эстетической медицины. / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойков, Н.А. Чиждова, М.А. Селянин, Н.П. Михайлова // *Вестник эстетической медицины*. – 2009. – №8 (4). – С. 16-22.
143. Salemis, Ph. Molecular weight-viscosity relationship for amylopectin, a highly branched polymer. / Ph. Salemis, M. Rinaudo // *Polymer Bulletin*. – 1984. – Vol. 12, № 4. – P. 283–285.
144. Hartmann, G. Isolation and chemical characterisation of waterextractable arabinoxylans from wheat and rye during breadmaking / G. Hartmann, M. Piber, P. Koehler// *Eur. Food Res. Technol.* – 2005. - Vol. 221. – P. 487-492.
145. Lee, Y.R. Retention of Large Biological Molecules by Size-Exclusion Chromatography / Y.R. Lee, X. Li, W. Ma, K.H. Row // *Chromatography Analytical Letters*. – 2017. – Vol.50, №6. – P. 905-915.
146. Panzade, P. Development and validation of method for molecular weight determination of cellulose using GPC column in HPLC. / P. Panzade, N. Satish // *International Journal of Advanced Research*. – 2016. - Vol.4. – P. 516-530.
147. Leathers, T.D. Reduced-molecular-weight derivatives of frost grape polysaccharide / T.D. Leathers, P.J.P. Neil, F.V. Steven, M.S. Nunnally // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol.105. – P. 1166-1170.
148. André, M. Striege Viscometric Detection in Size-Exclusion Chromatography: Principles and Select Applications. / M. André // *Chromatographia*. – 2016. – Vol.79. – P. 945–960.
149. Cavanagh, J. Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice (Second Edition). / J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer, N.J. Skelton, M. Rance // Academic Press, San Diego, CA, USA, 2006. – 912 p.

150. Bush, C.A. High resolution NMR in the determination of structure in complex carbohydrates/ C.A. Bush // Bull. Magn. Resonance. – 1988. - Vol.10. – P. 73–95.
151. Duus, J.O. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. / J.O. Duus, C.H. Gotfredsen, K. Bock // Chem. Rev. – 2000. - Vol. 100. – P. 4589–4614.
152. Грачев, А. А. Применение современных методов спектроскопии ЯМР для конформационного анализа олиго- и полисахаридов / А. А. Грачев, А. Г. Гербст, А. С. Шашков, Н. Э. Нифантьев // Усп. хим. – 2009. – №78. – С. 776–795.
153. Prade, R.A. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions / R.A Prade, D. Zhan, P. Ayoubi, A.J. Mort // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. – 1999. - Vol.16. – P. 361-391.
154. Nakamori, S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide / S. Nakamori // The Journal of Biochemistry. – 1964. – Vol.55. – P. 205-208.
155. York, W.S. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall component / W.S. York, A.G. Darvill, M. McNeil, T.T. Stevenson, P. Albersheim // Methods in Enzymology. – 1986. – Vol.118. – P. 3-40.
156. Falshaw, R. Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta) / R. Falshaw, R.H. Furneaux // Carbohydrate Research. – 1994. – Vol.252. – P. 171-182.
157. Данилец М.Г. 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., Кривошеков С.В. патент на изобретение RUS 2657819 27.01.2017
158. 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.
159. Спири́н, А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спири́н // Биохимия. – 1958. – Т. 23, № 5. – С. 656-662.

160. Usov, A. I. Polysaccharides of algae.48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: Isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. / A.I. Usov, M.I. Bilan, N.G. Klochkova // *Botanica Marina*. – 1995. – Vol.38. – P. 43–51.
161. 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.
162. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose / N. Nelson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1944. – Vol.153. – P. 375-380.
163. Wood, P. J. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity / P.J. Wood, I.R. Siddiqui // *Analytical Biochemistry*. – 1971. - Vol.39. – P. 418-423.
164. Diet-induce atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models [Электронный ресурс]. — 2008. — Режим доступа: <http://www.researchdiets.com/product-literature>
165. Haglund, O. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E / O. Haglund, R. Luostarinen, R. Wallin // *J. Nutr.* – 1991. – Vol. 121. – P.165-169.
166. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер – М.:Медицина, 1978. –193 с.
167. Миронова А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Миронова А. Н. — М.: Гриф и К, 2013. – 944 с.
168. Ровкина, К.И. Скрининг гиполипидемической 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.
169. Xin-Hua, Z. Hypolipidemic effect of the polysaccharides extracted from pumpkin by cellulase-assisted method on mice / Z. Xin-Hua, Q. Li, Q. De-Lu // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – Vol. 64. – P. 137-138.
170. Ровкина, К.И. Разработка методики получения полисахаридов из листьев березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) / К.И. Ровкина,

