

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

На правах рукописи



Родин Михаил Николаевич

**Совершенствование методов контроля качества цветков липы, семян льна,
слоевищ ламинарии и лекарственных препаратов на их основе**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук, доцент
Боков Дмитрий Олегович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЦВЕТКИ ЛИПЫ, СЛОЕВИЩА ЛАМИНАРИИ, СЕМЕНА ЛЬНА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Полисахариды как основная группа биологически активных соединений цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна	16
1.2. Состав биологически активных соединений цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна	18
1.3. Методы анализа полисахаридов в цветках липы, слоевищах ламинарии, семенах льна	21
1.4. Стандартизация цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна	23
1.5. Фармакологическая активность и применение в медицине цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна.....	25
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	31
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Сведения об объектах исследования.....	33
2.2. Методы анализа, оборудование	33
2.3. Методы определения восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов и моносахаридов в составе полисахаридов	34
2.4. Метод определения флавоноидов.....	36
2.5. Метод определения аминокислот.....	37
2.6. Метод определения жирнокислотного состава.....	39
2.7. Метод определения компонентного состава летучих веществ	41
2.8. Метод определения элементного состава.....	41
2.9. Метод определения антирадикальной активности	41
2.10. Валидация методов и обработка полученных результатов	42
2.11. Реактивы и стандартные образцы.....	42

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	44
3.1. Идентификация моносахаридов в составе полисахаридов.....	44
3.2. Идентификация флавоноидов.....	45
3.3. Определение аминокислотного состава.....	57
3.4. Определение жирнокислотного состава.....	63
3.5. Определение компонентного состава летучих органических веществ.....	68
3.6. Определение элементного состава.....	73
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	79
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЦВЕТКОВ ЛИПЫ, СЛОЕВИЩ ЛАМИНАРИИ, СЕМЯН ЛЬНА.....	81
4.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов методом спектрофотометрии в цветках липы.....	86
4.2. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии в цветках липы.....	95
4.3. Разработка и валидация методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов методом спектрофотометрии в слоевищах ламинарии.....	104
4.4. Разработка и валидация методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов методом спектрофотометрии в семенах льна.....	110
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	118
ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ В СОСТАВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В ВОДНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЯХ И РАЗОВОЙ ДОЗЕ ПРИЁМА.....	119

5.1. Определение суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в водных извлечениях цветков липы.....	119
5.2. Определение суммы флавоноидов в водных извлечениях цветков липы.....	121
5.3. Определение суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в разовой дозе приёма слоевищ ламинарии	122
5.4. Определение суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в водных извлечениях семян льна	122
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	125
ГЛАВА 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ЦВЕТКОВ ЛИПЫ, СЛОЕВИЩ ЛАМИНАРИИ, СЕМЯН ЛЬНА	126
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	134
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	136
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	137
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	140
ПРИЛОЖЕНИЕ А	154
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	190

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Лекарственные растительные препараты (ЛРП) являются достаточно востребованными лекарственными средствами на отечественном фармацевтическом рынке. ЛРП содержат комплекс биологически активных соединений (БАС) с широким спектром фармакологической активности. ЛРП обладают рядом преимуществ – относительно низкой стоимостью, отсутствием серьёзных побочных действий и аллергических реакций. Они просты в применении и могут использоваться для лечения детей и лиц старшего возраста.

Ключевым условием эффективности и безопасности ЛРП является контроль качества. Контроль качества ЛРП представляется весьма сложной задачей ввиду многокомпонентного состава БАС, характерного для лекарственного растительного сырья (ЛРС). В настоящей работе рассматриваются ЛРП, преобладающей группой БАС которых являются полисахариды (ПСХ). Они, наряду с другими группами БАС (флавоноидами, дубильными веществами), оказывают комплексное фармакотерапевтическое действие. ПСХ применяются в качестве детоксикантов, сорбентов, слабительных, а также в качестве отхаркивающих средств [21]. ПСХ обладают иммунологической активностью, способны пролонгировать действие лекарств, оказывают противовоспалительное, обволакивающее, гипогликемическое и ранозаживляющее действие. В ходе предварительного информационно-аналитического анализа нами были отобраны 3 вида ЛРС, содержащего ПСХ (цветки липы, слоевища ламинарии, семена льна). Данные виды ЛРС входят в состав как индивидуальных, так и комплексных ЛРП (слоевища ламинарии, семена льна), стандартизацию которых необходимо проводить с учетом современных требований фармацевтической науки.

Цветки липы обладают выраженным потогонным эффектом и содержат комплекс БАС, включая флавоноиды, ПСХ и другие соединения. Применяются в терапии острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [2].

Семена льна содержат слизь, жирное масло, белковые вещества, гликозид линамарин и другие БАС. ЛРП на основе семян льна оказывают обволакивающее, противовоспалительное и мягкое слабительное действие. Показаниями к их применению являются воспалительные и язвенные поражения желудочно-кишечного тракта (эзофагит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, энтерит, колит), а также запоры [98].

Слоевища ламинарии содержат высокомолекулярные ПСХ, йодиды и бромиды, а также другие группы БАС. Слабительное действие обусловлено способностью препарата набухать, увеличиваясь в объеме и раздражая рецепторы слизистой оболочки кишечника. Благодаря содержанию солей йода препарат проявляет тиреоидное и гиполипидемическое действие, что позволяет применять его при хронических атонических запорах, в том числе у пациентов с гиперлипидемией [70, 107].

ЛРП на основе фармакопейных видов ЛРС (цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна) давно применяются в медицинской практике и активно реализуются через аптечные учреждения. Основными формами выпуска указанных выше ЛРП являются цельное или измельченное ЛРС, расфасованное в фильтр-пакеты или пакеты, вложенные в картонные пачки, на основе которых в домашних условиях изготавливаются водные извлечения (цветки липы, семена льна) или употребляют без предварительной подготовки (слоевища ламинарии). Однако, в литературе отсутствуют данные о процентах перехода БАС из ЛРП в готовые лекарственные формы на их основе. В связи с этим необходимы исследования, учитывающие принцип «сквозной стандартизации».

Многокомпонентность состава ЛРП и наличие сложного матрикса БАС различной химической природы обуславливает необходимость разработки оптимальных путей для их анализа. Актуальной задачей является совершенствование методик качественного и количественного определения БАС с

применением современных инструментальных физико-химических методов анализа.

С целью разработки оптимальных аналитических подходов необходимо проводить анализ данных ЛРП в соответствии с современными требованиями, применяя физико-химические методы, такие как спектрофотометрия (СФМ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Степень разработанности темы исследования

Методики, представленные в фармакопейных статьях (ФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV и XV издания [7, 8] на упомянутые выше объекты (ФС.2.5.0024.15 и ФС.2.5.0024 Липы цветки – СФМ; ФС.2.5.0080.18 Ламинарии слоевища – гравиметрия; ФС.2.5.0026.15 Льна посевного семена – гравиметрия) [56–59] обладают рядом недостатков. Гравиметрический метод определения ПСХ в объектах отмечается длительностью анализа и имеет недостаточную специфичность.

В настоящее время в ГФ РФ XV издания для количественного определения суммы флавоноидов в цветках липы используется устаревшая методика, которая характеризуется длительностью и трудоёмкостью выполняемого анализа, в сочетании с необходимостью использовать большое количество реактивов. К тому же концентрация флавоноидов высчитывается в пересчёте на кверцетин, в то время как для цветков липы более характерно содержание рутина.

Обзор литературы показывает, что для анализа ПСХ наибольшие перспективы имеет спектрофотометрический метод, тогда как применение метода ВЭЖХ является нецелесообразным из-за физико-химических свойств этих соединений. В отечественной фармацевтической практике чаще всего используют пикриновую, фенолсерноокислую и орциновую методики, однако они трудоёмки, требуют нагревания и работы с потенциально взрывоопасными и токсичными реагентами. [31]

В связи с вышеперечисленными причинами возникает необходимость модернизации имеющихся методик. Наиболее перспективным направлением для решения данной задачи является применение апробированных методик спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин и суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу с антроновым реактивом, сочетающих эффективность разделения компонентов сложных смесей с избирательностью и чувствительностью детектирования.

Для объектов исследования в настоящее время отсутствуют работы, описывающие «сквозную стандартизацию» фармацевтических субстанций растительного происхождения (ФСРП) и готовых лекарственных форм на их основе, с использованием высокоспецифичных методов анализа.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является совершенствование подходов к идентификации и количественному определению БАС в ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и водных извлечений на их основе, а также совершенствование их показателей подлинности и доброкачественности.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Провести информационно-аналитическое исследование групп БАС, методов анализа и стандартизации рассматриваемых видов ЛРС, включая анализ отечественных и зарубежных научных информационных источников по теме диссертационного исследования;
2. Уточнить состав и содержание основных групп БАС (ПСХ, флавоноиды и другие группы БАС) ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна российских производителей и водных извлечений на их основе;
3. Разработать и валидировать методики количественного определения основных групп БАС (ПСХ, флавоноиды) для ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна;

4. Уточнить показатели количественного определения ПСХ и флавоноидов для ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и водных извлечений на их основе, обосновать их нормативные значения;
5. Изучить антирадикальную активность водных извлечений цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна;
6. Подготовить обновленные проекты ФС на ЛРП – липы цветки, слоевища ламинарии, семена льна.

Научная новизна

Впервые комплексно исследованы БАС ЛРП цветков липы, семян льна, слоевищ ламинарии и их водных извлечений с применением ВЭЖХ, тонкослойной хроматографии, СФМ. Идентифицированы ПСХ, флавоноиды, аминокислоты, жирные и летучие органические кислоты, а также установлен элементный состав объектов.

Разработаны и валидированы спектрофотометрические методики определения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу для цветков липы, семян льна и слоевищ ламинарии, а также методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчёте на рутин для цветков липы.

Впервые исследованы комплексы основных групп БАС объектов с учетом принципа «сквозной стандартизации», количественно оценён переход ПСХ и флавоноидов из ЛРП в водные извлечения и разовую дозу приёма. Доказана и количественно определена антирадикальная активность водных извлечений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в том, что в ходе проведенной работы получена новая информация о качественном составе и количественном содержании

БАС ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и водных извлечений на их основе. Проведена оценка перехода основных групп БАС объектов в водные извлечения на их основе и разовую дозу приёма. В результате проведенных исследований установлены и обоснованы показатели доброкачественности изучаемых объектов, доказана антирадикальная активность водных извлечений. Полученные результаты экспериментальных исследований позволяют расширить представления о биологической активности, качественном составе и количественном содержании БАС в ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и в водных извлечениях на их основе. Данные, полученные в рамках диссертационной работы, могут быть использованы в образовательных целях и в качестве основы для разработки оптимальных лекарственных форм цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и создания на их базе новых продуктов.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основании выполненных исследований разработаны и валидированы методики анализа основных групп БАС и установлены нормы качества ЛРП, которые явились основой для создания обновлённых проектов ФС «Липы цветки, измельченные для приготовления настоя», «Липы цветки, порошок для приготовления настоя», «Ламинарии слоевища (морская капуста), измельченные», «Льна посевного семени, цельные для приготовления настоя» (раздел: «Количественное определение»). Полученные данные в ходе экспериментальных исследований по разработке методик и подходов к стандартизации основных групп БАС могут использоваться в контрольно-аналитических лабораториях для контроля качества ЛРП.

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на комплексном применении информационно-аналитического, фармакогностического и физико-химических методов. Выполнен обзор отечественной и зарубежной научной литературы и нормативной документации, регулирующей стандартизацию ЛРП. Проведен

анализ существующих подходов к стандартизации ЛРП. Для идентификации и количественного определения основных групп целевых БАС разработаны и валидированы современные методики анализа с применением СФМ. Проведена статистическая обработка экспериментальных данных с использованием Microsoft Excel.

Личный вклад автора

Вклад автора играет ключевую роль на всех этапах исследования: от постановки целей и задач до получения и обсуждения экспериментальных данных, от статистической обработки результатов исследования до анализа и подготовки публикаций, а также выступления с докладами на научно-практических конференциях.

Автором проведён ряд исследований с использованием фармакопейных методов анализа ЛРС и ЛРП: определение содержания групп БАС в цветках липы, слоевищах ламинарии, семенах льна (суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу спектрофотометрическим методом, суммы флавоноидов в пересчёте на рутин методом СФМ в ультрафиолетовой (УФ) и видимой области), а также проведена идентификация сахаров в объектах исследования методом тонкослойной хроматографии. Определена антирадикальная активность.

Установлен состав аминокислот (метод ВЭЖХ), летучих органических веществ и жирных кислот (метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС) и метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД)), флавоноидов (метод ультраэффективной жидкостной хроматографии с tandemным квадрупольным масс-спектрометрическим УФ-детектированием (УЭЖХ-УФ/МС/МС)), исследован элементный состав (метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС)). Автор самостоятельно обновил проекты ФС на

цветки липы, семена льна, слоевища ламинарии с целью их дальнейшего включения в издание ГФ РФ.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты изучения качественного и количественного состава основных групп БАС в ЛРП, выпускаемых в пачках и фильтр-пакетах, водных извлечений на их основе.

2. Результаты разработки и валидации методик количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в цветках липы, слоевищах ламинарии и семенах льна спектрофотометрическим методом с антроновым реактивом.

3. Результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в цветках липы методом СФМ.

4. Результаты изучения антирадикальной активности водных извлечений цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена необходимым объёмом экспериментального материала (в работе использовали более 10 серий каждого объекта, приобретённых в аптечных сетях г. Москвы в период с 2022 по 2025 года), с применением различных методов анализа (тонкослойная хроматография, СФМ, ВЭЖХ, ГХ/МС и ГХ-ПИД), сертифицированных реактивов и растворителей, поверенного оборудования (спектрофотометры (Bruker, ООО «ОКБ Спектр»), хроматографы (Agilent Technologies), весы аналитические (A&D Co.LTD.)), сравнением полученных экспериментальных данных с литературными. В процессе разработки и валидации методик количественного определения применяли методы

статистической обработки согласно требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» для установления правильности, воспроизводимости и сходимости результатов исследований.

Основные результаты диссертационной работы доложены на:

- международной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии – 2023» (г. Москва, 2023);
- международной конференции «The 4th China-Russia International Symposium for Young Scholars» (г. Гуанчжоу, 2023);
- международной научно-практической онлайн-конференции «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, 2024);
- международном съезде "Фитофарм 2024" (г. Санкт-Петербург, 2024);
- международной конференции «The 5th China-Russia International Symposium for Young Scholars» (г. Гуанчжоу, 2024).

Апробация результатов диссертационного исследования состоялась на заседании межкафедральной конференции кафедр фармацевтического естествознания, химии, фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, фармацевтической технологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Протокол №8 от 27.03.2025 г.

Внедрение результатов в практику

Результаты изучения компонентного состава БАС, характеристик подлинности и доброкачественности цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна использованы в учебном процессе кафедры фармацевтического естествознания (акт внедрения №540 от 20.11.2024 г.), кафедры аналитической, физической и коллоидной химии (акт внедрения №545 от 20.11.2024 г.) Института

фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Результаты исследования, в том числе разработанная методика количественного определения восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье используются для оценки качества ЛРП в испытательной лаборатории общества с ограниченной ответственностью «СК» (акт внедрения №47-24 от 18.12.2024 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пунктам 2, 3, 6.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа была выполнена в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы кафедры фармацевтического естествознания Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме: «Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья, лекарственных сборов, лекарственных форм из сырья и разработка методов их стандартизации с учетом влияния антропогенных факторов, оценки качества и сертификации» (номер государственной регистрации 01.2.006 06352).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, 1 статья в издании, индексируемом в международной базе Scopus, 1 иная публикация, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 192 страницах машинописного текста, включая приложения – 39 страниц. Работа состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), пяти глав, посвящённых экспериментальным исследованиям, обсуждению результатов и выводов к каждой главе (Глава 2–6), заключения, а также общих выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (всего 123 источника, из них – 62 иностранных), 2 приложений. Диссертация содержит 43 рисунка, в том числе 39 в основном тексте работы и 4 – в приложениях, а также 74 таблицы.

ГЛАВА 1. ЦВЕТКИ ЛИПЫ, СЛОЕВИЩА ЛАМИНАРИИ, СЕМЕНА ЛЬНА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Полисахариды как основная группа биологически активных соединений цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна

ПСХ представляют собой природные полимерные высокомолекулярные углеводы, состоящие из различных моносахаридных остатков, связанных гликозидными связями. Они чаще встречаются в виде пектиновых веществ, клетчатки, крахмала, слизей, камедей и являются одной из ключевых групп БАС ЛРС и ЛРП, оказывая широкий спектр фармакологического действия.

ПСХ цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна являются ключевыми компонентами данных видов ЛРС, обеспечивающими их фармакологическое действие и определяющими область их медицинского применения.

ПСХ цветков липы:

Цветки липы содержат целый комплекс БАС. Особое внимание заслуживают ПСХ (слизи), в составе которых были обнаружены остатки моносахаридов: фруктоза, глюкоза, манноза, ксилоза, галактоза, рамноза, арабиноза, галактуроновая и глюкуроновая кислоты [17, 43, 44, 72].

Эти вещества обуславливают обволакивающее, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие препаратов на их основе. Кроме того, ПСХ цветков липы обладают антиоксидантными свойствами, способствуя снижению воспалительных процессов в организме. [17, 44]

ПСХ слоевищ ламинарии:

Слоевища ламинарии являются ценным источником высокомолекулярных ПСХ, относящихся к группе полиуронидов. В их состав входят остатки моносахаридов, включая фукозу, галактозу, маннозу, глюкозу, рамнозу, ксилозу и арабинозу, представленные в различных молярных соотношениях. Выявлен полисахарид LJP61A, моносахаридные остатки которого состоят в основном из

галактозы, маннозы и глюкозы в молярном соотношении 2,92:1:1,85. В состав моносахаридных остатков LJ04 входят глюкозамин, глюкуроновая кислота и галактозамин. [97]

Основными ПСХ бурых морских водорослей ламинарии японской – *Laminaria japonica* Aresch. и ламинарии сахаристой – *Laminaria saccharina* (L.) Lam., сем. ламинариевых – Laminariaceae, являются: фукоидан (сульфатированный полисахарид фукозы), ламинарин (полисахарид глюкозы) и альгиновая кислота (Рисунок 1) – природный полимер, структурная основа клеточной стенки и межклеточного пространства бурых водорослей. Содержание данной кислоты в слоевищах ламинарии может достигать до 40 % сухой массы, что обуславливает её промышленное использование в качестве основного источника альгиновой кислоты и альгинатов – солей альгиновой кислоты. [33, 63]

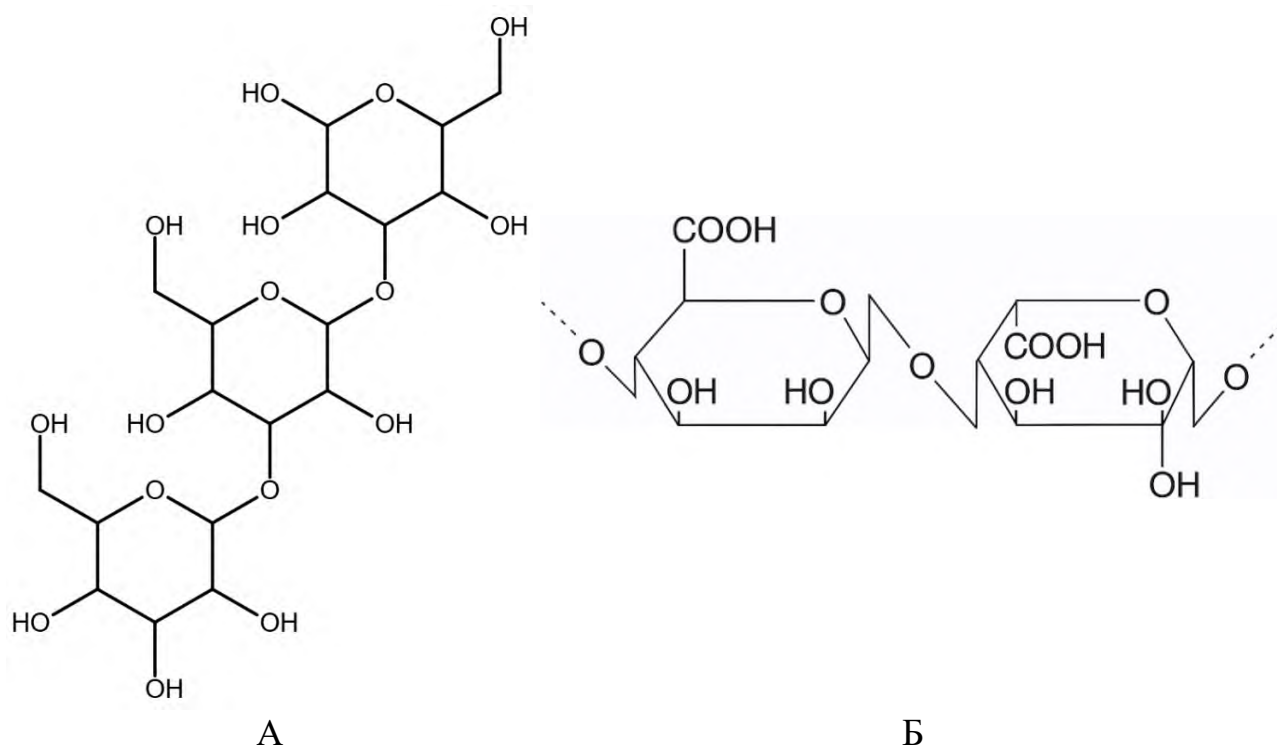


Рисунок 1 – Структурные формулы ламинарина (А) и альгиновой кислоты (Б)

Альгинаты обладают выраженными сорбционными свойствами, способствуя выведению токсинов, тяжёлых металлов и радионуклидов из организма. Эти соединения широко применяются в фармацевтической промышленности и

медицине, в том числе в составе лекарственных препаратов с детоксикационным, противоязвенным и гастропротекторным действием.

ПСХ семян льна:

Семена льна являются одним из перспективных источников хорошо растворимых некрахмальных ПСХ [60]. Некрахмальные ПСХ (non-starch polysaccharides) представляют собой группу плохо перевариваемыми углеводами (low-digestible carbohydrates) или пищевых волокон (dietary fiber) [78]. Данные вещества способны оказывать существенное влияние на процессы переваривания, усвоения, эвакуацию пищи и микробиоциноз.

Слизь льна – это гетерогенный ПСХ, состоящий из моносахаридов, связанных кальциевым мостиком с галактуроновой кислотой, которая образуется во вторичной клеточной стенке эпидермальных клеток оболочки семян [39]. В состав моноз ПСХ льняных слизей входят ксилоза, глюкоза, галактоза, рамноза, фукоза и галактуроновая кислота. Показано влияние ПСХ семян льна на снижение гликемического индекса, содержания холестерина в крови, а также их пребиотическое действие [89].

1.2. Состав биологически активных соединений цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна

Изучаемое ЛРС цветков липы, слоевища ламинарии и семян льна содержат широкий спектр БАС, среди которых ключевую роль играют ПСХ, флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, жирные кислоты и микроэлементы. В открытых источниках описан химический состав этих объектов, однако отсутствуют исследования, посвящённые переходу БАС (с учётом их процентного содержания) из ЛРП в водные извлечения на их основе.

Химический состав БАС цветков липы:

Уникальные свойства цветков липы обусловлены их насыщенным химическим составом, включающим флавоноиды (кемпферол, кверцетин,

мирицетин и их гликозиды (рутин, гиперозид, кверцетин О-рамногексозиды, тилирозид, астрагалин, афзелин и др.)), витамины, аскорбиновая кислота дубильные вещества, ПСХ (арабиноза, галактоза, рамноза, глюкоза, манноза и ксилоза; галактуроновая и глюкуроновая кислоты), летучие вещества (цитраль, цитронеллаль, цитронеллол, эвгенол, лимонен, нерол, α -пинен, терпинеол и фарнезол), фенолкарбоновые (галловая кислота, 3,4-дигидроксibenзойная кислота) и органические кислоты, сапонины, а также микро- и макроэлементы [17, 44, 46, 72]. Эти БАС обуславливают широкий спектр фармакологической активности цветков липы, а именно подтверждены диуретическая, жаропонижающая, потогонная, отхаркивающая, противовоспалительная, мочегонная, вяжущая, спазмолитическая и седативная активность [17, 32, 44, 94].

Химический состав БАС слоевищ ламинарии:

Слоевища ламинарии представляют собой ценный источник жизненно важных питательных и биологически активных веществ, включая ПСХ, органически связанный йод, витамины, маннит, макро- и микроэлементы, а также другие функциональные соединения. Бурые водоросли содержат уникальные биологически активные вещества, которые отсутствуют в наземной флоре, что обуславливает их высокую пищевую и фармакологическую ценность [33].

Химический состав ламинарии варьируется в зависимости от места произрастания, однако в среднем в 100 г сухой ламинарии содержится: 17,1–32,0 г альгиновой кислоты; 8,46–28,48 г маннита; 5,97–18,99 г сырого протеина; 19,35–45,29 г золы, в том числе 0,13–0,69 г йода и 4,35–12,65 г калия. В составе БАС обнаружены аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты и альгинаты.

Ламинария многократно превосходит наземные растения по содержанию витаминов и микроэлементов. В её составе обнаружены витамины (А, С, D, В1, В2, В3, В6, В12, Е, К, РР), макро- и микроэлементы (К, Na, Ca, Mg, I, S, Si и др.), соли калия и натрия (хлориды, сульфаты). [101]

Помимо этого, бурые водоросли являются источниками полифенольных соединений, фенольных кислот, флавоноидов и флоротанинов (пентамер фторглюцинола, бифухалол) [91, 93, 103, 113].

Химический состав БАС семян льна:

Химический состав семян льна является разнообразным. В среднем они содержат 40 % липидов, 23 % белков и 29 % углеводов, представленных преимущественно растворимыми и нерастворимыми пищевыми волокнами [29]. Семена льна богаты следующими биологически активными веществами: феноловые кислоты (0,8–1 %, включая п-, о-кумаровые кислоты и другие соединения), лигнаны (0,9–3 %, в том числе диглюкозид секоизоларицирезинол, ларицирезинол, матейрезинол, пинорезинол), флавоноиды (0,3–0,7 %, включая гербацетин), витамины (до 3 %), минеральные вещества (1–2 %), слизистые вещества (муцилагинозные соединения) [69, 80, 81, 83–87, 90, 119].

Одной из основной группой БАС в семенах льна являются жирные кислоты: полиненасыщенные (омега кислоты), относящиеся к омега-9, омега-6 и омега-3 кислотам, в том числе линолевая, линоленовая и олеиновая, и насыщенные – пальмитиновая и стеариновая кислоты [48].

Вторым компонентом после липидов в семенах льна являются протеины. Они характеризуются сбалансированным аминокислотным составом с преобладанием суммы незаменимых аминокислот, среди которых преобладают ароматические аминокислоты – тирозин и фенилаланин. [89]

Характерной группой БАС для семян льна являются цианогенгликозиды: линамарин, линустатин и неолинустатин. Данные соединения способны выделять синильную кислоту (HCN) при гидролизе, что определяет их потенциальную токсичность при потреблении в больших количествах. Однако исследования показали, что тепловая обработка, ферментация и гидролиз могут снижать уровень цианогенных соединений, делая продукты на основе семян льна безопасными для потребления и использования в медицине. [75] Неолинустатин представляет собой производное линустатина, включающее молекулы сахара (Рисунок 2).

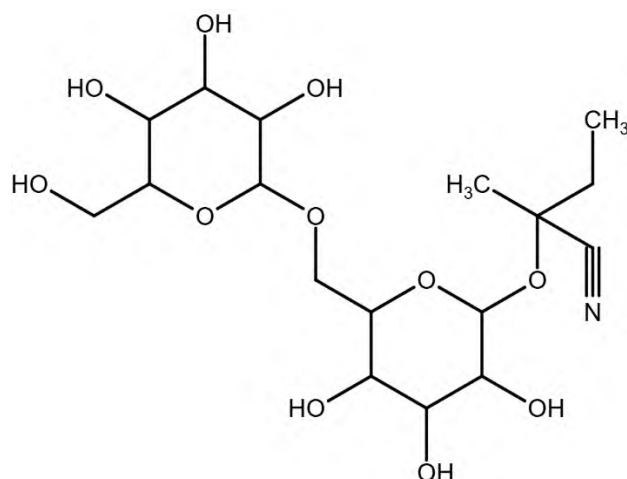


Рисунок 2 – Структурная формула неолинустина

1.3. Методы анализа полисахаридов в цветках липы, слоевищах ламинарии, семенах льна

В настоящее время применяются следующие методы для определения ПСХ в разных видах ЛРС: гравиметрия, СФМ с антроном, резорцином, орцином, фенолсернокислым реактивом. Также используются методы: ВЭЖХ и капиллярный электрофорез. [99]

Качественный анализ ПСХ цветков липы:

В цветках липы идентифицировали сахара с помощью качественных реакций и методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Свободные сахара определяли реакцией Бертрана с реактивом Фелинга. Реакция давала положительный результат (красно-оранжевый осадок) – свободные сахара присутствовали в цветках липы. Наличие связанных сахаров подтверждали реакцией с реактивом Фелинга после гидролиза разбавленной серной кислотой. Наблюдали выпадение красно-оранжевого осадка меди (I) оксида. С помощью метода ТСХ идентифицировали фруктозу и глюкозу. [43]

Качественный анализ ПСХ слоевищ ламинарии:

Методом газовой хромато-масс-спектрометрии после метилирования были идентифицированы шесть моносахаридов: рамноза, фукоза, ксилоза, манноза, глюкоза и галактоза. С помощью инфракрасной (ИК) спектроскопии с Фурье-

преобразованием подтверждали наличие ПСХ. Высокоэффективная гелепроникающая хроматография использовалась для определения средней молекулярной массы ПСХ. [97, 110]

Качественный анализ ПСХ семян льна:

Газо-жидкостная хроматография использовалась для анализа нейтральных сахаров после гидролиза водорастворимых ПСХ семян льна [122]. С помощью ИК-спектроскопии устанавливали природу слизи семян льна [96].

Количественный анализ ПСХ цветков липы:

Имеются данные о гравиметрическом анализе ПСХ цветков липы (2,41–5,87 %) [44, 49]. Содержание суммы водорастворимых ПСХ определяли гравиметрическим методом (2,67–4,74 %) [11].

Методом ВЭЖХ определяли сумму содержания свободных сахаров в цветках липы – 0,96 %. Для анализа связанных сахаров применяли метод капиллярного электрофореза, при этом сумма связанных сахаров составила 31,11 %, содержание маннозы – 0,87–0,93 %, глюкозы – 0,27–9,35 %, ксилозы – 8,10–8,14 %, галактозы – 6,09–6,16 %, арабинозы – 6,66–6,70 %. [43]

С помощью метода ВЭЖХ установили, что углеводы в цветках липы представлены глюкозой – 3,6 %, ксилозой – 2,5 %, галактозой – 2,6 % и арабинозой – 2,1 %. Общее содержание углеводов в цветках липы – 10,8 %. [42]

Методом СФМ определена сумма восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу с пикриновой кислотой – от 2 до 17 % [32, 44].

Количественный анализ ПСХ слоевищ ламинарии:

Фенолсернокислый и антроновый методы СФМ-анализа могут использоваться для определения общего содержания сахаров с использованием глюкозы в качестве стандарта и содержания восстанавливающих сахаров в составе ПСХ. Метод с использованием BaCl_2 -желатина применяется для количественного определения сульфатных групп в ПСХ, а модифицированный карбазоловый метод – для определения содержания уроновых кислот. Ионообменная хроматография использовалась для определения содержания уроновых кислот (глюкуроновой и галактуроновой кислот). Обнаруженное содержание глюкуроновой кислоты

составило от 3,4 до 4,7 % в различных фракциях ПСХ, галактуроновой кислоты – 0,1–0,2 %. [97, 110]

Количественный анализ ПСХ семян льна:

Общее содержание водорастворимых ПСХ в семенах льна было установлено фенолсернокислым СФМ методом и варьировало от 3,6 до 8,0 % (среднее 6,2 %) [122]. Содержание цианогенных глюкозидов исследовали методом ВЭЖХ. Основным цианогенным соединением был диглюкозид линустатин в количестве 213–352 мг/100 г семян, что составляло 54–76 % от общего содержания цианогенных глюкозидов. Содержание неолинустатиона варьировалось от 91 до 203 мг/100 г семян. Линамарин также присутствовал в низких концентрациях (< 32 мг/100 г) [106]. Гель-проникающая хроматография с детектором многоуглового лазерного рассеяния света позволяет устанавливать содержание слизей семян льна [105].

1.4. Стандартизация цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна

Качественный анализ БАС цветков липы:

Основные группы биологически активных веществ в цветках липы определяют по-разному в Государственных фармакопеях представленных ниже стран:

В ГФ РФ XIV и XV издания:

- 1) ТСХ (рутин и кофейная кислота);
- 2) Качественная реакция: осаждение ПСХ спиртом 96 %. [7, 8]

В Государственной фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ) 2016 года – ТСХ (рутин, гиперозид, кофейная кислота) [6].

В Европейской фармакопее 11 издания – высокоэффективная ТСХ (гиперозид, рутин, хлорогеновая кислота) [10].

Качественный анализ БАС слоевищ ламинарии:

В ГФ РФ XIV издания используются следующие качественные реакции:

1) При обработке раствором крахмала и сульфаминовой кислоты появляется голубое окрашивание, указывающее на содержание йода не ниже 0,1 %;

2) Добавление 96 % этанола вызывает образование хлопьевидного осадка, что свидетельствует о присутствии ПСХ;

3) После проведения медно-тарtratной реакции и кислотного гидролиза образовывается оранжево-красный осадок, что подтверждает наличие восстанавливающих сахаров. [7]

В Китайской фармакопее 2020 года описана качественная реакция обнаружения йода: около 10 г измельчённых мелких кусочков слоевищ ламинарии замачивают в 200 мл воды на несколько часов, отфильтровывают и упаривают фильтрат примерно до 100 мл. К 2–3 мл концентрированного раствора добавляют 1 каплю азотной кислоты и несколько капель реактива нитрата серебра. Образуется жёлтый коллоидный осадок, слегка растворимый в растворе аммиака, но нерастворимый в азотной кислоте. [54]

Качественный анализ БАС семян льна:

Реакция с тушью → белые пятна клеток со слизью (ГФ РФ XIV издания) [7].

Согласно Китайской фармакопее, в семенах льна определяют наличие следующих БАС с помощью качественных реакций:

1) При замачивании семян льна в тёплой воде их эпидермальный слизистый слой набухает, образуя прозрачную слизистую оболочку вокруг семени. Это указывает на высокое содержание слизистых веществ (ПСХ) в семенах льна;

2) Проба с пикратной бумажкой → тест-полоска становится кирпично-красной. Этот тест указывает на присутствие цианогенных гликозидов, таких как линамарин, линустатин и неолинустатин, в семенах льна. При гидролизе цианогенные гликозиды могут освобождать синильную кислоту (HCN), которая реагирует с пикриновой кислотой, вызывая изменение цвета индикаторной бумаги. [54]

Количественный анализ БАС цветков липы:

В настоящее время в ГФ РФ определяется сумма флавоноидов в пересчете на кверцетин (СФМ при 425 нм) – не менее 0,5 % [6], а в ГФ РФ XV издания

аналогичный показатель имеет норму – не менее 0,4 % [8]. Ранее в ГФ РФ XIV издания устанавливалась норма для суммы восстанавливающих сахаров (в составе ПСХ) в пересчете на глюкозу – не менее 2 % (СФМ с пикриновой кислотой при 470 нм) [7].

Количественный анализ БАС слоевищ ламинарии:

В соответствии с ГФ РФ XIV издания и ГФ РБ определяют содержание йода титриметрическим методом – не менее 0,1 %; и ПСХ методом гравиметрии – не менее 8 % [6, 7].

В Китайской фармакопее описаны следующие показатели количественного определения:

- 1) Методом горячей экстракции с этанолом определяют экстрактивные вещества – не менее 7 %;
- 2) Титриметрически определяют содержание йода – не менее 0,2 %;
- 3) Методом СФМ с антроновым реактивом определяют суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на фукозу – не менее 2 %. [54]

Количественный анализ БАС семян льна:

По ГФ РФ XIV издания сумму ПСХ определяют гравиметрическим методом – не менее 7 % [7].

Согласно Китайской фармакопее методом газовой хроматографии в семенах льна устанавливают общее содержание жирных кислот в пересчёте линолевую и α -линоленовую кислоты – не менее 13 %. Также определяют экстрактивные вещества методом горячей экстракции с этанолом – не менее 15 %. [54]

1.5. Фармакологическая активность и применение в медицине цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна

Препараты цветков липы, семян льна, слоевищ ламинарии активно применяются при комплексном лечении различных заболеваний.

Фармакологическая активность и применение в медицине цветков липы:

Цветки липы традиционно используются как потогонное, противосудорожное, седативное, болеутоляющее, спазмолитическое, отхаркивающее, жаропонижающее, противовоспалительное, мочегонное и вяжущее средство [5, 17, 44].

На основе цветков липы выпускается широкий спектр ЛРП (Таблица 1), основными показаниями к применению которых являются: воспаление толстой кишки, стрессовые расстройства, грипп, язва желудка, инсомния, фарингит, воспаление слизистой желудка, ОРВИ, артериальная гипертензия, кашлевой синдром, воспаление бронхов, невротические расстройства, инфекции мочевыводящих путей, атеросклеротическое поражение сосудов [9, 17, 44, 47].

Фармакологическая активность и применение в медицине слоевищ ламинарии:

Слоевища ламинарии обладают многообразными фармакологическими свойствами. Благодаря богатому составу и широкому спектру действия ламинария применяется в медицине для лечения и профилактики заболеваний щитовидной железы, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, а также для укрепления иммунной системы и выведения токсинов из организма [9, 47].

Ламинария – природный источник преимущественно неорганических форм йода, что делает её эффективным средством для профилактики и лечения заболеваний, связанных с йододефицитными состояниями. Ламинария в числе других водорослей используется в качестве средства для лечения йододефицитного зоба и опухолевых заболеваний [88, 95].

В ламинарии содержится большое количество ПСХ, а также пигмент фукоксантин [61, 88]. Фукоксантин, содержащийся в слоевищах водорослей, проявляет антиоксидантную и противоопухолевую активность, а также способствует снижению концентрации жира в брюшной полости [61]. Стерины и витамины, содержащиеся в слоевищах ламинарии, стимулируют репарацию слизистых и тканей [61, 82, 101].

Продукты на основе ламинарии помогают нормализовать липидный профиль, снижая уровень холестерина и триглицеридов. Регулярное употребление снижает риск развития атеросклероза, стенокардии и инфаркта миокарда. [3, 100]

Фармакологическая активность и применение в медицине семян льна:

Лен, подобно пшенице, ячменю, кукурузе, сое и хлопчатнику, относится к группе самых древних возделываемых растений. Благодаря уникальному природному составу, семена льна издревле вызывали особый интерес как продукт функционального питания.

Они содержат разнообразные БАС, определяющие их лечебные свойства: богаты витаминами группы В, витамином Е, магнием, калием, цинком и селеном. 9 г семян льна содержат суточную норму δ -аминолевулиновой кислоты, 21–50 г семян льна содержат суточную норму витамина Е. [104]

Семена льна и препараты на их основе обладают комплексным фармакологическим действием: антиоксидантным, противоопухолевым, противовоспалительным, обволакивающим, антиатерогенным, иммуномодулирующим, слабительным, кардиопротекторным, гиполипидемическим и гипогликемическим действием [9, 47].

Антиоксидантная активность семян льна определяется содержанием лигнанов, токоферолов и полифенольных соединений, которые способны защищать клетки от действия свободных радикалов [63, 67]. Лигнаны также обладают фитоэстрогенным действием, регулируя гормональный баланс и снижая риск развития гормонозависимых опухолей [28].

В народной медицине отвары и настои из семян льна применяются для лечения колитов, запоров и эзофагитов, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, гастритов [12]. Благодаря их обволакивающим и противовоспалительным свойствам, они способствуют регенерации тканей и защищают слизистую оболочку от воздействия агрессивных факторов. Слизистые вещества в составе семян связывают тяжелые металлы и продукты обмена веществ, проявляя энтеросорбционную активность.

Повышенное содержание тирозина и фенилаланина (ароматических аминокислот) в белках семян льна благоприятно влияет на работу центральной нервной системы и поддерживает функции щитовидной железы.

ПСХ и жирные кислоты в составе семян льна стимулируют иммунную систему, повышая устойчивость организма к инфекциям.

Благодаря высокому содержанию полиненасыщенных жирных кислот, семена льна рекомендуются к использованию в качестве гипохолестеринемического средства, нормализуя липидный обмен и уменьшая риск развития атеросклероза, гипертонии и ишемической болезни сердца.