- С.В Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов // Химия растительного сырья. – 2019. – №3. – С.23-31
171. Rovkina, K. I. Water-Soluble polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of flora of Krasnoyarsk krai / K.I. Rovkina, S.V. Krivoshchekov, A.M. Guryev, M.S. Yusubov, M.V. Belousov // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2018. – Vol. 44, No. 7. – P. 854.
172. Красочко П.А. Характеристика ИК-спектров адъювантов на основе полисахаридов растительного происхождения / П.А Красочко., Ф.Н. Капуцкий, И.А. Красочко, О.В.Зубец, Т.А. Аладьева // Ученые Записки УО ВГАВМ. – 2012. – Т.48, №2. – С. 84-87.
173. Сальникова Е.Н. Химическое исследование флавоноидов полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), п. Сиверса (*A. Sieversiana* Wlld.) и п. Якутской (*A. Jacutica* Drob.) / Е.Н. Сальникова, Г.И. Калинкина, С.Е. Дмитрук // Химия растительного сырья. – 2001. – №3. – С. 71-78.
174. Оленников Д.Н. Разработка технологии получения сухого экстракта какалии копьевидной / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева, Г.Г. Николаева // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 53–58.
175. Mingdong, H.U. Extraction of polysaccharides from *Fomes officinalis* Ames and their antitumor activity / H.U. Mingdong, Z. Huifeng, F. Bo, L. Ke, G. Shuying // Exp Ther Med. – 2013. – Vol.6, №2. – P. 451-454.
176. Domozych, D.S. Pectin Metabolism and Assembly in the Cell Wall of the Charophyte Green Alga *Penium margaritaceum* / D.S. Domozych, I. Sørensen, Z.A. Popper, J. Ochs, A. Andreas, J.U. Fangel, A. Pielach, C. Sacks, H. Brechka, P. Ruisi-Besares, W.G.T. Willats, J.K.C. Rose // Plant. – 2014. – Vol.165, №1. – P. 105-118.
177. Beda, M. Biochemical Characteristics and Gelling Capacity of Pectin from Yellow Passion Fruit Rind as Affected by Acid Extractant Nature / M. Beda, J. Yapo, B. Agric // Food Chem. – 2009. – Vol.57. – P. 1572-1578.
178. Ale, M.T. Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from *Sargassum* sp. / M.T Ale, J.D. Mikkelsen, A.S. Meyer // Appl Phycol. – 2012. – Vol. 24. – P. 715-723.

179. Liang, T. Structural characterization of Astragalus polysaccharides using partial acid hydrolysis-hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry / T. Liang, Q. Fu, H. Xin, F. Li, Y. Jin, X. Liang // *Se Pu*. – 2014. - Vol.32, №12. – P.1306-1312.
180. Saito, H. Structure of Succinoglucan: Fragmentation by Partial Acid Hydrolysis / H. Saito, A. Misaki, T. Harada // *Journal Agricultural and Biological Chemistry*. – 1970. – Vol.34, №11. – P. 1683-1689.
181. Renard, C.M. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp / C.M. Renard, M. Lahaye, M. Mutter, F.G. Voragen, J. Thibault // *Carbohydr. Res.* – 1998. – Vol.305. – P. 271-280.
182. do Nascimento, G.E. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity / G.E. do Nascimento, C.R. Corso, M.F. Paula Werner, C.H. Baggio, M. Iacomini, L.M.C. Cordeiro // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol.116. – P. 300-306.
183. Polle, A.Y. Structure of Tanacetan, a pectic polysaccharide from tansy *Tanacetum vulgare* L. / A.Y. Polle, R.G. Ovodova, A.O. Chizhov, A.S. Shashkov, Y.S. Ovodov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2002. – Vol.67. – P. 1371-1376.
184. Ovodova, R.G. Structure and physiological activity of lemnan, *Lemna minor* L. pectin / R.G. Ovodova, V.V. Golovchenko, A.S. Shashkov, S.V. Popov, Y.S. Ovodov // *Bioorg. Khim. (Rus.)*. – 2000. – Vol.26. – P. 743-751.
185. Colquhoun, I.A. Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase / I.A. Colquhoun, G.A. de Rooter, H.A. Schols, A.G.J. Voragen // *Carbohydrate Research*. – 1990. – Vol.206. – P. 131-144.
186. Close, C.M. Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp / C.M. Close, G.C. Renard, M. Lahaye, M. Mutter, F.G.J. Voragen, J-F. Thibault // *Carbohydrate Research*. – 1998. – Vol.305. – P. 271-280.
187. Panda, B.C. Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): Structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant

- properties / B.C. Panda, S. Mondal, K.S.P. Devi, T.K. Maiti, S. Khatua, K. Acharya // *Carbohydrate Research*. – 2015. – Vol.401. – P. 24-31.
188. Popov, S.V. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium / S.V. Popov, R.G. Ovodova, V.V. Golovchenko, G.Y. Popova, F.V. Viatyasev, A.S. Shashkov, Y.S. Ovodov // *Food Chem*. – 2011. – Vol.124. – P. 309-315.
189. Westereng, B. Effects of extraction conditions on the chemical structure and biological activity of white cabbage pectin / B. Westereng, T.E. Michaelsen, A.B. Samuelsen, S.H. Knutsen // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – Vol.72. – P. 32-42.
190. Tamaki, Y. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa* / Tamaki Y., Konishi T., Fukuta M., Tako M. // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol.107. – P. 352-361.
191. Ralet, M.-C. Thibault Mapping sugar beet pectin acetylation pattern / M.-C. Ralet, J.C. Cabrera, E. Bonnin, B. Quémener, P. Hellin, J.-F. Thibault // *Phytochemistry*. – 2005. – Vol.66. – P. 1832-1843.
192. Lerouge, P. Albersheim Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan / P. Lerouge, M.A. O'Neill, A.G. Darvill, P. Albersheim // *Carbohydr. Res*. – 1993. – Vol.243. – P. 359-371.
193. Keenan, M.H.J. A ^{13}C -n.m.r. study of sugar-beet pectin / M.H.J. Keenan, P.S. Belton, J.A. Mathew, S.J. Howson // *Carbohydrate Research*. – 1985. – Vol.138. – P. 168-170.
194. Nagasawa, K. Reaction between carbohydrates and sulfuric acid: Part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid / K. Nagasawa // *J. Carbohydrate Research*. – 1971. – Vol. 18, №1. – P. 95-102.
195. Ровкина, К.И. Разработка методики количественного определения полисахаридов листьев березы / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, Е.А. Безверхняя, М.В. Белоусов // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2019. – Том 14, № 1 (79). – С.47-50
196. Bailey, R. W. The reaction of pentoses with anthrone / R. W. Bailey // *Biochem. J*. – 1958. – Vol. 68, №4. – P. 669-672.

197. Sondergaard, G. Micro-method for determination of blood galactose by means of glucose oxidase (notatin) and anthrone / G. Sondergaard // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1958. – Vol.10, №2. – P. 203-210.
198. Ровкина, К.И. Валидация методики количественного определения полисахаридов листьев березы / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов// Медицинский вестник Башкортостана. – 2019. – Том 14, № 2 (80). – С. 48-51.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

Проект нормативной документации

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

ЦЕНТР ВНЕДРЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЙ

Сибирского Государственного Медицинского Университета

«Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана»

НД 42-_____

вводится впервые

Срок введения установлен

с «__» _____ 20__ г.

Срок действия установлен

до «__» _____ 20__ г.

Настоящая нормативная документация распространяется на фармацевтическую субстанцию на основе L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана, применяемую для производства лекарственного средства, обладающего гипополипидемической активностью.

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный, органолептический	Соответствует НД
Растворимость	Визуальный	Соответствует НД
Подлинность	Качественная реакция; молекулярно-массовое распределение; ИК-спектроскопия.	Соответствует НД
Потеря в массе при высушивании	Гравиметрический	Не более 8 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15	Общее число аэробных микроорганизмов не более 10 ⁴ КОЕ в 1 г Общее число дрожжевых и плесневых грибов не более 10 ² КОЕ в 1 г Энтеробактерий, устойчивых к желчи, не более 10 ² КОЕ в 1 г Отсутствие <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> в 1 г Отсутствие <i>Salmonella spp.</i> в 25 г
Посторонние примеси: Белок	ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0012.15 метод 2А	Не более 1,5 %
Остаточные органические растворители	ГФ XIV, ОФС.1.1.0008.15	Этанол не более 2,7 мг/г
Тяжелые металлы	ГФ XIV, ОФС.1.2.2.2.0012.15	Не более 0,0001 %
Мышьяк	ГФ XIV, ОФС 1.2.2.2.0004.15	Должно выдерживать испытание
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание L-рамнопиранозил- 6-О-метил-D-галактуронана в субстанции должно быть от 98,5% до 101,5%
Упаковка	Банки оранжевого стекла БВ 50-28-ОС по ОСТ 64-2-87-81 с пробкой. На боковую поверхность наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или писчей по ГОСТ 18510-87 или самоклеящиеся этикетки.	
Маркировка	Соответствие НД	
Условия хранения	Соответствие НД	
Срок годности	2 года	

Описание

Бежевый порошок медленно растворимый в воде с образованием вязкого прозрачного раствора, без запаха, без вкуса.