Льняное масло, получаемое из семян, широко используется в косметологии для улучшения состояния кожи, волос и ногтей, а также при дерматологических заболеваниях [12].

Рассматриваемые виды ЛРС широко применяются на территории Российской Федерации (РФ). По состоянию на 2025 год в РФ зарегистрированы 14 ЛРП на основе цветков липы, 14 – на основе слоевищ ламинарии и 9 – на основе семян льна (Таблица 1) [9, 44, 47].

Таблица 1 – Зарегистрированные в РФ ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна [9, 47]

Международное непатентованное наименование	ТН	ФВ	ФТГ	Фирма
Однокомпонентные ЛРП				
ЛРП цветков липы				
Липы цветки	Липы цветки	Цветки измельченные	Потогонное средство растительного происхождения	АО "Красногорсклексредства"; ООО Фирма "Здоровье"; ЗАО "Ст.-Медифарм"; ООО "Лек С+"; ПКФ "Фитофарм" (ООО); АО "Иван-чай"; ООО Фирма "Фито-Бот"
		Цветки- порошок		
ЛРП слоевищ ламинарии				
Ламинарии слоевища	Ламинарии слоевища (Морская капуста); Ламинарии слоевища- морская капуста	Слоевища измельченные ; сырье растительное; сырье растительное измельченное	Слабительное средство растительного происхождения	ЗАО "Аграрно- промышленная фирма "Фито-Эм"; ООО "Лек С+"; ООО Фирма "Здоровье"; АО "Красногорсклексредства"; АО "Ст.-Медифарм"; ПКФ "Фитофарм" (ООО)

Продолжение Таблицы 1

Ламинарии слоевищ липидно-йодный комплекс	Маммолайн	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Мастопатии средство лечения растительного происхождения	ООО "Объединенная фармацевтическая компания"
Ламинарии слоевища	Ламинарии экстракт густой	Субстанция	Слабительное средство растительного происхождения	ООО "Гиппократ"
Ламинарии слоевищ экстракт	Оковидит®	Гель для наружного применения	Кератопротекторное средство	ООО "Диоптра"
Ламинарии слоевища	Ламинарии экстракт сухой	Субстанция-порошок	Слабительное средство растительного происхождения	ЗАО "ВИФИТЕХ"
Ламинарии слоевища	Мамоклам®	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Мастопатии средство лечения растительного происхождения	ООО "Фитолон-Наука"
<i>ЛРП семян льна</i>				
Льна посевного семена	Льна семена; Льна посевного семена	Семена цельные	Обволакивающее средство растительного происхождения	ООО Фирма "Фито-Бот"; ООО Фирма "Здоровье"; АО "Красногорсклексредства"; ООО "Лек С+"; АО "Иванчай"; ООО "МФП "Сообщество "Магнолия"; АО "Ст.-Медифарм"; ПКФ "Фитофарм" (ООО)
<i>Многокомпонентные ЛРП</i>				
<i>ЛРП семян льна</i>				
Диклофенак + Левоментол + Метил-салицилат	Диклоран® Плюс	гель для наружного применения	Нестероидные противовоспалительные препараты	ООО "ДжейТНЛ"
<i>ЛРП слоевищ ламинарии</i>				
Витамин Е + Ламинарии слоевищ экстракт	Лимановит® Е	Раствор для приема внутрь, [спиртовой]	Общетонизирующее средство растительного происхождения	ООО "НИИМиС"
Ламинарии слоевищ экстракт + Облепихи крушино-видной плодов экстракт сухой	Гипоролам			ООО "БиоФармКомбинат"

Продолжение Таблицы 1

Цветки бессмертника песчаного+плоды боярышника+трава зверобоя продырявленного+плоды каштана конского+орех кедровый+плоды клюквы+плоды кориандра+слоев ища ламинарии+корн евища с корнями левзеи сафлоровидной+мед+листья мяты перечной+панток рин+листья подорожника большого+корне вища с корнями родиолы розовой+цветки ромашки аптечной+плоды рябины+корни солодки голой+трава тысячелистника обыкновенного+плоды шиповника+корн евища с корнями элеутерококка	Эвалар	Эликсир для приема внутри	Общетонизирующее средство растительного происхождения	ЗАО "ЭВАЛАР"
Примечание: ТН – торговое наименование; ФВ – форма выпуска; ФТГ – фармакотерапевтическая группа				

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературы показал, что ЛРС цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна входит в состав многочисленных, зарегистрированных на территории РФ, ЛРП. В том числе слоевища ламинарии и семена льна являются частью многокомпонентных ЛРП. Публично доступные источники описывают химический состав этих объектов, однако работ по изучению перехода БАС (с учётом их процентного содержания) из ЛРП в водные извлечения на их основе не выявлено.

2. По данным литературы, в цветках липы присутствуют дубильные и летучие вещества, ПСХ, флавоноиды, фенольные соединения; в слоевищах ламинарии найдены аминокислоты, макро- и микроэлементы, ПСХ, жирные кислоты, витамины, органически связанный йод; для семян льна характерны флавоноиды, липиды, витамины, слизи, белки и ПСХ. Однако подходы, используемые для стандартизации, не достаточно современны и эффективны.

3. В настоящее время основными методами анализа ПСХ в изучаемых объектах являются: гравиметрия, СФМ, ВЭЖХ, ТСХ, ИК-спектроскопия. Среди фармакопейных методов из ГФ РФ в настоящее время используются: спектрофотометрический метод определения содержания суммы флавоноидов в цветках липы, титриметрический метод определения содержания йода и гравиметрический метод определения содержания ПСХ в слоевищах ламинарии, гравиметрический метод определения содержания суммы ПСХ в семенах льна. Тем не менее обнаружены альтернативные методы анализа в Китайской фармакопее.

4. Цветки липы входят в состав однокомпонентных ЛРП и обеспечивают потогонное действие. Слоевища ламинарии входят в состав однокомпонентных ЛРП, обладающих слабительным действием за счёт наличия ПСХ в составе, кератопротекторным действием, а также данные ЛРП способны применяться в лечении мастопатии. В качестве общетонизирующих средств используют многокомпонентные ЛРП, содержащие в своём составе слоевища ламинарии.

Однокомпонентные ЛРП семян льна обладают обволакивающим действием за счёт наличия слизей и ПСХ. Многокомпонентный препарат Диклоран® Плюс включает в свой состав семена льна и относится к нестероидным противовоспалительным препаратам.

5. В связи с устаревшими подходами к стандартизации цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна необходимо обновить нормативную документацию на данные объекты и интегрировать методы современного физико-химического анализа, а также необходимо углублённо изучить состав БАС. Это позволит расширить области использования указанных объектов.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Сведения об объектах исследования

ЛРП слоевищ ламинарии, цветков липы и семян льна являлись объектами изучения. Образцы различных фирм (ООО Фирма «Здоровье», ООО Фирма «Фито-Бот», ПКФ "Фитофарм" (ООО) и АО «Красногорсклексредства») приобретали в аптечных сетях с 2022 по 2025 гг. ЛРП были представлены в виде фильтр-пакетов (сырьё порошок), а также в измельчённом и цельном виде.

2.2. Методы анализа, оборудование

С помощью методики из общей фармакопейной статьи (ОФС) ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары» ГФ РФ XV издания определяли сухой остаток водных извлечений цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна [36]. Исследование влажности ЛРП проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0007 ГФ РФ XV издания [37]. Готовили водные извлечения исследуемых объектов по ГФ РФ XV издания и в соответствии с инструкциями по применению [9, 19, 20, 22–27].

В работе использовали следующее вспомогательное оборудование:

- Аквадистиллятор электрический со встроенным накопителем Liston A 1110 (ООО «Листон», Россия);
- Спектрофотометр СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия);
- Система ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies, США);
- Электрическая плитка ECO-133HP (ECON, Япония);
- Ультразвуковая ванна ODA-LQ40 (ОДА Сервис, Россия);
- Центрифуга лабораторная Liston C 2202 (ООО «Листон», Россия);
- Баня водяная лабораторная WB-6 (Stegler, Китай);
- Насос вакуумный мембранный НВМ-0,33II ХС (ЗАО «БМТ», Россия);

- Весы аналитические неавтоматического действия GR-3000 (310 г/0,1 г), I класс точности (A&D Co.LTD, Япония);
- pH-метр SevenCompact S220 (Mettler Toledo, Швейцария);
- Шкаф сушильный Binder FD 53, 60 л, Avantgarde.Line, с принудительной конвекцией (BINDER GmbH, Германия);
- Дозаторы 1-канальные переменного объема 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 500–5000 мкл Rainin (Mettler Toledo, США).

2.3. Методы определения восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов и моносахаридов в составе полисахаридов

Для определения моносахаридов в составе ПСХ цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна использовали метод ТСХ. Применяли ТСХ-пластинку Merck с концентрирующей зоной и слоем силикагеля F₂₅₄ на алюминиевой подложке. Смесь бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:1) использовали в качестве подвижной фазы. С использованием реагентов классов чистоты «ч.» и «х.ч.» готовили растворы реактивов, подвижные фазы и растворители.

Для приготовления испытуемых растворов 5,0 г измельчённого сырья (не более 0,5 мм) экстрагировали на кипящей водяной бане два раза по 30 минут в конической колбе (250 мл) со шлифом с 10 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 100 мл воды; экстракты фильтровали через 5 слоёв марли в мерную колбу (250 мл), промывали марлю и доводили объём водой до метки, перемешивали (раствор А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещали 10,0 мл раствора А, прибавляли по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с pH 4,0–4,5. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата (раствор Б).

Растворы арабинозы, галактозы, галактурановой кислоты, глюкозы, глюкуроновой кислоты, ксилозы, маннозы, рамнозы в концентрации 5 мг/мл применяли в качестве стандартных образцов (СО).

Детектировали анилинфталатным реактивом в бутаноле, насыщенном водой.

На линию старта пластинки наносили по 20 мкл каждого из испытуемых растворов и по 10 мкл растворов СО (Таблица 2).

Таблица 2 – СО и растворы для аппликации на ТСХ-пластинку

Объём, мкл	Состав растворов и водных извлечений	Краткое обозначение
20	Цветки липы – водное извлечение	Испытуемый раствор №1
20	Слоевища ламинарии – водное извлечение	Испытуемый раствор №2
20	Семена льна – водное извлечение	Испытуемый раствор №3
10	Раствор СО арабинозы	СО №1
10	Раствор СО галактозы	СО №2
10	Раствор СО галактурановой кислоты	СО №3
10	Раствор СО глюкозы	СО №4
10	Раствор СО глюкуроновой кислоты	СО №5
10	Раствор СО ксилозы	СО №6
10	Раствор СО маннозы	СО №7
10	Раствор СО рамнозы	СО №8
10	Раствор СО арабинозы, галактозы, галактурановой кислоты, глюкозы, глюкуроновой кислоты, ксилозы, маннозы и рамнозы	Смесь СО №9

Когда фронт подвижной фазы достигал 90 % длины пластинки, её вынимали и высушивали на воздухе до удаления следов растворителей в течение 1 часа, затем пластинку опрыскивали раствором анилинфталатного реактива и 10 мин выдерживали в сушильном шкафу при 100–105 °С; далее в условиях комнатного освещения просматривали пластинку.

Также определяли суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе ПСХ на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) с использованием методики, описанной в главе 4 и в Приложении А.

Суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в водном извлечении в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot N \cdot P \cdot 100}{D_0 \cdot V \cdot N_0 \cdot 100},$$

- где D – оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 – оптическая плотность раствора СО глюкозы;
 N – объём колбы, в которой разводят испытуемый раствор после центрифугирования, мл;
 V – аликвота водного извлечения для спиртового осаждения сахаров, мл;
 m_0 – навеска фармакопейного СО глюкозы, г;
 N_0 – объём колбы, в которой разводят СО глюкозы, мл.
 P – чистота фармакопейного СО глюкозы, %

2.4. Метод определения флавоноидов

Определение флавоноидов проводили методом УЭЖХ-УФ/МС/МС в режиме градиентного элюирования. Регистрировали позитивные и отрицательные ионы. Экстракцию проводили 70% водным метанолом на водяной ванне. В публикациях приведены более подробные условия [46, 114, 117]. С использованием спектрофотометра СФ-2000 измеряли сумму флавоноидов (в пересчёте на рутин). Глава 4 и Приложение А содержат развернутое описание методики.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в водном извлечении в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot V_0 \cdot N \cdot P \cdot 100}{D_0 \cdot V \cdot N_0 \cdot 100},$$

- где D – оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;
 m_0 – навеска СО рутина, г;
 V – объём аликвоты водного извлечения, мл;

- V_0 – объём аликвоты раствора СО рутина, мл;
 P – чистота СО рутина, %;
 N – объём колбы, в которой разводят испытуемый раствор с раствором алюминия хлорида 2 % в спирте 96 %, мл;
 N_0 – объём колб, в которых разводят СО рутина, мл.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в водном извлечении вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{D \cdot N}{D_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot V},$$

- где D – оптическая плотность испытуемого раствора;
 $D_{1\text{ см}}^{1\%}$ – Удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;
 N – объём колбы, в которой разводят испытуемый раствор с раствором алюминия хлорида 2 % в спирте 96 %, мл;
 V – объём аликвоты водного извлечения, мл;

2.5. Метод определения аминокислот

Определение аминокислот проводили методом ВЭЖХ. Таблица 3 описывает пробоподготовку образцов.

Таблица 3 – Пробоподготовка образцов для ВЭЖХ

ЛРП	Водные извлечения	
	Инструкция по медицинскому применению ЛРП	ОФС «Настои и отвары»
1,0 г навески в мерной колбе 100 мл + раствор 0,1 Н НСl (30°C) до половины объёма → ультразвуковая ванна (5 мин); после охлаждения доводят раствором 0,1 Н НСl до метки, перемешивают	Готовят водное извлечение по инструкции по медицинскому применению ЛРП [9]	Готовят водное извлечение по фармакопейной методике (сырьё:вода = 1:10) [36]

Продолжение Таблицы 3

Отбирают 1 мл полученного раствора → 10 мин центрифугируют (14000 об/мин);
Для проведения анализа надосадочную жидкость переносят в виалу.

ВЭЖХ выполняли с флуориметрическим и спектрофотометрическим детектированием (диодно-матричный детектор) на капиллярной колонке Agilent Hypersil AA-ODS C18 (200 × 2,1 мм, 5 мкм) при температуре колонки 40 °С. Подвижную фазу А готовили растворением 5,5 г дигидрофосфата натрия в 1000 мл очищенной воды с последующим добавлением NaOH 7,8 %, подвижную фазу В — смешением 200 мл метанола, 200 мл ацетонитрила и 100 мл очищенной воды. Введение образца с автосэмплера осуществляли по последовательной программе: в петлю набирали 5 мкл боратного буфера, затем 1 мкл ортофталевого альдегида, 1 мкл образца, проводили смешивание, добавляли 1 мкл раствора 9-флуоренилметилхлорформиата (ФМОС) и вновь смешивали. Объёмная скорость потока варьировала в пределах 0,1–5,0 мл/мин. Таблица 4 описывает программу градиентного элюирования.

Таблица 4 – Параметры градиентного элюирования

Подвижная фаза А	Подвижная фаза В	Продолжительность, мин
90	10	0
90	10	2
45	55	18
0	100	23
90	10	24
90	10	30

При $\lambda_{ex} = 340$ нм и $\lambda_{em} = 450$ нм проводили флуориметрические измерения. При $\lambda = 338$ нм (референсная $\lambda = 390$ нм) и $\lambda = 262$ нм (референсная $\lambda = 324$ нм) регистрировали поглощение в УФ-области.

2.6. Метод определения жирнокислотного состава

Методом ГХ-ПИД определяли жирные кислоты (ЖК) в цветках липы, слоевищах ламинарии и семенах льна.

Пробоподготовка ЛРП. 100 мл смеси хлороформа и метанола в объёмном соотношении 2:1 и навеску ЛРП (10 г) герметизировали в пробирке на 200 мл. После 1,5 ч встряхивания с помощью шейкера, приливали 30 мл воды дистиллированной, перемешивали и в течение 5 мин проводили центрифугирование (3000 об/мин).

Во взвешенные круглодонные конические колбы с постоянной массой помещали липофильную фракцию (хлороформный нижний слой). На ротационном испарителе при вакууме удаляли хлороформ после того, как предварительно им трижды промывали образцы. Объединённые хлороформные экстракты упаривали до постоянной массы (испаритель Heidolph, Германия; вакуумный насос PC3001 VARIOpro, Vacuumbrand, Германия). Затем в каждую колбу добавляли 30 мл гексана. Колбы перемешивали вихревым способом и переносили содержимое в предварительно взвешенные центрифужные пробирки. Пробирки центрифугировали и липофильную фракцию в гексане переносили в новые предварительно взвешенные круглодонные колбы. Промывку гексаном проводили трижды, чтобы количественно перенести содержимое в пробирки и выделить истинную липофильную фракцию из хлороформной фракции. Пробирки с остатком образца (экстрагированного хлороформом) высушивали при 105 °С до постоянной массы. Общее содержание липофильной фракции определяли следующим образом:

Масса липофильной фракции, % = (масса высушенного хлороформного экстракта – масса высушенного остатка образца, промытого гексаном) * 100 / общая масса образца.

Объединенные гексановые фракции в круглодонных колбах выпаривали до постоянной массы, а липофильные фракции использовали для анализа ЖК.

Навески липофильной фракции (около 10 мг) помещали в пробирки с винтовыми крышками (массу фиксировали), приливали 20 мкл ацетилхлорида, 20 мкл гексана и 2 мл метанола. Пробирки герметично закрывали, кратко интенсивно встряхивали и выдерживали в сушильном шкафу для метилирования в течение 1 часа при 80 °С. Охлаждали образцы и приливали к ним 100 мкл воды, 2,5 мл гексана. Затем 10 секунд встряхивали. В результате расслаивания метиловые эфиры концентрируются в гексановом слое, из которого 1 мл переносят в виалы и приступают к ГХ-анализу.

Параметры ГХ-ПВД:

Детектор	Пламенно-ионизационный;
Условия разделения	100 °С (3 мин) → ↑ 3 °С/мин → 200 °С (3 мин) → ↑ 3 °С/мин → 240 °С (6 мин);
Газ-носитель	Азот, скорость 1,65 мл/мин;
Температурный режим инжектора	200 °С;
Деление потока	50:1;
Температурный режим детектора	240 °С;
Объем пробы	1 мкл.

С помощью ПО Agilent ChemStation Rev.B.04.03 проводили регистрацию сигналов. Для определения индексов удерживания и коэффициентов чувствительности детектора использовали смеси метиловых эфиров ЖК в дихлорметане 37 Component FAME Mix (SUPELCO, США), смеси метиловых эфиров линолевой и линоленовой кислот (Sigma-aldrich, США). Анализ результатов проводили в Microsoft Excel 2019.

2.7. Метод определения компонентного состава летучих веществ

Методом ГХ/МС определяли компоненты летучей фракции объектов исследования. Для пробоподготовки 3 г образца гомогенизировали с 7 мл воды, смесь перемешивали, герметично укупоривали и нагревали 30 мин при 110 °С на плитке. Прочие параметры приведены в публикациях [16, 55].

2.8. Метод определения элементного состава

Методом ИСП-МС анализировали элементный состав исследуемых объектов. Экспериментальные условия детально приведены в публикации [116].

2.9. Метод определения антирадикальной активности

Антирадикальную активность водных извлечений измеряли *in vitro* методом, основанном на реакции взаимодействия свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ) с веществами, обладающими антирадикальной активностью. Условия приведены в ряде работ [13, 118].

К 2,5 мл рабочего раствора ДФПГ, приготовленного в концентрации 49,25 мкг/мл, прибавляли 2,5 мл изучаемого образца в различных разведениях, выдерживали смеси 30 минут в темноте и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия) относительно 96 % спирта при $\lambda=520$ нм. Антирадикальную активность (АРА) исследуемых образцов определяли с помощью следующей формулы:

$$АРА = \frac{(A_0 - A) * 100 \%}{A_0},$$

где A_0 – оптическая плотность ДФПГ (рабочий раствор); A – оптическая плотность ДФПГ после реакции с раствором исследуемого образца.

2.10. Валидация методов и обработка полученных результатов

На основе ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV издания выполняли валидацию методов определения содержания групп БАС [34].

Статистическую обработку результатов исследований проводили согласно требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [35] с использованием ПО Microsoft Office Excel 2019.

2.11. Реактивы и стандартные образцы

В работе применяли химически чистые СО (Таблица 5), а также растворители, реагенты надлежащего качества, соответствующие требованиям нормативной документации (НД) [8].

Таблица 5 – Перечень использованных СО

Название	Фирма	Чистота, %	Номер CAS
Моносахариды и их производные			
Манноза	Sigma-Aldrich	≥ 99,0	3458-28-4
Глюкуроновая кислота		≥ 98,0	6556-12-3
Арабиноза		≥ 98,0	10323-20-3
Рамноза		≥ 99,0	10030-85-0
Глюкоза		≥ 99,5	50-99-7
Галактоза		≥ 98,0	59-23-4
Ксилоза		≥ 99,0	58-86-6
Галактуроновая кислота		≥ 97,0	91510-62-2
ЖК			
FAME 37 Component mix – стандартная смесь в дихлорметане	Sigma-Aldrich	≥ 98,0	–
C11-МЭ – СО метилового эфира ундекановой кислоты			
Стандарт триглицерида тридекановой кислоты (ТАГС11)	Toronto Research Chemicals	≥ 98,0	–
Фенольные кислоты и флавоноиды			
Коричная кислота	Sigma-Aldrich	≥ 99,0	140-10-3
Лютеолин		≥ 98,0	491-70-3
Таксифолин		≥ 85,0	480-18-2
Хлорогеновая кислота		≥ 95,0	327-97-9

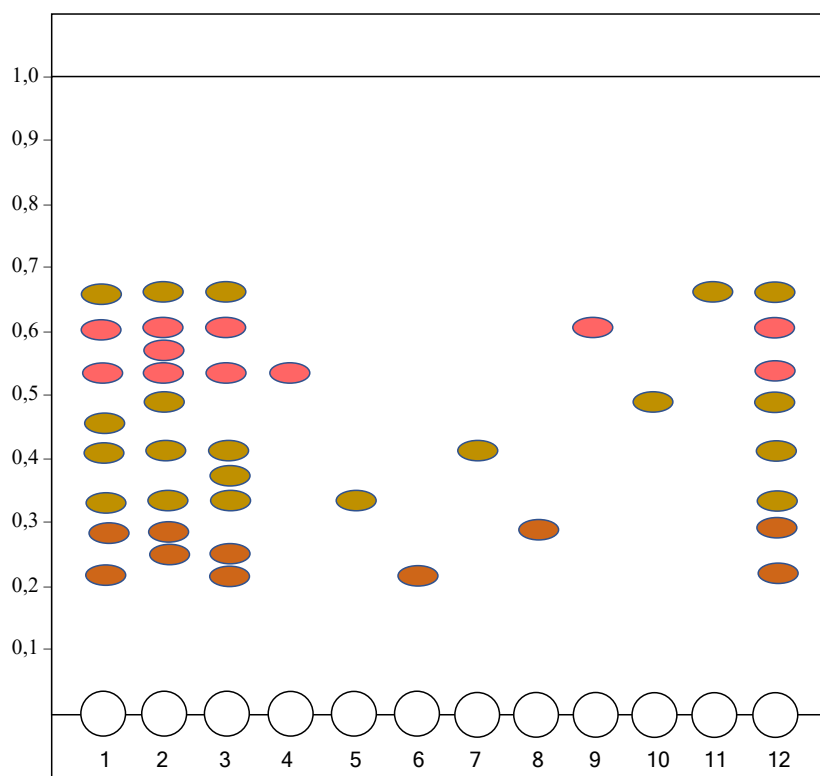
Продолжение Таблицы 5

Кверцетин	Sigma-Aldrich	≥ 95,0	117-39-5
Галловая кислота		≥ 97,5	149-91-7
Рутин		≥ 95,0	153-18-4
Феруловая кислота		≥ 99,0	537-98-4
Гиперозид		≥ 97,0	482-36-0
Кемпферол		≥ 97,0	520-18-3
Кофейная кислота		≥ 98,0	331-39-5
Аминокислоты			
Набор СО аминокислот	Sigma-Aldrich	≥ 98,0	—

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

3.1. Идентификация моносахаридов в составе полисахаридов

В результате проведения ТСХ-анализа после кислотного гидролиза ПСХ изучаемых объектов на хроматограмме были идентифицированы моносахариды, что свидетельствует об их наличии в составе ПСХ (Рисунок 3).



Детектирование при комнатном свете

1 – липы цветки; 2 – ламинарии слоевища; 3 – льна семена;
4 – СО №1; 5 – СО №2; 6 – СО №3; 7 – СО №4; 8 – СО №5;
9 – СО №6; 10 – СО №7; 11 – СО №8; 12 – смесь СО №9

Рисунок 3 – Хроматограмма водных извлечений из ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна

На хроматограмме водных извлечений из цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна фиксируются сходные по интенсивности и уровню зоны адсорбции: две коричневато-зелёные, две светло-красные и одна зеленовато-жёлтая зона в

верхней и средней частях пластинки, что доказывает наличие большинства сахаров (рамноза ($R_f=0,67$), ксилоза ($R_f=0,61$), арабиноза ($R_f=0,53$), глюкоза ($R_f=0,41$), галактоза ($R_f=0,33$)) в изучаемых ЛРП.

В средней трети пластинки для раствора цветков липы отмечена одна коричневая зона ($R_f=0,46$). В нижней трети выявлены две коричневато-светло-красные зоны адсорбции, совпадающие по положению с зонами галактуроновой ($R_f=0,22$) и глюкуроновой ($R_f=0,29$) кислот. Это подтверждает их присутствие в ЛРП цветков липы.

В средней и нижней зонах пластинки для слоевищ ламинарии отмечены коричневато-светло-красная и коричневая полосы адсорбции, которые соответствуют уровням глюкуроновой кислоты ($R_f=0,29$) и маннозы ($R_f=0,49$), что свидетельствует об их присутствии. Дополнительно в верхней и нижней третях хроматограммы регистрируются участки коричневато-светло-красного ($R_f=0,25$) и светло-красного ($R_f=0,57$) окрашивания.

Для семян льна в средней трети пластинки выявлена коричневато-зелёная зона адсорбции ($R_f=0,38$); в нижней трети отмечены две коричневато-светло-красные зоны ($R_f=0,26$ и $R_f=0,22$), соответствующие положению галактуроновой кислоты, что подтверждает её наличие.

Таким образом с помощью метода ТСХ было доказано наличие моносахаридов в составе ПСХ в семенах льна, слоевищах ламинарии, цветках липы.

3.2. Идентификация флавоноидов

По данным научной литературы, в составе цветков липы выявлены следующие флавоноиды: кемпферол, кверцетин, мирицетин и их гликозиды (в основном кемпферол-3-О- β D-(6"-Е-р-кумароил)-глюкопиранозид — тилирозид). Кроме того, присутствуют различные гидроксикоричные кислоты (кофеиновая кислота, хлорогеновая кислота и п-кумаровая кислота) [46, 72]. Также известно, что

полифенолы, являющиеся одной из групп природных соединений, встречающихся в липе, имеют подтверждённое диагностическое значение при изучении изменчивости и хемофенетических особенностей растительного сырья. Некоторые хемофенетические маркеры, в том числе линарин, были предложены для рода *Tilia* [120].

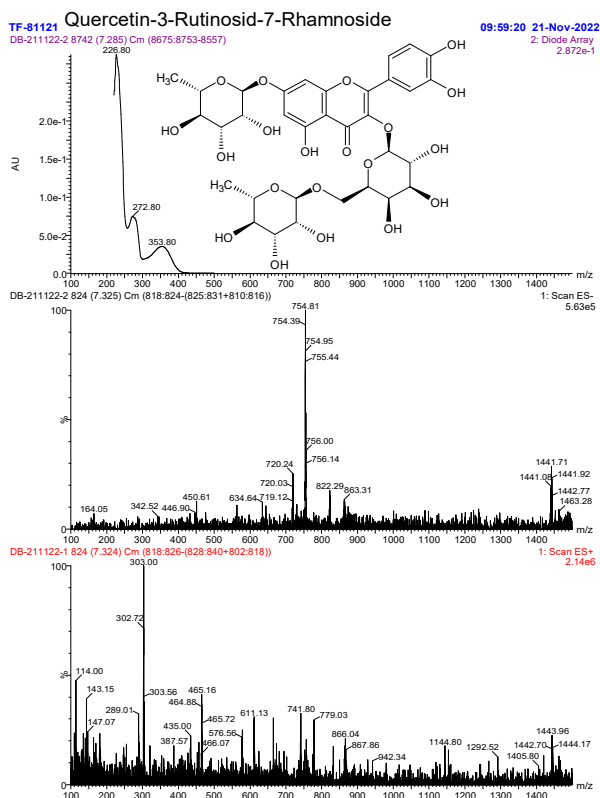
Несмотря на высокую степень научной изученности цветков липы, совершенствование подходов к стандартизации остается актуальной проблемой [62, 108]. Одной из задач стандартизации является поиск высокоспецифичных маркерных соединений, которые служат для идентификации данного объекта. Для совершенствования действующей НД необходимо исследовать состав флавоноидов цветков липы.

Для слоевищ ламинарии двух фармакопейных видов: ламинарии японской – *Laminaria japonica* Aresch. и ламинарии сахаристой – *Laminaria saccharina* L. сведения о составе флавоноидов отсутствовали, поэтому была сформулирована задача идентифицировать флавоноиды и подтвердить или опровергнуть их наличие в слоевищах ламинарии.

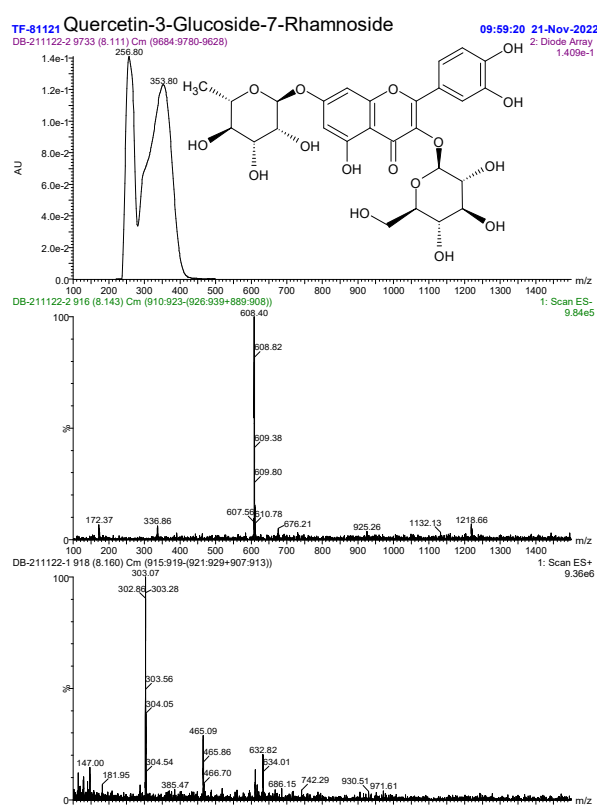
В литературных источниках содержатся сведения о содержании в семенах льна посевного группы цианогенгликозидов и лигнанов [40, 68]. В связи с этим наша задача заключалась в идентификации и установлении состава флавоноидов, в том числе и данных групп.

В ходе анализа был получен ряд хроматограмм и масс-спектров спиртоводных извлечений цветков липы (Рисунки 4–10). Пики с временем удерживания ($T_{уд.}$) 7.26, 8.11, 8.73, 9.25, 10.47, 10.87, 11.64 и 12.36 минут содержат одинаковый фрагмент с массой 302, сходный УФ-спектр с максимумом около 350 нм и являются производными кверцетина. Позиции гликозилирования и углеводный состав были выбраны на основании анализа литературных данных. Пики с $T_{уд.}$ 8.26, 9.45, 10.14, 10.87, 10.70 и 11.31 минут содержат одинаковый фрагмент с массой 286, сходный УФ-спектр с максимумом около 340 нм и являются по литературным данным производными кемпферола. Позиции гликозилирования и углеводный состав также были выбраны на основании анализа литературных данных. Пик с $T_{уд.}$ 15.33

минут содержит фрагмент с массой 284 и УФ-спектр с максимумом 334 нм. На основании этого можно предположить, что этот компонент является производным прунетина, который упоминается в литературе. Позиция гликозилирования была выбрана на основании анализа литературных данных, а углеводный состав предложен по аналогии с другими компонентами смеси.

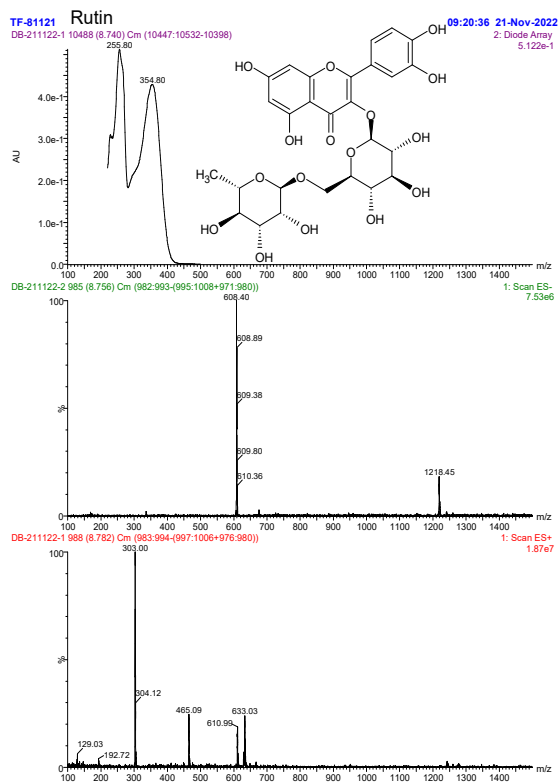


А

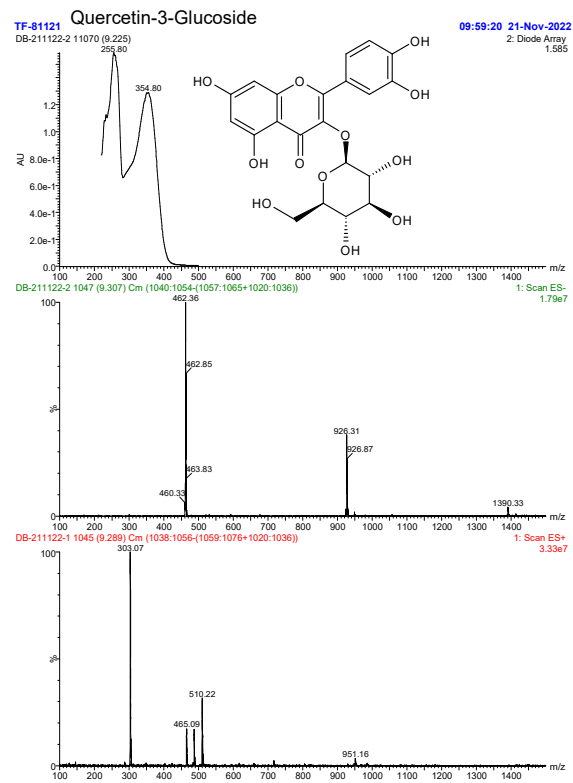


Б

Рисунок 4 – Спектральные характеристики кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозида ($T_{уд.} = 7,26$ минут, $m/z = 756$) (А), кверцетин-3-глюкозид-7-рамнозида ($T_{уд.} = 8,11$ минут, $m/z = 610$) (Б)

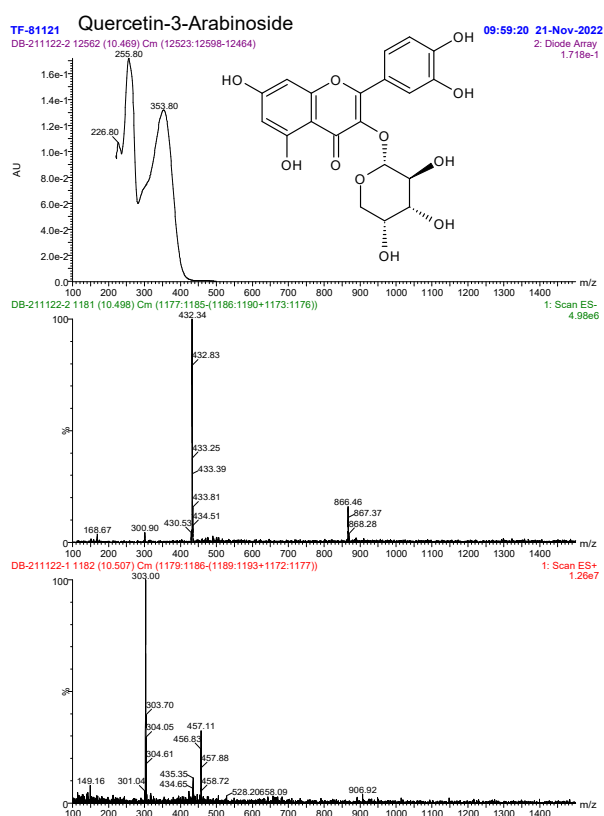


А

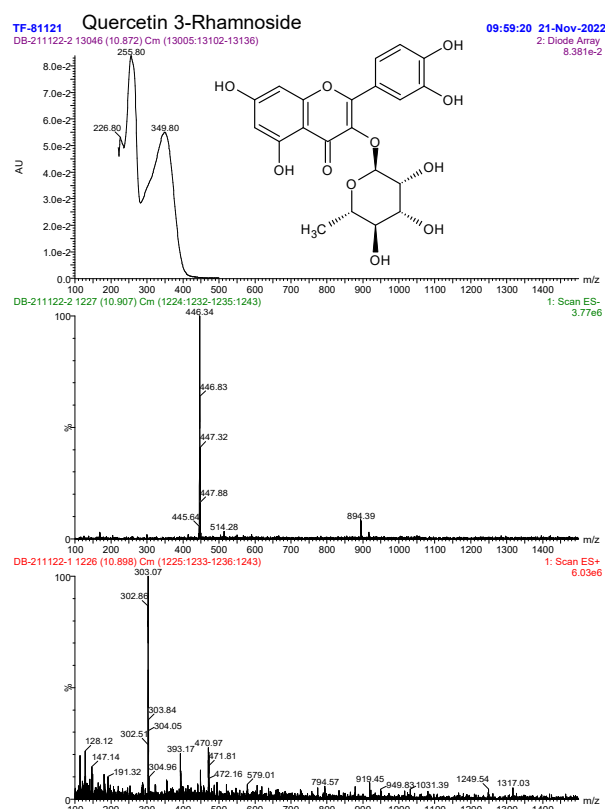


Б

Рисунок 5 – Спектральные характеристики рутина ($T_{уд.} = 8,73$ минут, $m/z = 610$) (А), кверцетин-3-глюкозида ($T_{уд.} = 9,25$ минут, $m/z = 464$) (Б)

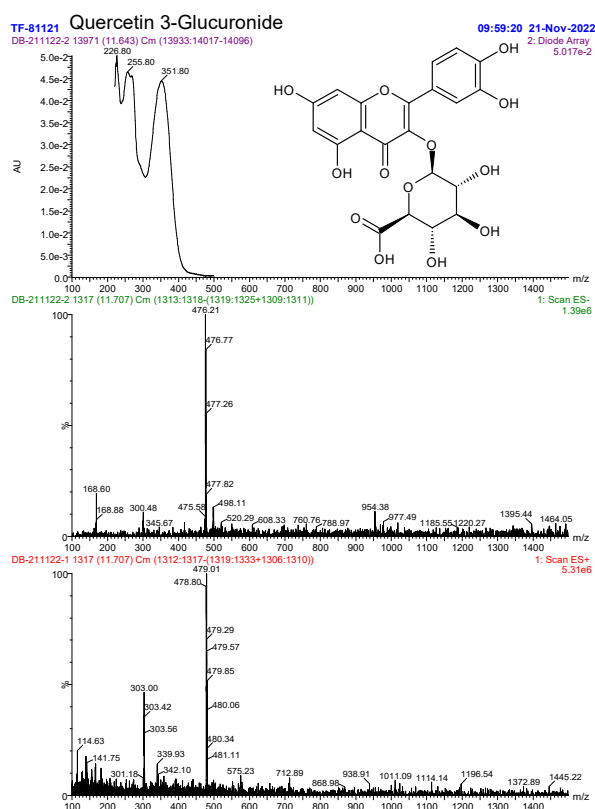


А

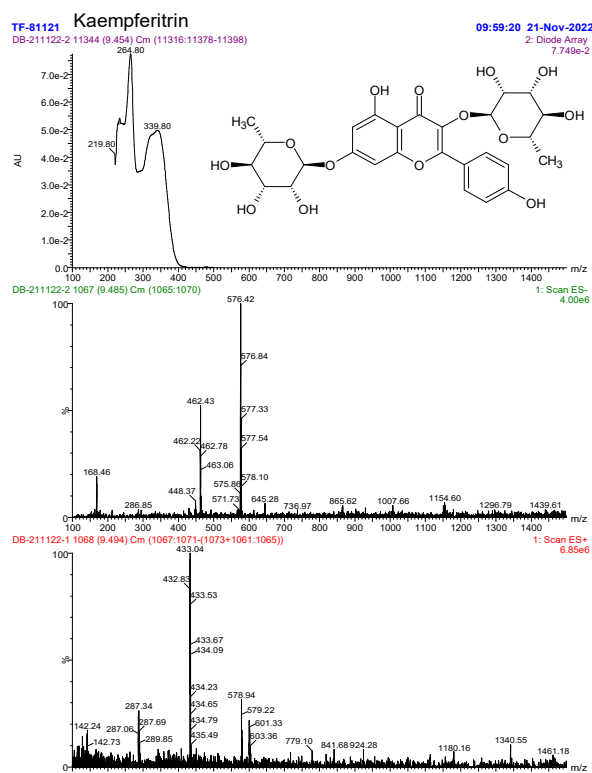


Б

Рисунок 6 – Спектральные характеристики кверцетин-3-арабинозида ($T_{уд.} = 10,47$ минут, $m/z = 434$) (А), кверцетин 3-рамнозида ($T_{уд.} = 10,87$ минут, $m/z = 448$) (Б)