Растворимость

Медленно растворим в воде с образованием прозрачного раствора.

Подлинность

Качественная реакция

Точную навеску (0,05 г) ПС растворяют в 2 мл воды очищенной, добавляют 200 мкл 2 % раствора фенола и 2 мл концентрированной кислоты серной, должно появиться красно-оранжевое окрашивание.

ИК-спектроскопия

Точную навеску (1,5 мг) анализируемого образца и 150 мг калия бромида растирают в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния ручным способом до состояния «пудры». Смесь прессуют в виде таблетки.

Подготовка анализируемого образца: тонко измельченный в ступке образец субстанции предварительно выдерживают в эксикаторе над концентрированной серной кислотой в течение не менее 12 часов.

Регистрация спектров

Регистрация спектров на ИК-спектрометре проводится согласно инструкции по эксплуатации в интервале частот 4000–400 см⁻¹. ИК-спектр исследуемого вещества должен совпадать со спектром L-рамнопиранозил-6-O-алкил-D-галактуронана (Приложение 1) и иметь характеристичные максимумы: широкая полоса 3600 – 3100 с максимумом в 3400, 1745-1750, 1605-1615, 1415-1425, 1015-1025, 1145-1155, 1090-1100 см⁻¹.

Эксклюзионная ВЭЖХ

Точную навеску ПС (0,001 г) растворяют в 1,0 мл воды деионизированной, центрифугируют 15000 об./мин в течение 10 минут и анализируют на жидкостном хроматографе с эксклюзионной колонкой TSK-gel GMP_{XL} 300×7,8 мм («Supelco», Япония), подвижная фаза – 0,1 М раствор NaCl, 1,0 мл/мин. Регистрацию компонентов проводят с помощью рефрактометрического детектора.

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

Потеря в массе при высушивании

1,0 г субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана (точная навеска) помещают в бюкс, доведенный до постоянной массы, и сушат при 100–105 °С. После чего бюкс помещают на 30-50 минут в эксикатор для охлаждения, затем закрывают крышкой и взвешивают. Постоянный вес считают достигнутым, если два последующих взвешивания после высушивания в течение 1 часа дают разницу, не превышающую 0,0005 г. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 8,0 %

Микробиологическая чистота

Проводят в соответствии с ГФ XIV (ОФС.1.2.4.0002.15), категория 3.2.

- Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г (мл)
- Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г
- Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более 10^2 КОЕ в 1 г
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г
- Отсутствие *Salmonella* spp. в 25 г
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г

Посторонние примеси

Белок

Проводят в соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0012.15 метод 2А. Содержание белка должно быть не более 1,5 %.

Остаточные органические растворители

Определение проводят методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (или другим детектором, обладающим необходимой чувствительностью), колонкой из плавленого кварца размером 0,32 мм × 30 м, покрытой 1,8 мкм слоем фазы HP5 или колонкой большего внутреннего диаметра размером 0,53 мм × 30 м, покрытой 3,0 мкм слоем фазы HP5. В качестве газа-

носителя используется азот или гелий с линейной скоростью порядка 35 см/с и коэффициентом деления потока 1:5. Температура колонки поддерживается на уровне 40 °С в течение 20 минут, затем повышается со скоростью 10 °С/мин до 240 °С и поддерживается в течение 20 минут. Температура инжектора и детектора поддерживается на уровне 140 °С и 250 °С, соответственно. Условия могут быть изменены при сохранении требуемого разрешения между хроматографическими пиками.

Содержание остаточных органических растворителей рассчитывают исходя из площадей пиков этанола и пропанола-2 (внутренний стандарт) на хроматограмме исследуемого раствора и калибровочных зависимостей, построенных по стандартным растворам.

Приготовление испытуемого раствора.

Переносят 5,0 г (точная навеска) субстанции L-рамнопиранозил-6-О-алкил-D-галактуронана в стеклянный стакан объемом 50 мл, приливают 10 мл метилового спирта и помещают в ультразвуковую ванну на 20 минут, после чего содержимое стакана количественно переносят на фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Фильтрацию проводят в мерную колбу вместимостью 50 мл, дважды промывая осадок порциями чистого метанола (по 10 мл). Добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 11,7 мг/мл. После доводят объем до метки чистым метанолом.