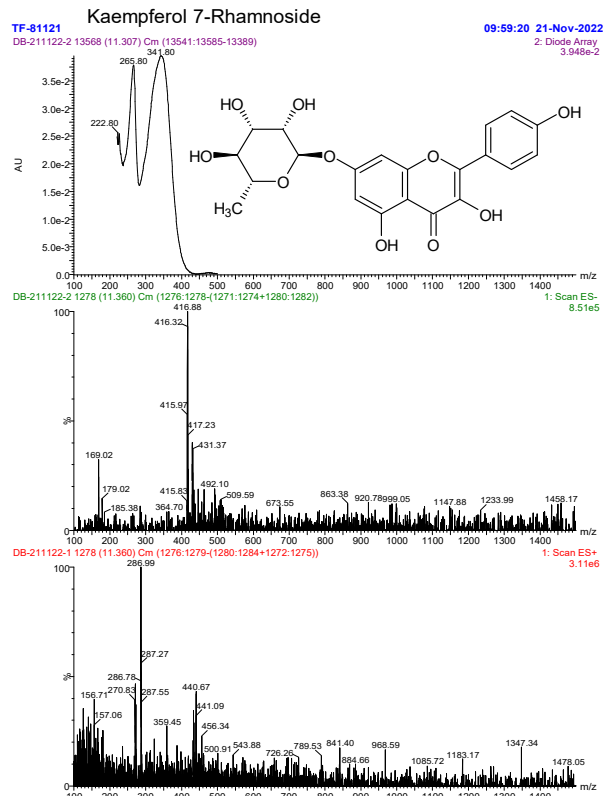
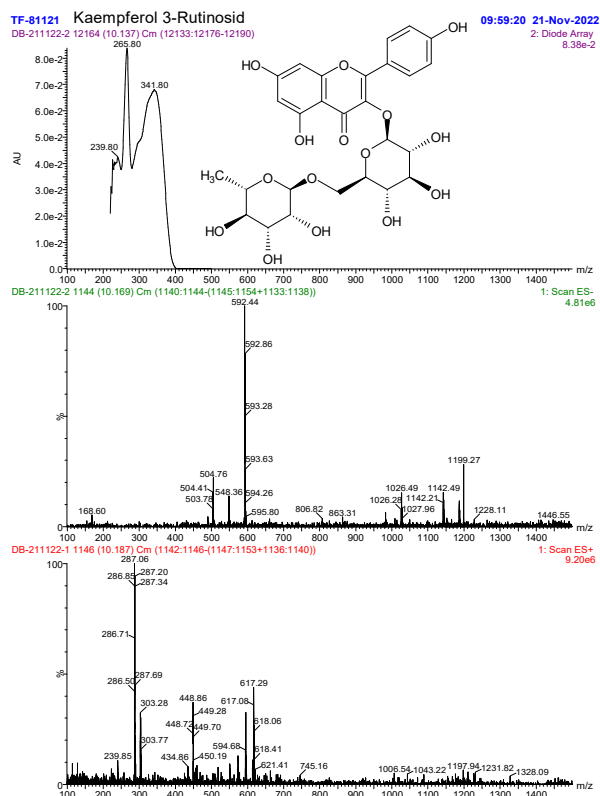


А



Б

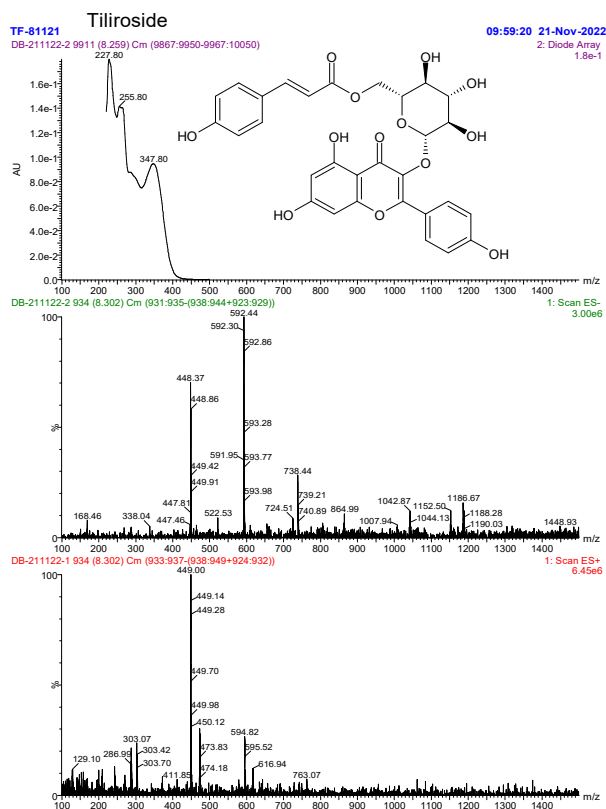
Рисунок 7 – Спектральные характеристики кверцетин 3-глюкуронида ($T_{уд.} = 11,64$ минут, $m/z = 478$) (А), кверцетин 3-рамнозида ($T_{уд.} = 10,87$ минут, $m/z = 448$) (Б)



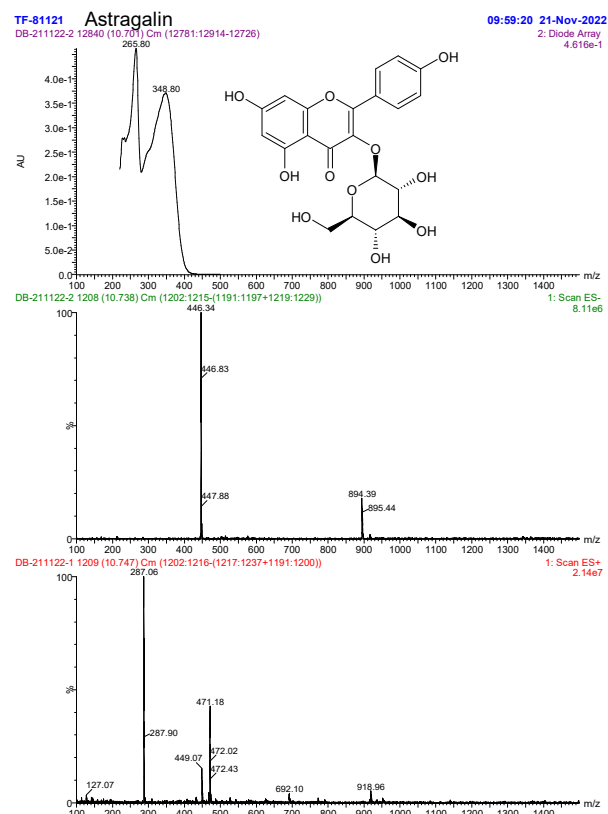
А

Б

Рисунок 8 – Спектральные характеристики кемпферол 3-рутинозида ($T_{уд.} = 10,14$ минут, $m/z = 594$) (А), кемпферол 7-рамнозида ($T_{уд.} = 11,31$ минут, $m/z = 432$) (Б)



А



Б

Рисунок 9 – Спектральные характеристики тилирозида ($T_{уд.} = 8,26$ минут, $m/z = 594$) (А), астрагалина ($T_{уд.} = 10,70$ минут, $m/z = 448$) (Б)

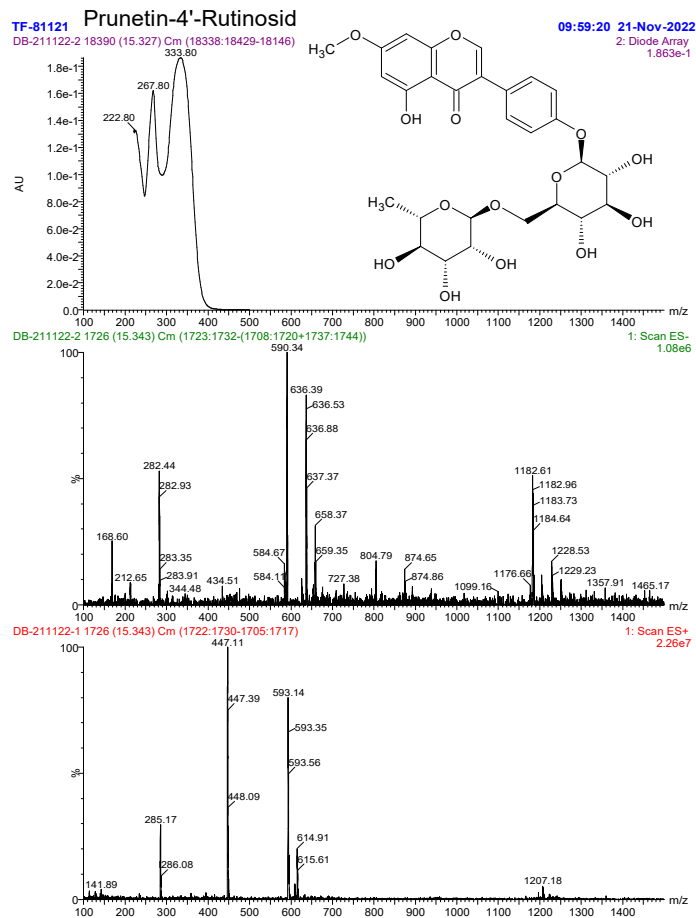


Рисунок 10 – Спектральные характеристики прунетин-4'-рутинозида ($T_{уд.} = 15,33$ минут, $m/z = 592$)

В процессе исследований были получены хроматограммы спирто-водных извлечений слоевищ ламинарии (Рисунки 11, 12). В образце наблюдали пики только низкой интенсивности на всех длинах волн. Видны компоненты, которые не удерживаются на обращенно-фазных колонках из-за их гидрофильности. Ни одна из заявленных в литературе структур не была идентифицирована среди обнаруженных компонентов. [113]

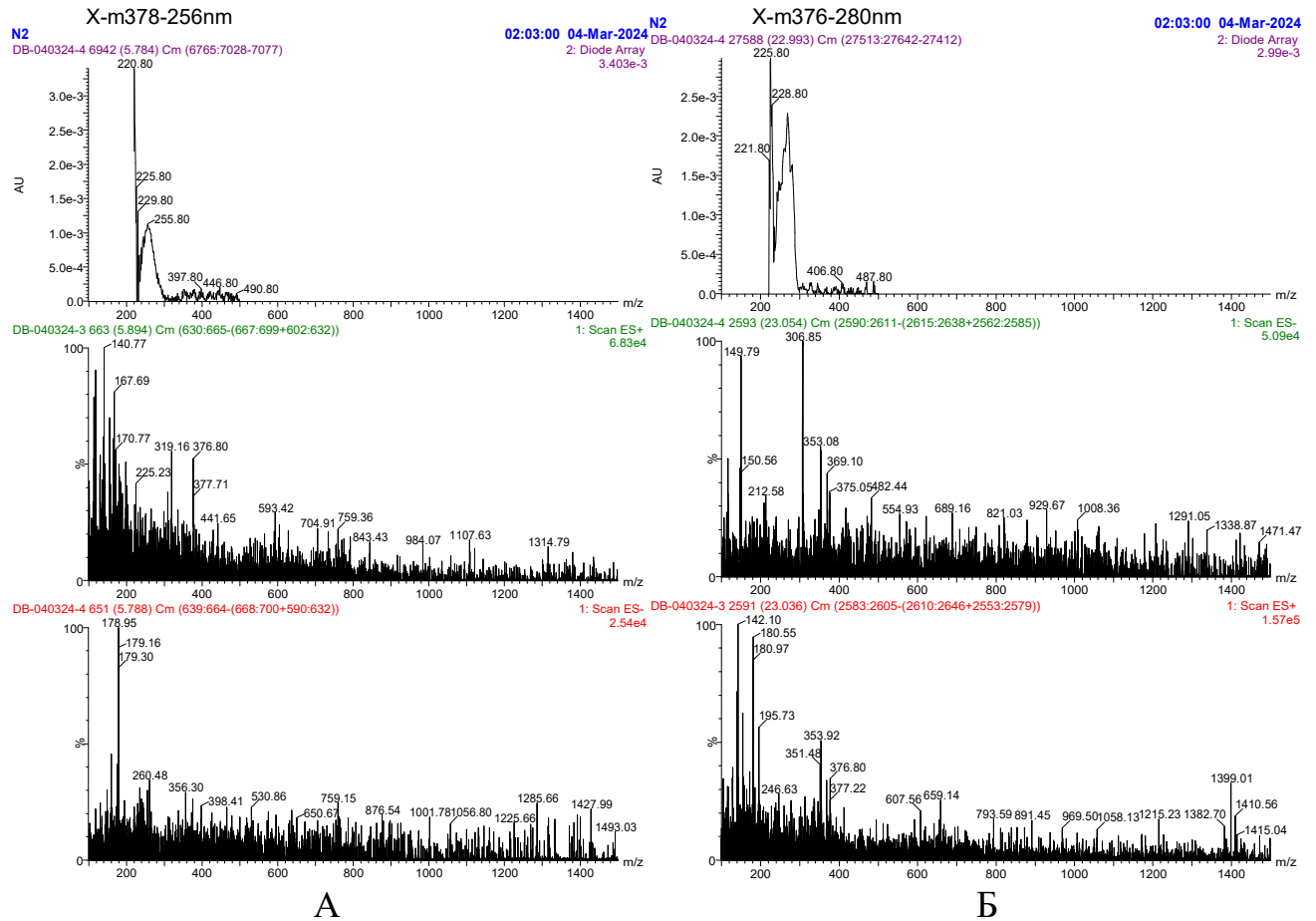


Рисунок 11 – Спектральные характеристики X-m378-256nm ($T_{уд.} = 5,79$ минут, $m/z = 378$) (А), X-m376-280nm ($T_{уд.} = 22,99$ минут, $m/z = 376$) (Б)

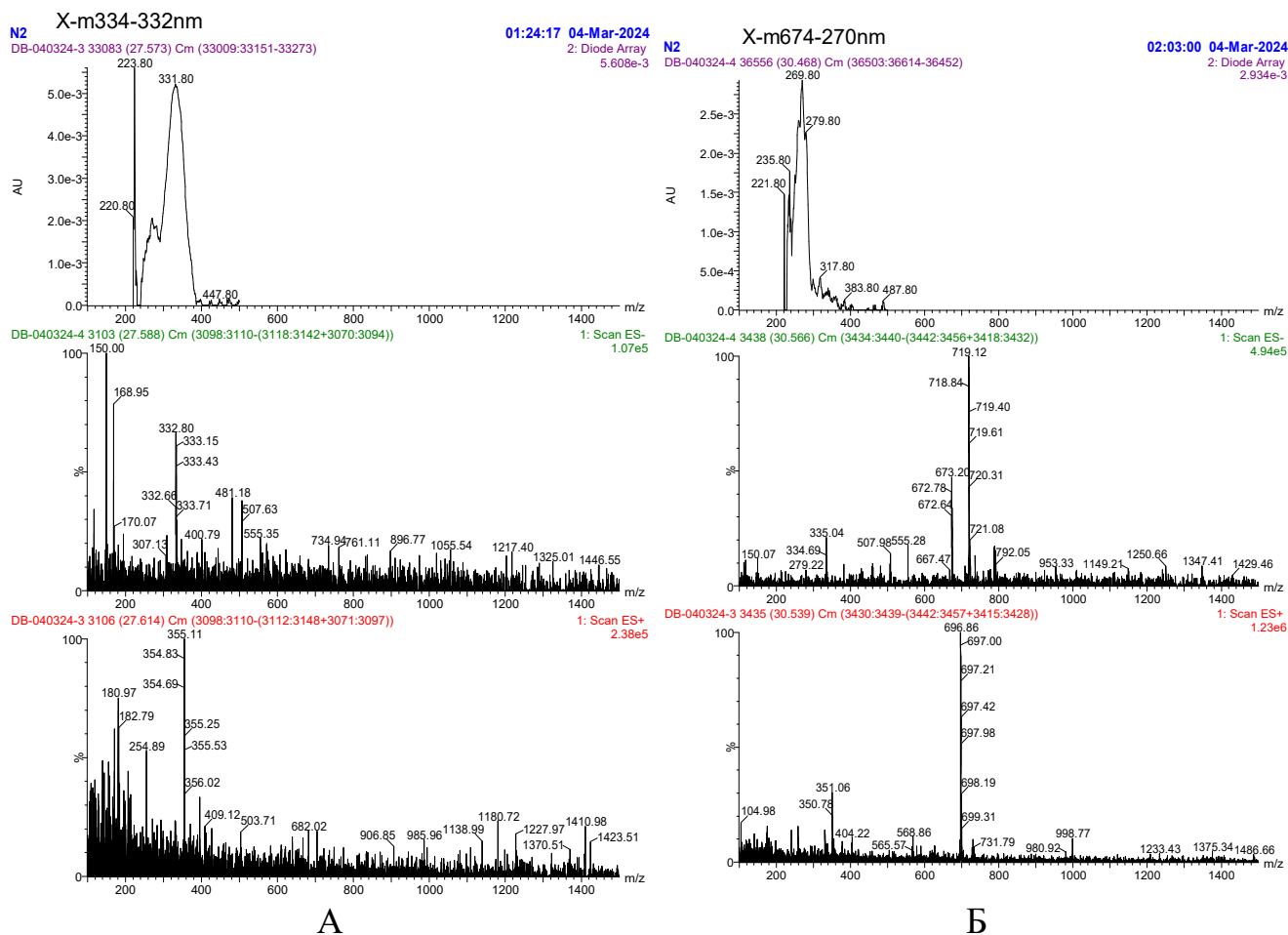


Рисунок 12 – Спектральные характеристики X-m334-332nm ($T_{уд.} = 27,56$ минут, $m/z = 334$) (А), X-m674-270nm ($T_{уд.} = 30,47$ минут, $m/z = 674$) (Б)

В результате анализа получили следующие хроматограммы спирто-водных извлечений из семян льна (Рисунок 13). Из всех заявленных в литературе цианогенгликозидов на полученных хроматограммах обнаружен только пик неолинустины с молекулярной массой 423. Поскольку такие соединения не имеют УФ-поглощения, то пик на УФ-хроматограммах с таким $T_{уд.}$ отсутствует, а обнаружить их можно только масс-хроматограммах. Остальные заявленные цианогенгликозиды либо не удерживаются на колонке и выходят в мёртвое время, либо отсутствуют в образце.

Все остальные, заявленные в литературе компоненты обнаружены не были, а для ряда пиков не удалось подобрать подходящую структуру. Кроме того, для всех пиков характерна низкая интенсивность, а для ряда УФ-пиков не удалось

обнаружить масс-спектры, что тоже может быть связано с недостаточной концентрацией в образце.

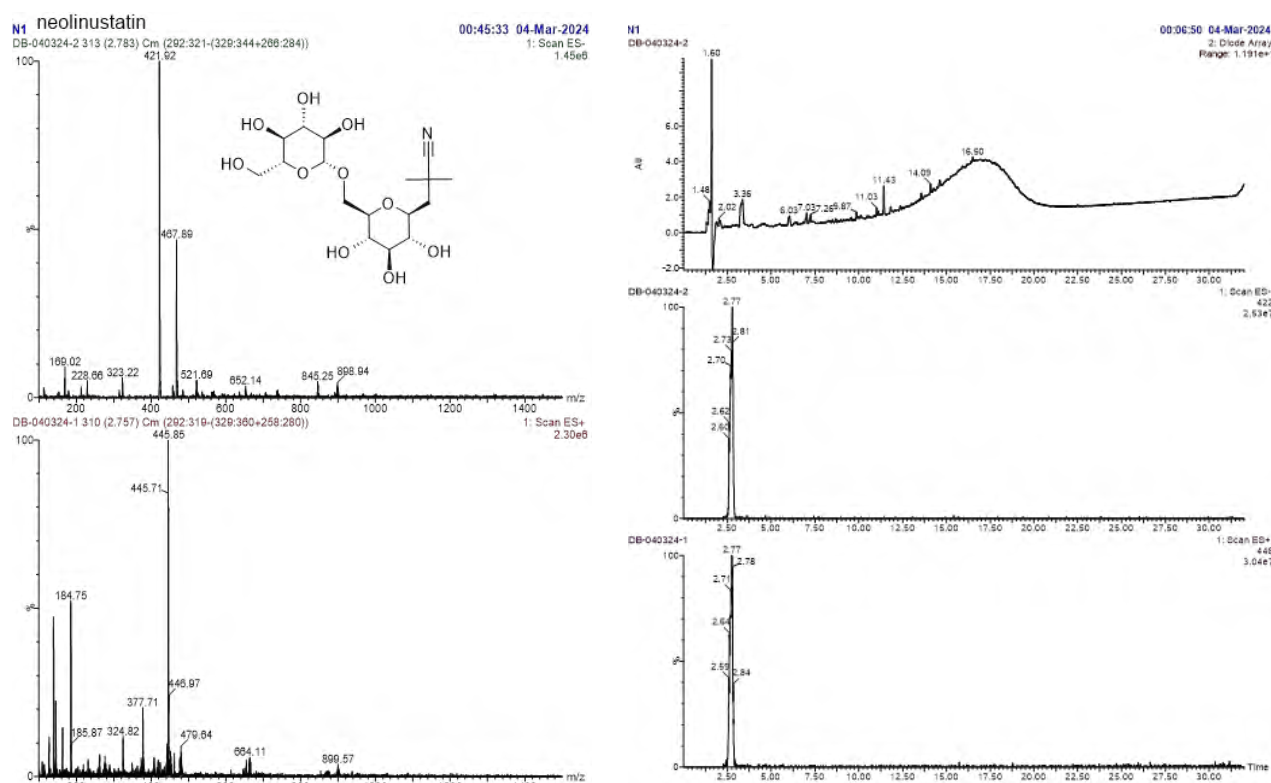


Рисунок 13 – Спектральные характеристики неолинустиатина ($T_{уд.} = 2,78$ минут, $m/z = 423$)

По данным УЭЖХ-УФ/МС/МС в цветках липы выявлен следующий набор флавоноидов: кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид, кверцетин-3-глюкозид-7-рамнозид, тилирозид, рутин, кверцетин-3-глюкозид, кемпферитрин, кемпферол 3-рутинозид, кверцетин-3-арабинозид, астрагалин, кверцетин 3-рамнозид, кемпферол 7-рамнозид, кверцетин 3-глюкуронид, прунетин-4'-рутинозид (Таблица 6) [46, 112]. В семенах льна посевного был обнаружен неолинустиатин – цианогенный гликозид.

Таблица 6 – Идентифицированные флавоноиды цветков липы

№	Группа БАС		Наименование соединения
1.	Флавонолы	Производные кверцетина	кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид, кверцетин-3-глюкозид-7-рамнозид, рутин, кверцетин-3-глюкозид, кверцетин-3-арабинозид, кверцетин 3-рамнозид, кверцетин 3-глюкуронид

Продолжение Таблицы 6

	Производные кемпферола	кемпферитрин, кемпферол 3-рутинозид, кемпферол 7-рамнозид, тилирозид, астрагалин
2.	Изофлавоны	прунетин-4'-рутинозид

Полученные результаты всех объектов исследования согласуются с данными литературы [40, 46, 68]. Гликозиды кверцетина и кемпферола являются специфичными и могут использоваться при стандартизации цветков липы.

3.3. Определение аминокислотного состава

В результате ВЭЖХ-анализа аминокислот ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и водных извлечений на основе данных ЛРП получены хроматограммы, которые представлены на Рисунках 14–20.

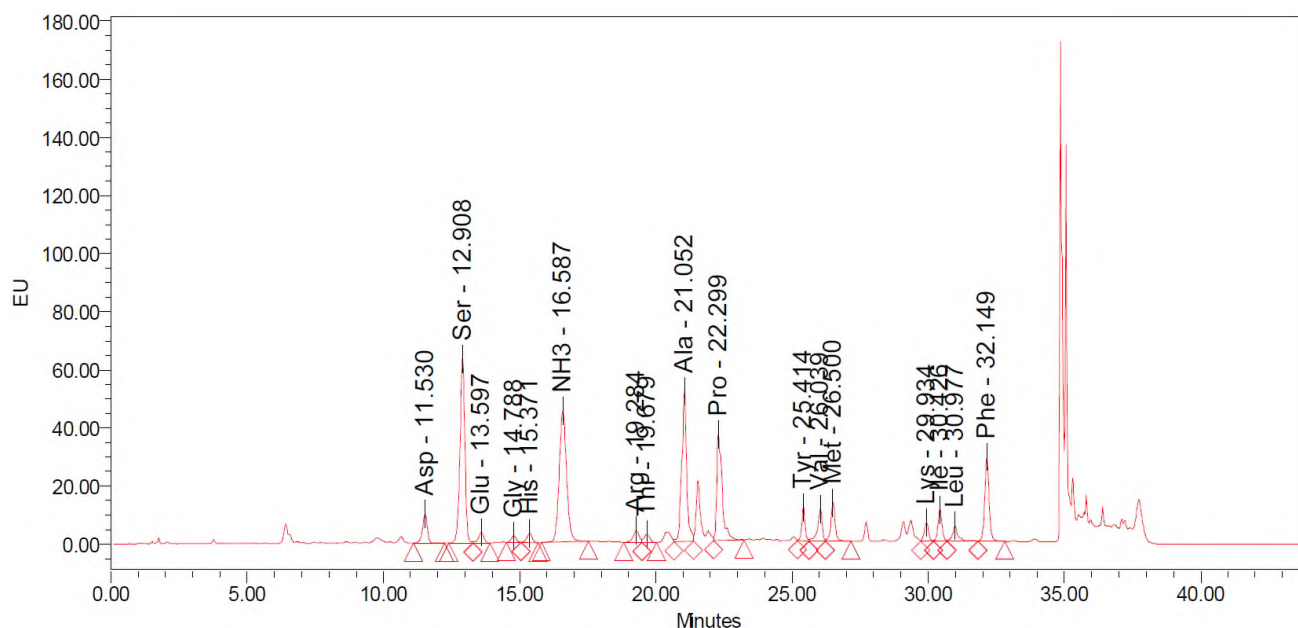


Рисунок 14 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в ЛРП цветков липы

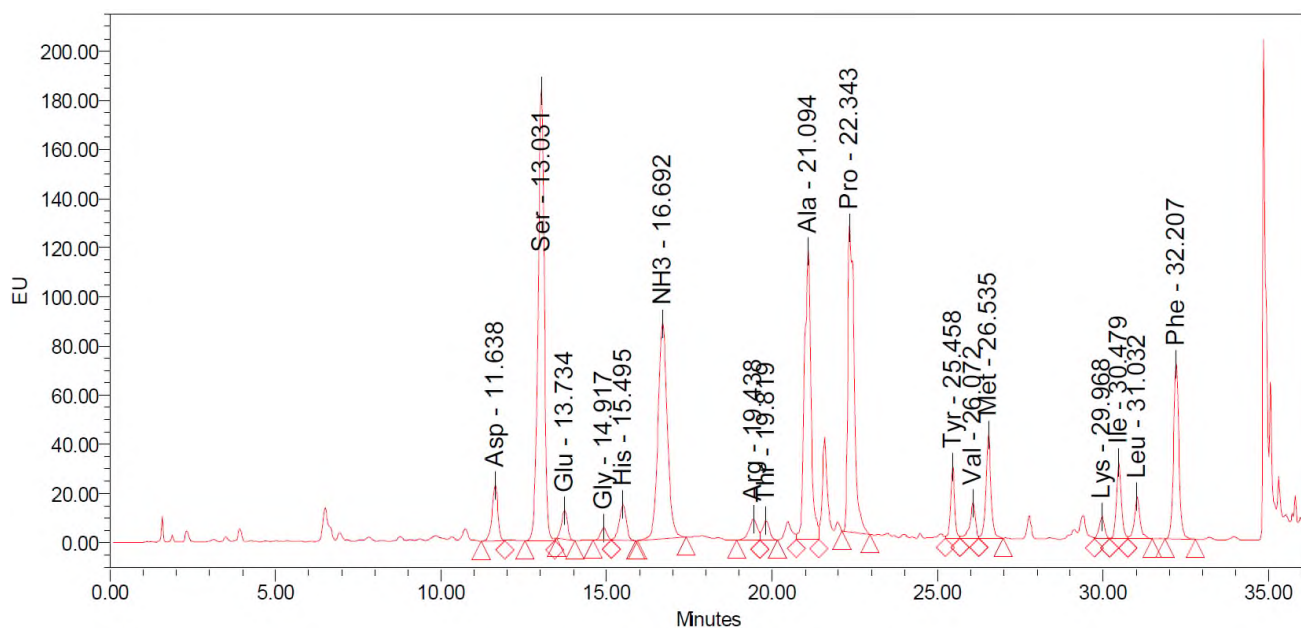


Рисунок 15 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в водном извлечении цветков липы, приготовленном согласно инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата

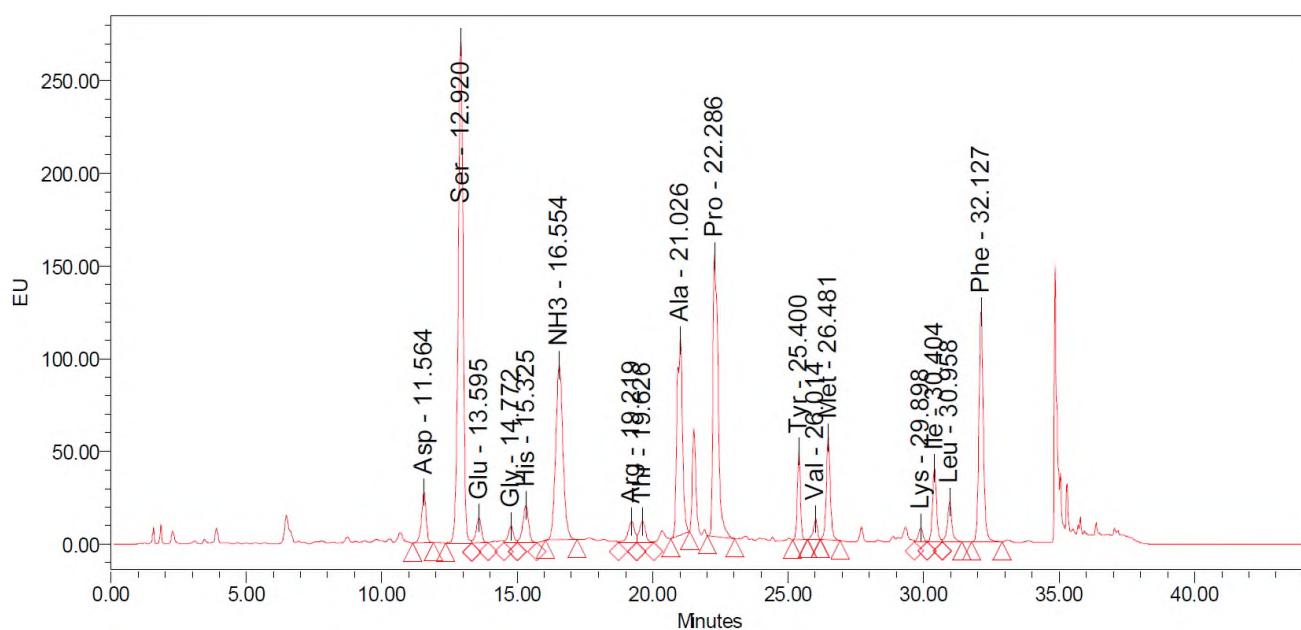


Рисунок 16 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в водном извлечении цветков липы, приготовленном согласно ГФ РФ XV издания ОФС «Настои и отвары»

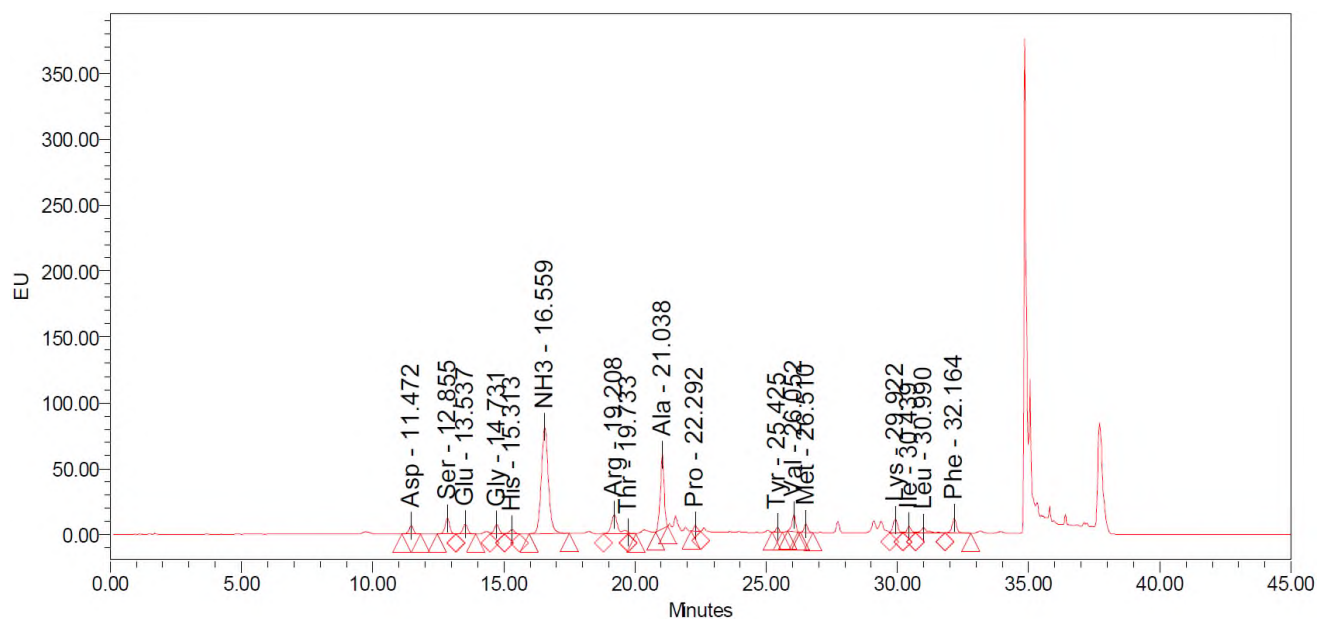


Рисунок 17 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в ЛРП семян льна

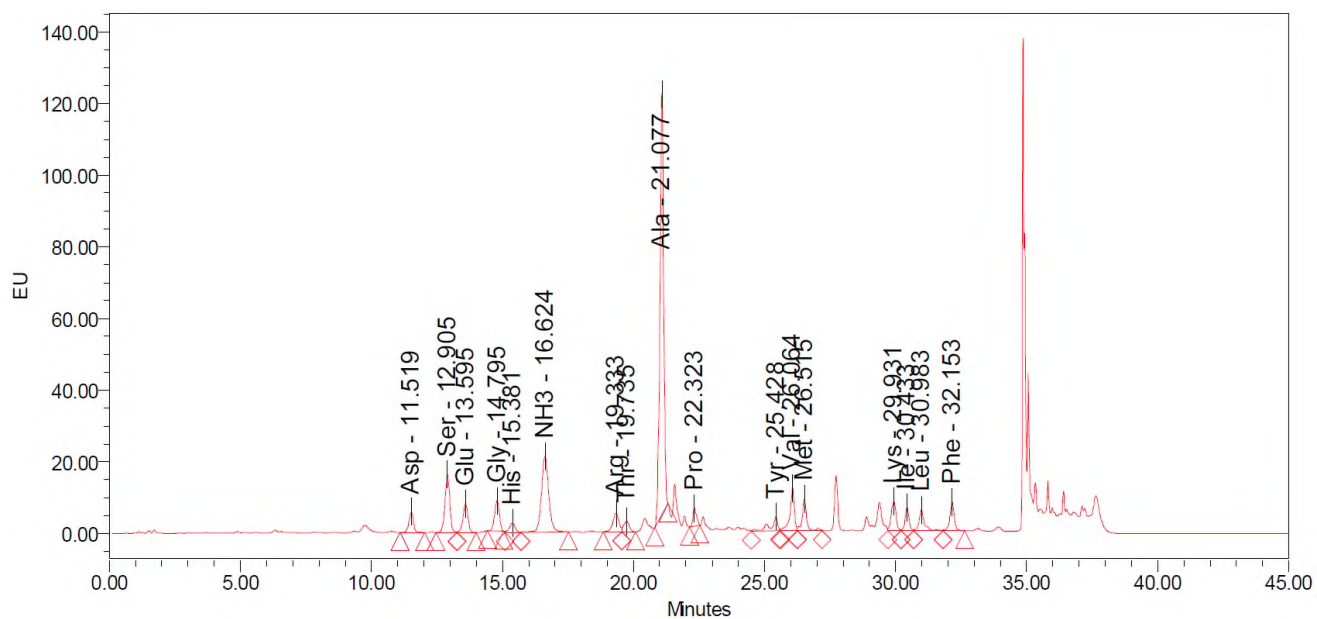


Рисунок 18 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в водном извлечении семян льна, приготовленном согласно инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата

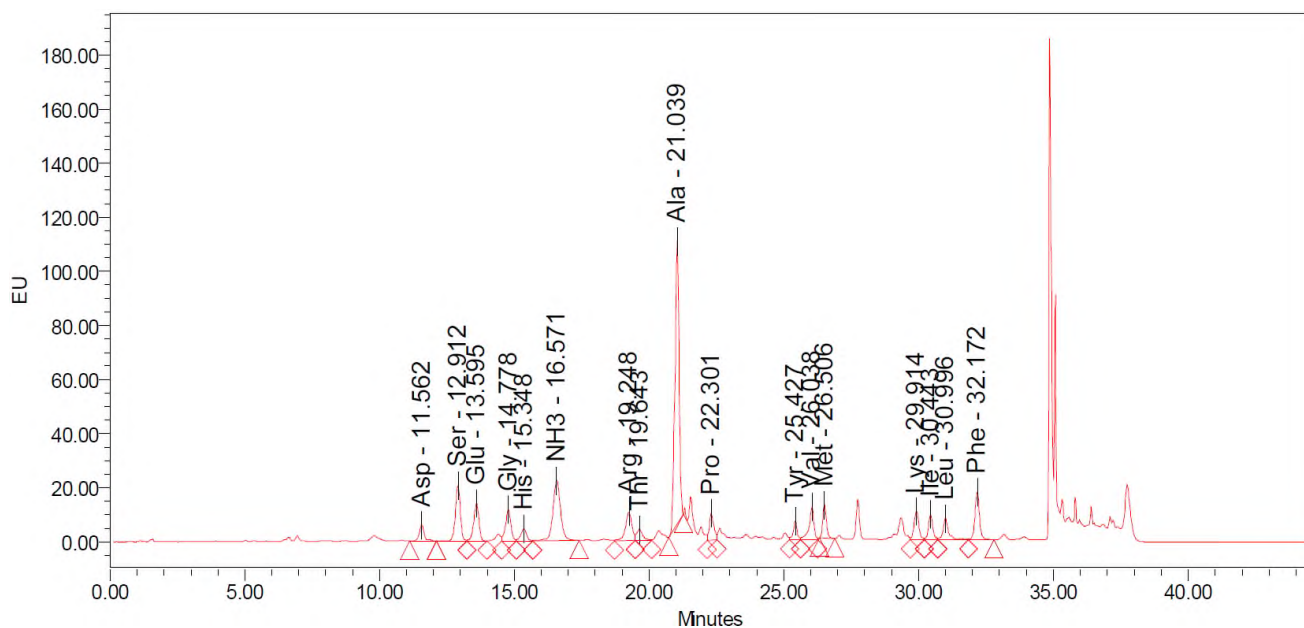


Рисунок 19 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в водном извлечении семян льна, приготовленном согласно ГФ РФ XV издания ОФС «Настои и отвары»

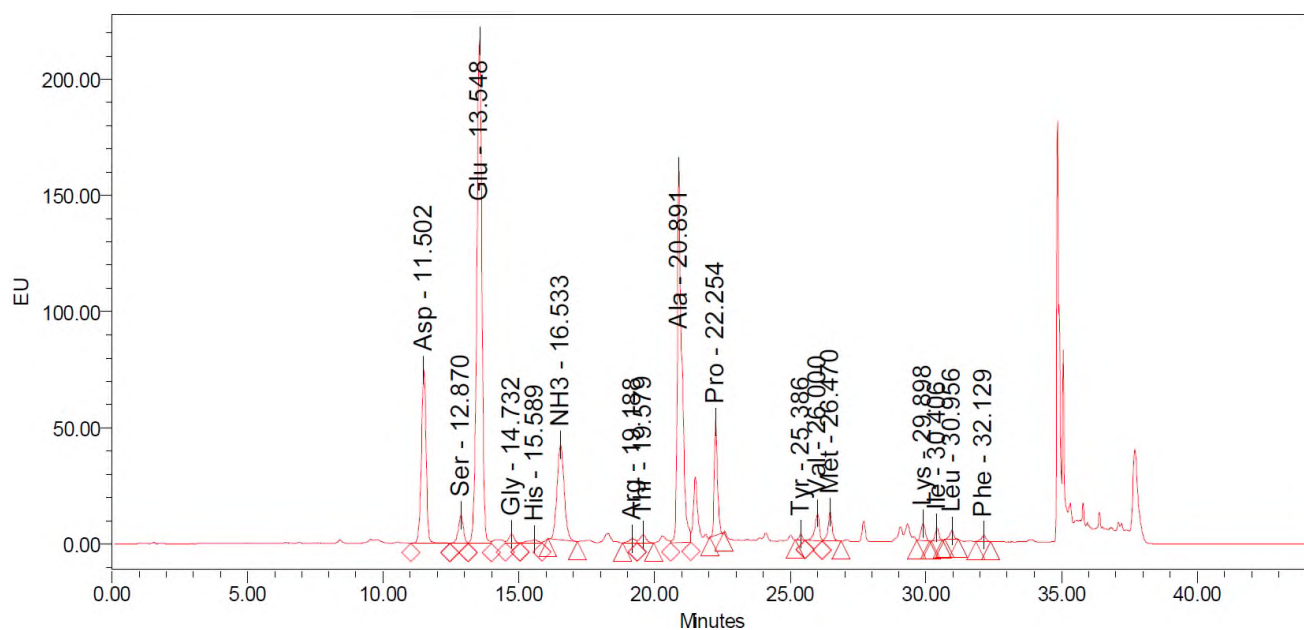


Рисунок 20 – ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот в ЛРП слоевищ ламинарии

В результате проведения анализа ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и водных извлечений на основе данных ЛРП в каждом образце было обнаружено 16 аминокислот, 7 из которых являются незаменимыми (фенилаланин, метионин, лизин, валин, изолейцин, треонин, лейцин), 2 – условно незаменимыми (гистидин, аргинин) аминокислотами (Таблицы 7, 8, 9).