Приготовление раствора внутреннего стандарта 11,7 мг/мл. Ампулу (3 мл) СТХ пропанола-2 отчищают от этикетки и загрязнений, протирая ацетоном, и сушат на воздухе, после чего взвешивают на аналитических весах. Вскрыв ампулу, содержимое переливают в мерную колбу на 100 мл и трижды промывают ампулу чистым метанолом, смывы переливают в мерную колбу. Ампулу сушат и снова взвешивают. По разности масс рассчитывают количество пропанола-2. Содержимое колбы доводят до метки чистым метанолом (раствор А). В мерную колбу, вместимостью 10 мл переносят 5 мл раствора А, содержимое колбы доводят до метки метанолом (раствор внутреннего стандарта). Срок годности раствора А – 6 месяцев; раствора внутреннего стандарта – 14 дней.

Тяжелые металлы

Проводят в соответствии с ГФ XIV, ОФС.1.2.2.2.0012.15.

Мышьяк

Проводят в соответствии с ГФ XIV, ОФС 1.2.2.2.0004.15, метод 1. Полоска бумаги из прибора с испытуемым раствором не должна быть окрашена или ее окраска не должна быть интенсивнее полосы эталонной.

Количественное определение

Приготовление испытуемого раствора. 0,10 г субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана (точная навеска) помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40 мл воды и растворяют при интенсивном перемешивании. После чего доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Отбирают 1,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора до метки водой очищенной.

В пробирку помещают 3 мл анализируемого раствора. Пробирку с содержимым охлаждают до 0°C (ледяная баня), затем медленно добавляют по стенке пробирки 3 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают, нагревают на кипящей водяной бане 30 минут. Далее пробирку охлаждают на ледяной бане, добавляют по 3,0 мл 0,2 % антронового реактива, тщательно перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане 15 минут. Затем охлаждают до комнатной температуры.

Приготовление раствора сравнения. В пробирку помещают 0,25 мл воды очищенной, охлаждают до 0°C (ледяная баня), затем медленно добавляют по стенке пробирки 1,5 мл концентрированной серной кислоты, охлажденного до 0°C. Далее проводят операции аналогично приготовлению испытуемого раствора.

Приготовление стандартного раствора рамнозы. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г стандартного образца рамнозы, растворяют в воде очищенной и доводят объем колбы до метки. Отбирают 1,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора до метки водой очищенной.

Оптическую плотность растворов измеряют относительно раствора сравнения при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Расчет содержания L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана проводят по формуле:

$$X\% = \frac{m_0 \times Abs_1 \times P \times 3}{Abs_0 \times m_1 \times (1 - W/100)}$$

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,

W – потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление 0,2% раствора антрона. 0,20 г антрона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют серную кислоту, свободную от азота, или смесь серная кислота, свободная от азота, — вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в темное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч. Срок хранения 7 суток при температуре 6 – 8 С.

Определение проводят не менее чем в 3 повторностях. Содержание L-рамнопиранозил-6-О-алкил-D-галактуронана в субстанции должно быть 98,5 – 101,5 %.

Упаковка

Фасуют в банки оранжевого стекла БВ 50-28-ОС по ОСТ 64-2-87-81 с пробкой. На боковую поверхность наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или писчей по ГОСТ 18510-87 или самоклеящиеся этикетки.

Маркировка

На упаковке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак, название препарата на русском и латинском языках, массу в упаковке, номер регистрационного удостоверения, номер серии, срок годности. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Транспортирование

В соответствии с ГОСТ 17768-90.

Хранение

Хранят в сухом защищенном от света месте при температуре не выше 8°C

Срок годности

2 года.

Рисунок 1 – ИК-спектр стандарта L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана

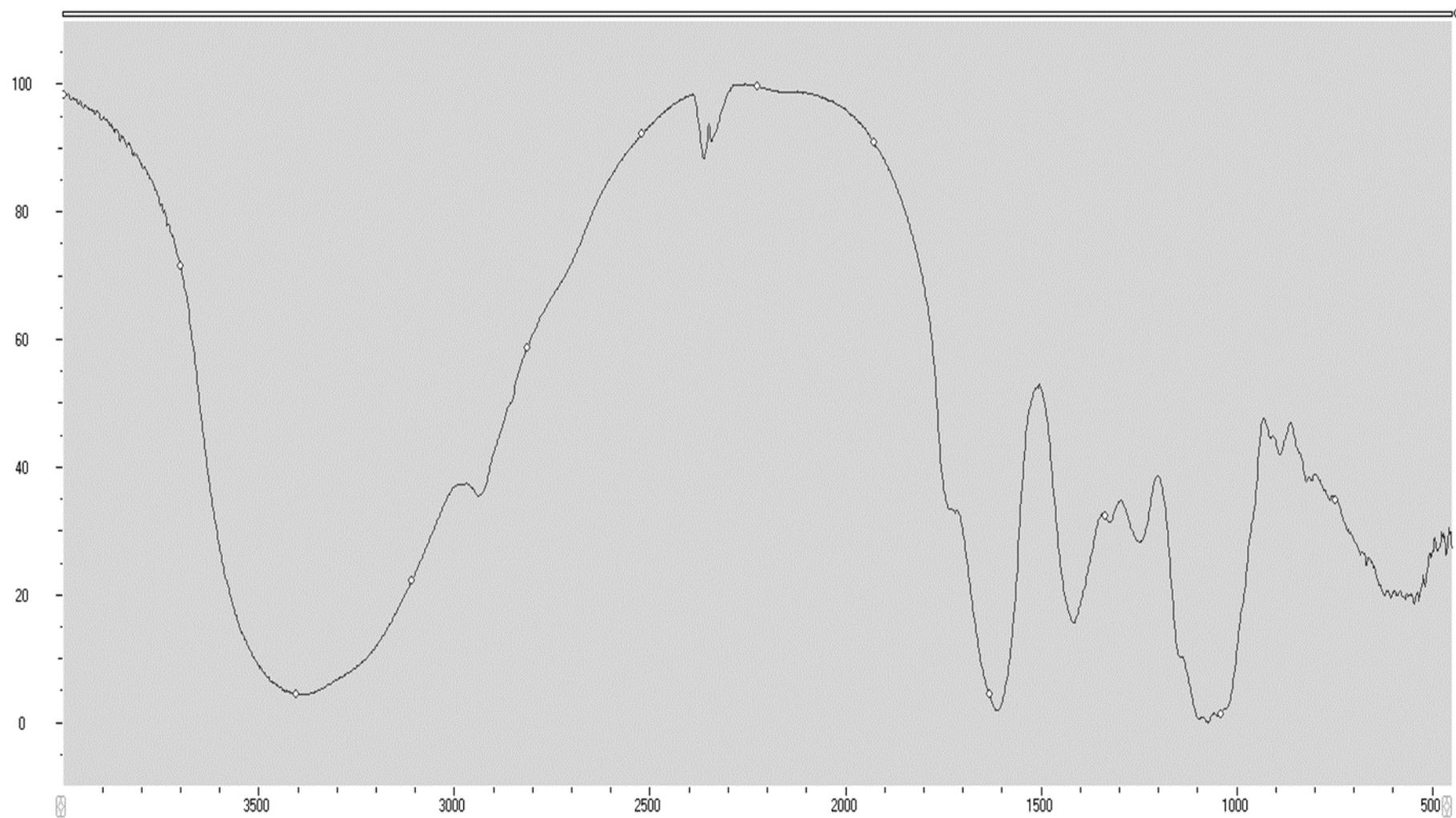
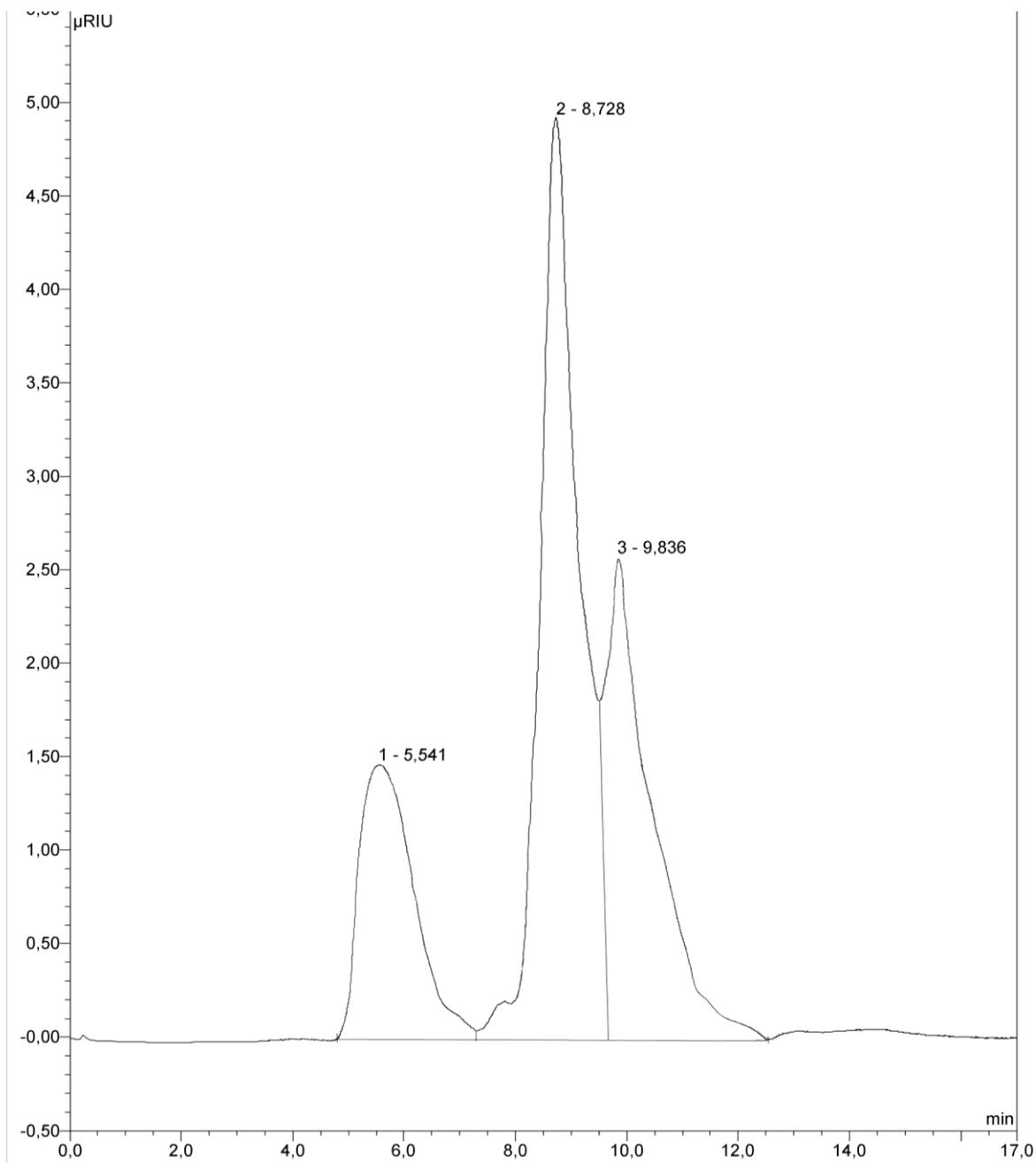