Таблица 7 – Содержание аминокислот в ЛРП цветков липы и водных извлечениях

Наименование	Содержание, мг/100 г (М + m, n=3)		
	ЛРП цветков липы	Водное извлечение (1)	Водное извлечение (2)
Аспарагиновая кислота	25,27 ± 0,09	7,11 ± 0,08	14,26 ± 0,16
Серин	106,54 ± 1,07	47,49 ± 0,41	77,62 ± 0,37
Глутаминовая кислота	23,20 ± 0,10	4,94 ± 0,03	9,40 ± 0,10
Глицин	2,85 ± 0,15	1,28 ± 0,02	1,64 ± 0,05
Гистидин	8,47 ± 0,11	6,05 ± 0,14	10,31 ± 0,11
Аргинин	10,92 ± 0,76	3,39 ± 0,12	5,97 ± 0,06
Треонин	4,94 ± 0,06	2,33 ± 0,07	3,46 ± 0,04
Аланин	14,95 ± 0,63	3,66 ± 0,15	9,24 ± 0,08
Пролин	96,73 ± 0,98	40,44 ± 0,18	79,94 ± 0,68
Тирозин	14,84 ± 0,56	5,97 ± 0,06	9,24 ± 0,27
Валин	7,91 ± 0,13	0,74 ± 0,02	2,51 ± 0,05
Метионин	13,35 ± 0,73	5,56 ± 0,05	9,94 ± 0,31
Лизин	9,34 ± 0,36	1,22 ± 0,02	3,40 ± 0,09
Изолейцин	5,87 ± 0,23	2,22 ± 0,03	4,12 ± 0,10
Лейцин	4,09 ± 0,15	1,37 ± 0,07	2,60 ± 0,04
Фенилаланин	17,36 ± 0,14	7,89 ± 0,10	10,53 ± 0,97
Сумма аминокислот	366,61 ± 3,17	141,68 ± 1,21	254,18 ± 2,26
Примечание: Водное извлечение (1) – изготовлено по методике, указанной в инструкции по медицинскому применению ЛРП (10 г сырья на 200 мл воды (1:20)); Водное извлечение (2) – изготовлено по методике, указанной в ОФС «Настои и отвары» ГФ РФ XV издания (5 г сырья на 50 мл воды (1:10))			

Таблица 8 – Содержание аминокислот в ЛРП слоевищ ламинарии

Наименование	Содержание, мг/100 г (М + m, n=3)
	ЛРП слоевищ ламинарии
Аспарагиновая кислота	193,91 ± 1,62
Серин	21,22 ± 0,35
Глутаминовая кислота	770,28 ± 2,54
Глицин	5,65 ± 0,45
Гистидин	7,17 ± 0,60
Аргинин	4,94 ± 0,32
Треонин	6,75 ± 0,48
Аланин	45,56 ± 0,74
Пролин	79,83 ± 0,80
Тирозин	3,50 ± 0,13
Валин	8,67 ± 0,72
Метионин	13,07 ± 0,95
Лизин	10,82 ± 0,76
Изолейцин	2,62 ± 0,12
Лейцин	2,04 ± 0,08
Фенилаланин	1,77 ± 0,10
Сумма аминокислот	1177,82 ± 10,21

Таблица 9 – Содержание аминокислот в ЛРП семян льна и водных извлечениях

Наименование	Содержание, мг/100 г (М + m, n=3)		
	ЛРП семян льна	Водное извлечение (1)	Водное извлечение (2)
Аспарагиновая кислота	16,36 ± 0,16	1,68 ± 0,04	10,00 ± 0,08
Серин	20,92 ± 0,19	3,66 ± 0,08	18,72 ± 0,12
Глутаминовая кислота	26,53 ± 0,23	5,12 ± 0,06	18,69 ± 0,11
Глицин	10,06 ± 0,13	1,65 ± 0,05	7,22 ± 0,08
Гистидин	9,77 ± 0,09	1,31 ± 0,04	4,97 ± 0,06
Аргинин	44,68 ± 0,32	3,11 ± 0,09	9,73 ± 0,07
Треонин	0,60 ± 0,05	0,85 ± 0,05	3,64 ± 0,04
Аланин	13,34 ± 0,14	2,74 ± 0,07	17,90 ± 0,15
Пролин	7,68 ± 0,08	2,36 ± 0,06	6,15 ± 0,10
Тирозин	4,97 ± 0,06	1,07 ± 0,02	7,19 ± 0,09
Валин	7,92 ± 0,07	0,97 ± 0,02	5,95 ± 0,06
Метионин	5,72 ± 0,05	1,15 ± 0,03	6,57 ± 0,05
Лизин	18,12 ± 0,16	1,77 ± 0,02	9,67 ± 0,11
Изолейцин	3,01 ± 0,10	0,55 ± 0,02	2,43 ± 0,02
Лейцин	3,97 ± 0,09	0,58 ± 0,02	2,94 ± 0,03
Фенилаланин	7,47 ± 0,15	1,15 ± 0,03	3,42 ± 0,02
Сумма аминокислот	201,14 ± 1,87	29,73 ± 0,33	135,18 ± 1,27
Примечание: Водное извлечение (1) – изготовлено по методике, указанной в инструкции по медицинскому применению ЛРП (1,5 чайные ложки сырья на 200 мл воды (1:27)); Водное извлечение (2) – изготовлено по методике, указанной в ОФС «Настои и отвары» ГФ РФ XV издания (5 г сырья на 50 мл воды (1:10))			

В качестве преобладающих аминокислот в цветках липы представлены: серин (106,54 мг/100 г), пролин (96,73 мг/100 г), аспарагиновая (25,27 мг/100 г) и глутаминовая (23,20 мг/100 г) кислоты, а также фенилаланин (17,36 мг/100 г). В слоевищах ламинарии доминируют глутаминовая (770,28 мг/100 г) и аспарагиновая (193,91 мг/100 г) кислоты, пролин (79,83 мг/100 г) и аланин (45,56 мг/100 г). Основными аминокислотами в семенах льна являются аргинин (44,68 мг/100 г), глутаминовая кислота (26,53 мг/100 г), серин (20,92 мг/100 г) и лизин (18,12 мг/100 г).

Суммарное содержание свободных аминокислот в цветках липы составило 366,61 мг/100 г, в семенах льна 201,14 мг/100 г, а в слоевищах ламинарии обнаружено значительное содержание равное 1177,82 мг/100 г, при этом глутаминовая и аспарагиновая кислоты вносят наибольший вклад – более 81 %. В сравнении с водными извлечениями, которые были изготовлены по методикам, указанным в инструкциях по медицинскому применению ЛРП (семена льна – 29,73

мг/100 г, цветки липы – 141,68 мг/100 г) концентрация аминокислот значительно выше в водных извлечениях цветков липы и семян льна, которые были изготовлены по методике из ОФС «Настои и отвары» (семена льна – 135,18 мг/100 г, цветки липы – 254,18 мг/100 г).

При определении аминокислот установлено, что мажорными соединениями цветков липы являются серин и пролин, которые вносят вклад – 55 % от суммарного содержания свободных аминокислот. В семенах льна более 50 % занимают аргинин, глутаминовая кислота, серин и лизин. В то время как глутаминовая и аспарагиновая кислоты вносят наибольший вклад (более 81 %) в сумму аминокислот слоевищ ламинарии.

3.4. Определение жирнокислотного состава

Несмотря на обширное изучение фитохимического состава цветков липы, в доступной научной литературе обнаруживается ограниченное количество данных относительно состава ЖК. Для семян липы характерны следующие ЖК: линолевая кислота (49–60 %), олеиновая кислота (16–22 %), пальмитиновая кислота (8–10 %), стеркуловая (6 %) и мальвовая (17 %). Во всех образцах уровень мальвовой кислоты примерно в два раза превышал уровень стеркуловой кислоты, что указывает на значительное а-окисление стеркуловой кислоты в семенах [74, 109]. Слоевища ламинарии содержат такие ЖК, как лигноцериновая кислота (24,36 %), арахидоновая кислота (20,34 %), олеиновая кислота (19,20 %) и пальмитиновая кислота (17,34 %) [102, 121]. Основными ЖК семян льна являются α -линоленовая кислота (52,38 %), олеиновая кислота (22,43 %), линолевая кислота (14,47 %), пальмитиновая кислота (6,14 %). Всего представленное ЛРС содержит до 14,47 % омега-6-кислот и до 52,38 % омега-3-кислот [65].

Результаты анализа жирнокислотного состава цветков липы представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Идентифицированные ЖК цветков липы

Название ЖК	Индекс	Содержание, %
<i>Насыщенные ЖК</i>		
Капроновая	6:0	0,20
Каприловая	8:0	0,16
Каприновая	10:0	0,19
Лауриновая	12:0	0,32
Миристиновая	14:0	1,10
Пентадекановая	15:0	0,38
Пальмитиновая	16:0	39,74
Маргариновая	17:0	0,64
Стеариновая	18:0	4,28
Арахидовая	20:0	2,25
Бегеновая	22:0	2,67
Лигноцериновая	24:0	1,36
<i>Сумма насыщенных ЖК</i>		53,29
<i>Ненасыщенные ЖК</i>		
Пентадеценовая	15:1 9-цис	1,30
Гексадеценовая	16:1	0,23
Пальмитолеиновая	16:1 9-цис	0,37
Гептадеценовая	17:1 10-цис	0,66
Транс-изомеры октадеценовой кислоты	транс 18:1	0,21
Элаидиновая	18:1 9-транс	
Вакценовая	18:1 11-транс	
Олеиновая	18:1 9-цис	7,50
Вакценовая	18:1 11-цис	1,59
<i>Цис, транс-линолевая</i>	18:2 9-цис, 12-транс	0,12
<i>Транс, цис-линолевая</i>	18:2 9-транс, 12-цис	0,25
Линолевая	18:2 9-цис, 12-цис	17,37
Конъюгированная линолевая	18:2 9-cis, 11-trans	0,33
Транс-изомеры октадекатриеновой кислоты	транс 18:3	5,94
α -Линоленовая	18:3 9-цис, 12-цис, 15-цис	10,45
Гондоиновая	20:1 11-цис	0,38
<i>Сумма ненасыщенных ЖК</i>		46,7
Общее содержание ЖК, г/100 г		0,30 $\pm$ 0,1

В Таблице 11 приведены данные исследования жирнокислотного состава слоевищ ламинарии.

Таблица 11 – Идентифицированные ЖК слоевищ ламинарии

Название ЖК	Индекс	Содержание, %
<i>Насыщенные ЖК</i>		
Капроновая	6:0	0,19
Каприловая	8:0	0,29
Каприновая	10:0	0,28

Продолжение Таблицы 11

Лауриновая	12:0	0,82
Миристиновая	14:0	10,53
Пентадекановая	15:0	0,81
Пальмитиновая	16:0	25,31
Маргариновая	17:0	0,20
Стеариновая	18:0	2,11
Арахидиновая	20:0	0,82
Лигноцериновая	24:0	0,12
<i>Сумма насыщенных ЖК</i>		40,72
<i>Ненасыщенные ЖК</i>		
Пентадеценовая	15:1 9-цис	0,60
Гексадеценовая	16:1	0,18
Пальмитолеиновая	16:1 9-цис	3,81
Гептадеценовая	17:1 10-цис	0,26
Транс-изомеры октадеценовой кислоты	транс 18:1	0,18
Элаидиновая	18:1 9-транс	
Вакценовая	18:1 11-транс	
Олеиновая	18:1 9-цис	23,99
Вакценовая	18:1 11-цис	0,33
Октадеценовая n-цис	18:1 11-cis	0,13
Цис, транс-линолевая	18:2 9-цис, 12-транс	0,11
Транс, цис-линолевая	18:2 9-транс, 12-цис	0,19
Линолевая	18:2 9-цис, 12-цис	7,73
γ-Линоленовая	18:3 6-цис, 9-цис, 12-цис	1,63
Транс-изомеры октадекатриеновой кислоты	транс 18:3	0,23
α-Линоленовая	18:3 9-цис, 12-цис, 15-цис	3,35
Гондоиновая	20:1 11-цис	3,55
Эйкозодиеновая	20:2 11-цис, 14-цис	0,25
Эйкозатриеновая	20:3 8-цис, 11-цис, 14-цис	0,38
Арахидононовая	20:4 5-цис, 8-цис, 11-цис, 14-цис	6,97
Эйкозопентаеновая	20:5 5-цис, 8-цис, 11-цис, 14-цис, 17-цис	4,09
Эруковая	22:1 13-цис	0,30
<i>Сумма ненасыщенных ЖК</i>		58,26
Общее содержание ЖК, г/100 г		0,67 ± 0,08

Был проведён анализ содержания ЖК в семенах льна, результаты которого приведены в Таблице 12.

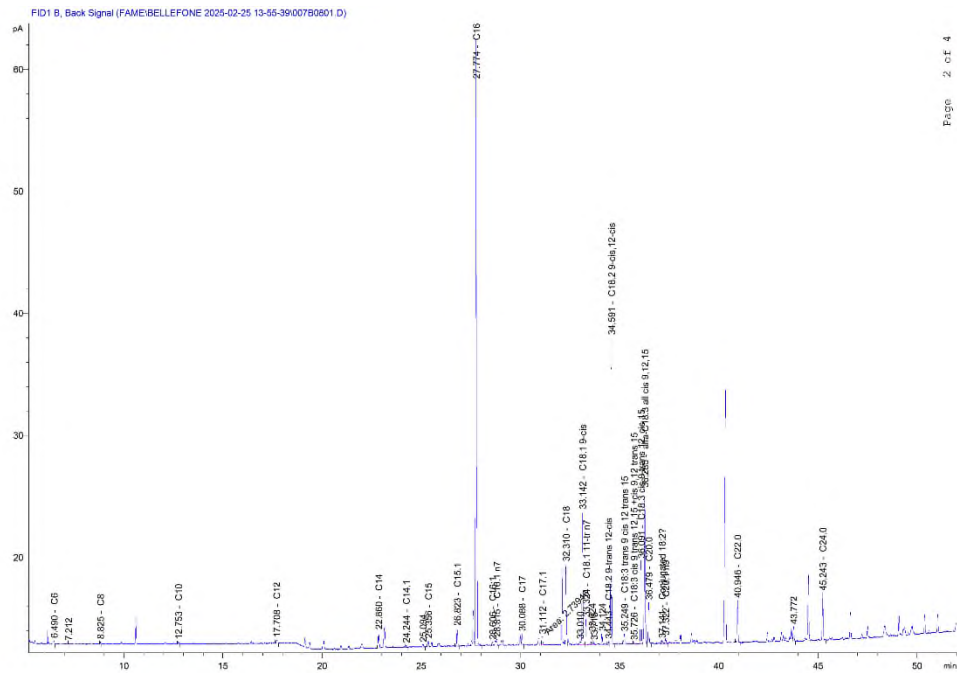
Таблица 12 – Идентифицированные ЖК семян льна

Название ЖК	Индекс	Содержание, %
<i>Насыщенные ЖК</i>		
Лауриновая	12:0	0,02

Продолжение Таблицы 12

Миристиновая	14:0	0,06
Пентадекановая	15:0	0,03
Пальмитиновая	16:0	6,30
Маргариновая	17:0	0,07
Стеариновая	18:0	5,71
Арахидовая	20:0	0,24
Бегеновая	22:0	0,21
Лигноцериновая	24:0	0,06
<i>Сумма насыщенных ЖК</i>		12,68
<i>Ненасыщенные ЖК</i>		
Гексадеценовая	16:1	0,04
Пальмитолеиновая	16:1 9-цис	0,09
Гептадеценовая	17:1 10-цис	0,04
Транс-изомеры октадеценовой кислоты Элаидиновая Вакценовая	транс 18:1 18:1 9-транс 18:1 11-транс	0,04
Олеиновая	18:1 9-цис	22,60
Вакценовая	18:1 11-цис	0,82
<i>Цис, транс-линолевая</i>	18:2 9-цис, 12-транс	0,08
<i>Транс, цис-линолевая</i>	18:2 9-транс, 12-цис	0,01
Линолевая	18:2 9-цис, 12-цис	17,77
Транс-изомеры октадекатриеновой кислоты	транс 18:3	0,25
α -Линоленовая	18:3 9-цис, 12-цис, 15-цис	45,40
Гондоиновая	20:1 11-цис	0,15
Эйкозодиеновая	20:2 11-цис, 14-цис	0,02
<i>Сумма ненасыщенных ЖК</i>		87,31
Общее содержание ЖК, г/100 г		42,4 $\pm$ 0,01

На хроматограммах (Рисунки 21–23) представлены Т_{уд.} идентифицированных ЖК и их изомеров.