Рисунок 2 - Хроматограмма стандарта L-рамнопиранозил-6-O-метил-D-галактуронана



ПРИЛОЖЕНИЕ № 2

Акты внедрения
полученных результатов

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
http://www.ssmu.ru
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
д-р мед. наук

А.Г. Мирошниченко

10.10 2019



№ _____
На № _____ от _____

АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа результатов диссертационной работы Ровкиной Ксении Игоревны на тему «Разработка и стандартизация активной фармацевтической субстанции гипополипидемического действия на основе полисахаридов высших растений флоры Сибири», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя - заведующего кафедрой химии, д-ра фарм. наук Зыковой М.В. и членов: доцента кафедры химии, канд. хим. наук Жолобовой Г.А., доцента кафедры химии, канд. хим. наук Голубиной О.А. удостоверяем, что предложенная Ровкиной К.И. в проекте нормативной документации «Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана» методика количественного определения полисахаридов методом спектрофотометрии внедрена и используется в учебном процессе кафедры химии в разделе «Спектрофотометрия» по дисциплине «Основы спектрального анализа» (4 курс медико-биологического факультета, осенний семестр).

Председатель
заведующий кафедрой химии,
д-р фарм. наук

Зыкова М.В.

Члены комиссии
доцент кафедры химии,
канд. хим. наук

Жолобова Г.А.

доцент кафедры химии,
канд. хим. наук

Голубина О.А.

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
http://www.ssmu.ru
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001



№ _____
На № _____ от _____

АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа результатов диссертационной работы Ровкиной Ксении Игоревны на тему «Разработка и стандартизация активной фармацевтической субстанции гипополипидемического действия на основе полисахаридов высших растений флоры Сибири», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя - заведующего кафедрой фармацевтического анализа, д-ра фарм. наук Белоусова М.В. и членов: доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Кадыровой Т.В., доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Ларькиной М.С. удостоверяем, что предложенная Ровкиной К.И. в проекте нормативной документации «Фармацевтическая субстанция L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана» методика количественного определения полисахаридов методом спектрофотометрии внедрена и используется в процессе обучения ординаторов кафедры фармацевтического анализа в разделе «Спектральные методы анализа».

Председатель
заведующий кафедрой фармацевтического анализа,
д-р фарм. наук

Белоусов М.В.

Члены комиссии
доцент кафедры фармацевтического анализа,
канд. фарм. наук

Кадырова Т.В.

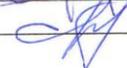
доцент кафедры фармацевтического анализа,
канд. фарм. наук

Ларькина М.С.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 3

Отчет об исследовании стабильности

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		
Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г.		Ф-ЦВТ-КК-015-16

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		Стр. 1 из 6	
Отчет об исследовании стабильности		Ф-ЦВТ-КК-015-16	
Наименование	Исследование стабильности фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы L-рамнопиранозил-6-алкил-D-галактуронана		
	Должность	Ф. И. О.	Подпись: Дата:
Провел	лаборант	Ровкина К.И.	 05.07.19
Проверил	Заведующий ЛКК	Кривошеков С.В.	 05.07.19
Утвердил	Руководитель ЦВТ	Гурьев А.М.	 05.07.19

634050 Россия, Томская область, г. Томск
Московский тракт 2, стр. 18
тел. +7 (3822) 901 101 доб 1863

Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г

Томск – 2019

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		
Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г.		Ф-ЦВТ-КК-015-16

1. Нормативные документы

ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 Общие требования компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений.

Проект ФСП «Субстанция L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана».

Проект ФСП «Гранулы L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана».

ОСТ 42-2-72 «Лекарственные средства. Порядок установления сроков годности».

ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств»

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		
Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г.	Ф-ЦВТ-КК-015-16	

2. Перечень СИ

Наименование СИ	
Спектрофотометр Unicо 2800	свид-во о поверке №36621/203 от 08.11.17 г., действительно до 29.11.2019 г.
Весы аналитические ALC-210d	свид-во о поверке № 36504/202 от 17.11.17 г, действительно до 16.11.2019 г

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России	
Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г.	Ф-ЦВТ-КК-015-16

3. План график (основание проведения работ)

Исследование стабильности проводится при температуре +25°C и методом «ускоренного старения» по ОСТ 42-2-72. Образцы субстанции и таблеток были заложены на хранение при +40 °С и +25 °С (акты закладки на хранение от 15.06.2018 г. и от 30.06.2018 г.).

Таблица 1 – План-график проведения анализа субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана, серии ВР050617, ВР080617, ВР090617 (хранение при +25 °С)

№п/п	Планируемая дата анализа	Фактическая дата анализа
1	15.12.2017	15.12.2017
2	15.06.2018	15.06.2018
3	15.12.2018	17.12.2018
4	15.06.2019	17.06.2019

Таблица 2 – План-график проведения анализа субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана, серии ВР050618, ВР080618, ВР090618 (хранение при +40 °С)

№п/п	Планируемая дата анализа	Фактическая дата анализа
1	20.07.2018	20.07.2018
2	25.08.2018	25.08.2018
3	30.09.2018	29.09.2018
4	05.11.2018	27.11.2018
5	05.12.2018	25.12.2018

При изучении срока годности, согласно актам закладки ФС и ГЛФ L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана, проводили определение показателя качества «Количественное определение».

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		
Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г.		Ф-ЦВТ-КК-015-16

4. Результаты

Таблица 3 – Результаты исследования стабильности 3 серий субстанции (хранение при +25 °С)

Номер серии	Дата анализа	Результаты анализов по НД	Срок хранения	Вывод по хранению
1	2	3	4	5
BP050617	15.12.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,5 %	183 сут	годен
	15.06.2018	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,6 %	364 сут	годен
	17.12.2018	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,4 %	549 сут	годен
	17.06.2019	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,4 %	731 сут	годен
BP080617	15.12.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 98,9 %	183 сут	годен
	15.06.2018	L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,1 %	364 сут	годен
	17.12.2018	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,0 %	549 сут	годен
	17.06.2019	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 98,9 %	731 сут	годен
BP090617	15.12.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,5 %	183 сут	годен
	15.06.2018	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,3 %	364 сут	годен
	17.12.2018	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,2 %	549 сут	годен
	17.06.2019	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,1 %	731 сут	годен

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		
Отчет об исследовании стабильности № 1 от «05» июля 2019 г.		Ф-ЦВТ-КК-015-16

Таблица 4 – Результаты исследования стабильности 3 серий субстанции (хранение при +40 °С)

Номер серии	Дата анализа	Результаты анализов по НД	Срок хранения	Вывод по хранению
1	2	3	4	5
ВР050617	20.07.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 98,8 %	45 сут	годен
	25.08.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,5 %	91 сут	годен
	29.09.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,1 %	137 сут	годен
	27.11.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,3 %	183 сут	годен
	25.12.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,3 %	231 сут	годен
ВР080617	20.07.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,0%	45 сут	годен
	25.08.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,7 %	91 сут	годен
	29.09.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 98,9 %	137 сут	годен
	27.11.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,1 %	183 сут	годен
	25.12.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 101,1 %	231 сут	годен
ВР090617	20.07.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,6 %	45 сут	годен
	25.08.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 100,4 %	91 сут	годен
	29.09.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,8 %	137 сут	годен
	27.11.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,1 %	183 сут	годен
	25.12.2017	Содержание L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана в субстанции 99,2 %	231 сут	годен

Заключение

На основании результатов исследования стабильности установлен срок годности субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана равный 2 годам.