Page 2 of 4

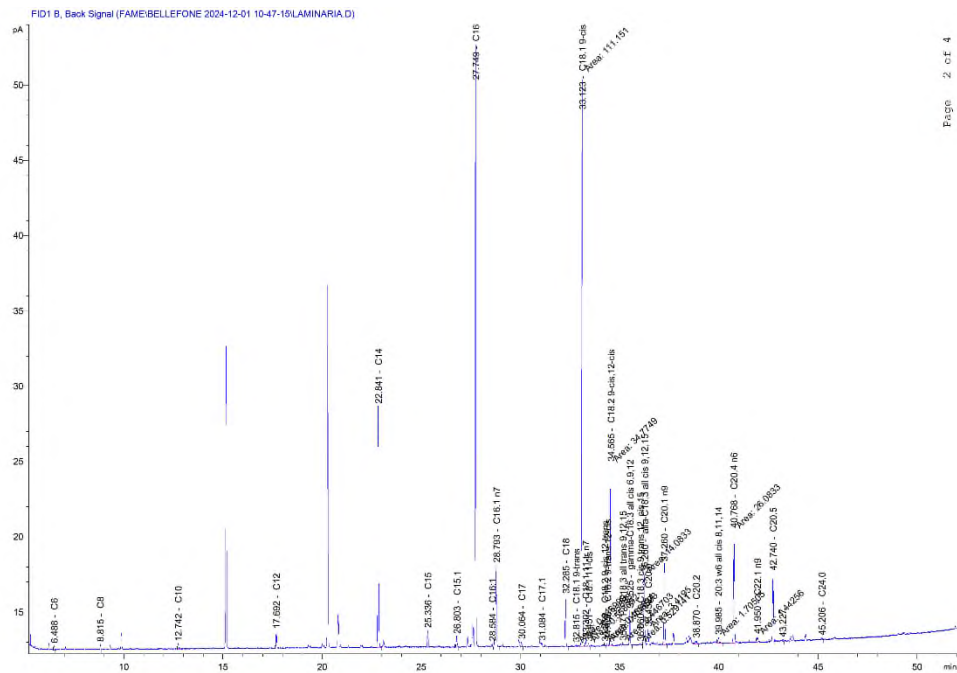


Рисунок 22 – Хроматограмма жирнокислотного состава слоевищ ламинарии

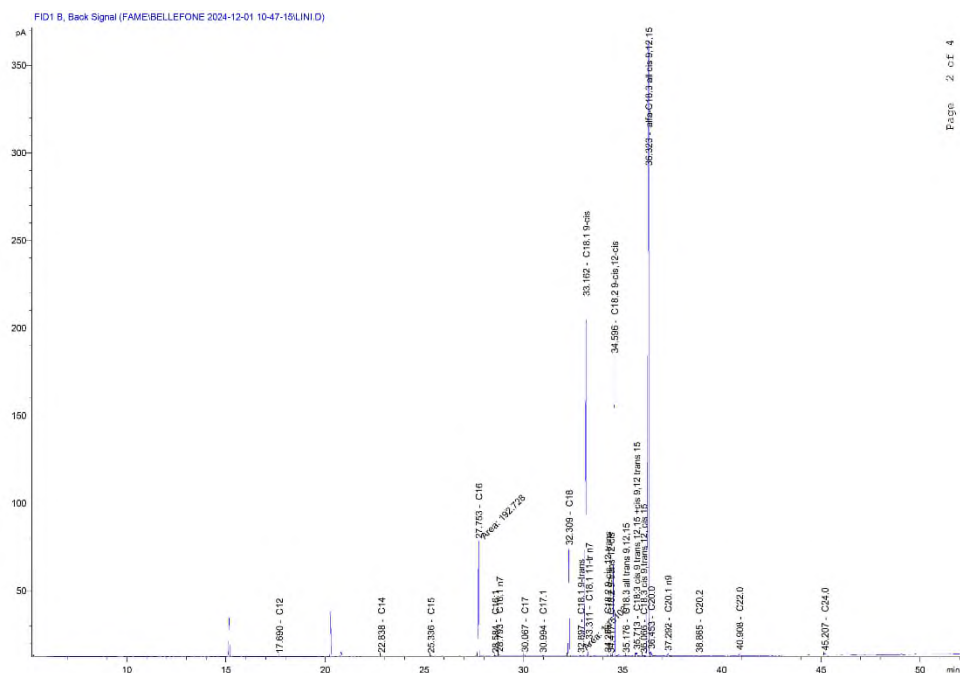


Рисунок 23 – Хроматограмма жирнокислотного состава семян льна

В результате проведённого исследования выявлено 12 насыщенных ЖК в цветках липы, 11 – в слоевищах ламинарии и 9 – в семенах льна, среди которых для всех объектов доминирует пальмитиновая кислота в концентрациях 39,74 %, 25,31 %, 6,30 % соответственно. Из 14 ненасыщенных ЖК цветков липы преобладающей является линолевая кислота (17,37 %). Среди 20 ненасыщенных ЖК слоевищ ламинарии наибольшая концентрация отмечена для олеиновой кислоты – 23,99 %. ЖК семян льна включают в себя 13 ненасыщенных ЖК (наибольшая доля у α -линоленовой кислоты – 45,40 %).

3.5. Определение компонентного состава летучих органических веществ

В ходе исследования цветков липы обнаружено 41 соединение (Таблица 13).

Таблица 13 – Компонентный состав летучих органических веществ цветков липы

Время выхода	Доля вещества, %	CAS	Название
16,45	0,052	123-51-3	3-Метилбутан-1-ол

Продолжение Таблицы 13

16,55	0,220	3208-16-0	2-Этилфуран
21,18	0,031	79-92-5	Камфен
22,92	0,115	3387-41-5	Сабинен
23,47	0,098	555-10-2	β -Фелландрен
24,95	0,134	123-35-3	β -Мирцен
25,89	0,102	4821-04-9	Терпинен 4-ацетат
26,51	0,237	137-32-6	2-Метилбутан-1-ол
26,66	0,632	138-86-3	DL-Лимонен
27,11	1,945	470-82-6	Эвкалиптол
28,43	0,328	99-85-4	γ -Терпинен
29,47	1,613	527-84-4	о-Цимен
32,33	0,299	16409-43-1	Розеноксид
33,49	0,084	821-55-6	2-Нонанон
33,69	0,850	124-19-6	Нонаналь
34,39	0,744	1195-79-5	Фенхон
35,33	2,176	5989-33-3	Линалил оксид
35,55	0,163	546-80-5	Туйон
36,29	1,999	34995-77-2	Транс-линалоол оксид
36,62; 37,56	15,779; 6,905	10458-14-7	Ментон
38,17	2,696	78-70-6	Линалоол
38,66	4,240	100-52-7	Бензальдегид
39,72	1,460	30086-02-3	(Е, Е)-3,5-Октадиен-2-он
40,23	11,030	29957-43-5	Хотриенол
40,57	2,352	562-74-3	4-Терпинеол
41,48	1,114	2216-51-5	Левоментол
41,86	2,817	6909-25-7	Цис-дигидрокарвон
42,45	7,713	89-82-7	Пулегон
42,75	1,003	140-67-0	Эстрагол
43,23	0,957	98-55-5	α -Терпинеол
43,57	1,834	507-70-0	Борнеол
44,99	14,129	99-49-0	Карвон
45,23	0,342	483-76-1	δ -Кадинен
46,07	0,158	515-00-4	Миртенол
47,12	0,956	23726-93-4	β -Дамасценон
47,28	2,643	104-46-1	Анетол
47,42	0,750	1197-01-9	п-Цимен-8-ол
49,38	4,792	60-12-8	Фенилэтиловый спирт

Продолжение Таблицы 13

56,31	2,184	112-05-0	Нонановая кислота
56,48	2,072	97-53-0	Эвгенол
57,49	0,253	499-75-2	Карвакрол

Хроматограмма летучих органических веществ цветков липы представлена на Рисунке 24.

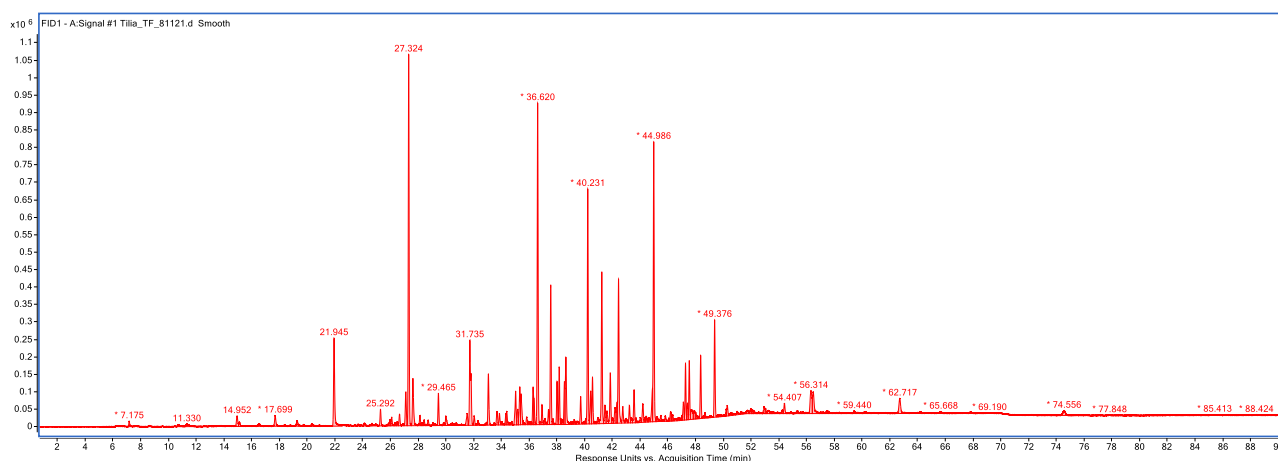


Рисунок 24 – Хроматограмма летучих органических веществ цветков липы

В слоевищах ламинарии было выявлено 25 соединений (Таблица 14).

Таблица 14 – Компонентный состав летучих органических веществ слоевищ ламинарии

Время выхода	Доля вещества, %	CAS	Название
23,314	10,276	66-25-1	Гексаналь
27,409	1,110	111-71-7	Гептаналь
27,695	0,483	95-47-6	1,2-Диметилбензол
27,982	1,003	138-86-3	DL-Лимонен
30,744	0,589	99-87-6	п-Цимен
31,278	1,656	124-13-0	Октаналь
32,844	3,768	29381-66-6	Гептеналь
32,984	0,930	110-93-0	6-Метил-5-гептен-2-он
34,916	2,701	124-19-6	Нонаналь
36,204	5,012	3391-86-4	1-Октен-3-ол
36,432	4,995	2548-87-0	(E)-2-Октеналь
37,902	7,144	89-80-5	Ментон

Продолжение Таблицы 14

38,834	2,304	491-07-6	Изоментон
39,686	0,943	111-87-5	1-Октанол
39,811	6,065	2463-53-8	2-Ноненаль
39,944	1,743	100-52-7	Бензальдегид
41,542	2,482	26001-58-1	(Z)-2-Октен-1-ол
41,769	0,894	562-74-3	4-Терпинеол
44,395	14,548	22104-79-6	2-Нонен-1-ол
46,216	21,129	99-49-0	Карвон
46,527	0,643	2363-88-4	2,4-Декадиеналь
50,403	0,335	124-25-4	Тетрадеканаль
51,467	5,467	14901-07-6	β -Ионон
52,77	1,999	108-95-2	Фенол
55,792	1,780	502-69-2	6,10,14-Триметил-2-пентадеканон

Хроматограмма летучих органических веществ слоевищ ламинарии представлена на Рисунке 25.

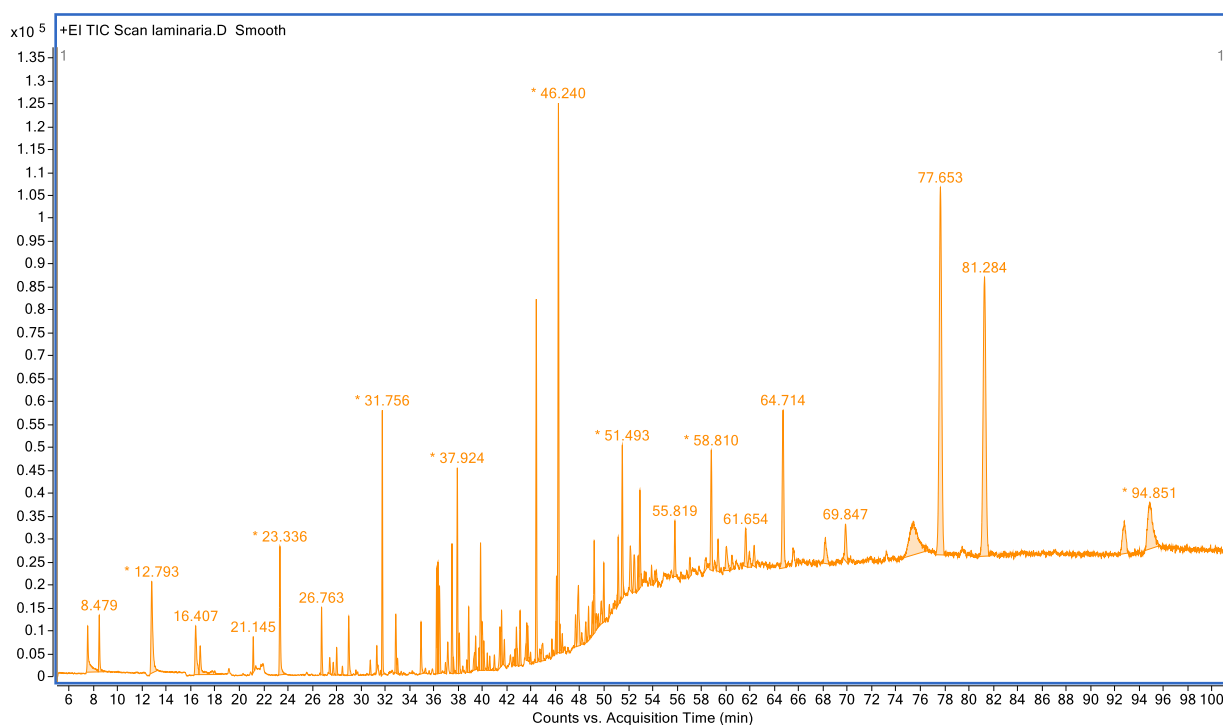


Рисунок 25 – Хроматограмма летучих органических веществ слоевищ ламинарии

В семенах льна идентифицировано 25 соединений (Таблица 15).

Таблица 15 – Компонентный состав летучих органических веществ семян льна

Время выхода	Доля вещества, %	CAS	Название
12,883	17,855	67-64-1	Ацетон
15,899	40,006	78-93-3	2-Бутанон
17,111	2,885	64-17-5	Этанол
17,935	0,243	3208-16-0	2-Этилфуран
21,734	0,821	108-88-3	Толуол
26,184	0,241	127-91-3	2-β-Пинен
27,937	3,962	138-86-3	DL-Лимонен
28,946	0,525	3777-69-3	2-Пентилфуран
29,37	0,532	71-41-0	1-Пентанол
30,715	0,989	99-87-6	п-Цимен
32,688	0,582	35194-31-1	6-Октен-2-он
33,007	5,144	111-27-3	1-Гексанол
36,198	0,285	18185-81-4	3-Октен-1-ол
36,434	0,870	111-70-6	1-Гептанол
36,635	1,277	1569-60-4	6-Метил-5-гептен-2-ол
37,891	4,911	10458-14-7	Ментон
38,823	2,925	491-07-6	Изоментон
39,679	0,888	111-87-5	1-Октанол
41,344	4,056	89-78-1	DL-Ментол
41,767	0,572	562-74-3	4-Терпинеол
42,75	0,550	143-08-8	1-Нонанол
43,689	2,534	89-82-7	Пулегон
46,208	6,482	99-49-0	Карвон
48,456	0,301	140-67-0	Эстрагол
50,502	0,566	60-12-8	Фенилэтиловый спирт

Хроматограмма летучих органических веществ семян льна представлена на Рисунке 26.

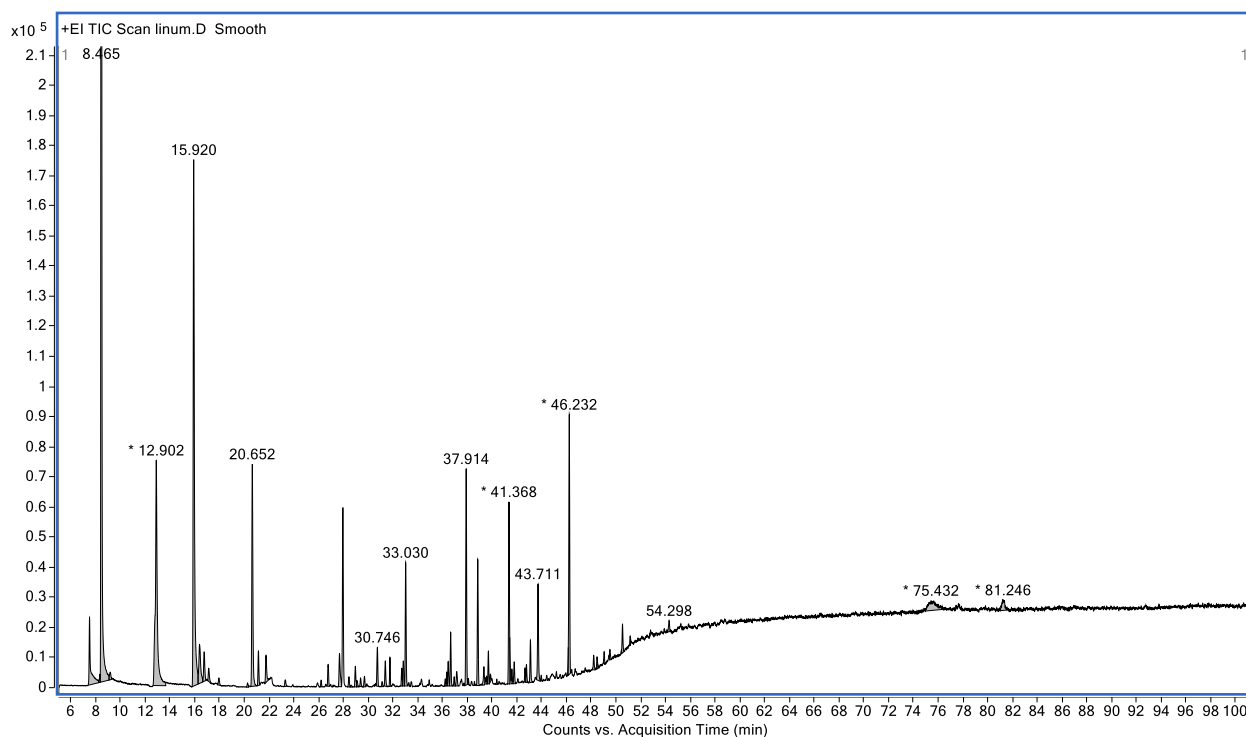


Рисунок 26 – Хроматограмма летучих органических веществ семян льна

Исследования показали, что доминирующими компонентами цветков липы являются ментон (22,684 %), карвон (14,129 %), хотриенол (11,030 %), пулегон (7,713 %), слоевищ ламинарии – карвон (21,129 %), 2-нонен-1-ол (14,548 %) гексаналь (10,276 %), ментон (7,144 %), семян льна – 2-бутанон (40,006 %), ацетон (17,855 %), карвон (6,482 %), 1-гексанол (5,144 %). Среди них карвон и ментон в слоевищах ламинарии были выявлены впервые, остальные БАС согласуются с данными литературы [64, 66, 73, 76, 79, 92, 123]. Указанные соединения формируют профиль летучих веществ исследуемых объектов, а также вносят основной вклад в содержание данной группы БАС в семенах льна, цветках липы и слоевищах ламинарии.

3.6. Определение элементного состава

По данным ИСП-МС-анализа минерального состава исследуемого образца цветков липы выявлено 18 элементов (Таблица 16).

Таблица 16 – Элементный состав цветков липы

Элемент	Концентрация
<i>Макроэлементы, мг/кг</i>	
Ca	$352,65 \pm 16,31$
Mg	$54,23 \pm 1,99$
<i>Микроэлементы, мг/кг</i>	
Fe	$3,76 \pm 0,99$
Al	$3,20 \pm 1,14$
Mn	$2,15 \pm 0,13$
Sr	$1,33 \pm 0,06$
B	$0,78 \pm 0,33$
Zn	$0,58 \pm 0,22$
Cu	$0,24 \pm 0,095$
<i>Ультрамикроэлементы, мг/кг</i>	
Ba	$0,41 \pm 0,066$
Ni	$0,059 \pm 0,007$
Cr	$0,038 \pm 0,005$
Mo	$0,016 \pm 0,006$
V	$0,008 \pm 0,002$
Co	$0,004 \pm 0,001$
Sb	$0,002 \pm 0,0001$
Ga	$0,001 \pm 0,0001$
Ag	$0,0003 \pm 0,00004$
<i>Содержание тяжёлых металлов и мышьяка, мг/кг</i>	
Pb	$0,069 \pm 0,005$
Hg	$0,058 \pm 0,007$
As	$0,014 \pm 0,003$
Cd	$0,002 \pm 0,0005$

В цветках липы среди макроэлементов преобладают кальций ($352,65 \pm 16,31$ мг/кг) и магний ($54,23 \pm 1,99$ мг/кг). К числу основных микроэлементов следует отнести железо ($3,76 \pm 0,99$ мг/кг) и алюминий ($3,20 \pm 1,14$ мг/кг), далее по убыванию идут марганец ($2,15 \pm 0,13$ мг/кг) и стронций ($1,33 \pm 0,06$ мг/кг). Среди ультрамикроэлементов наиболее высокие значения продемонстрировали барий ($0,409 \pm 0,066$ мг/кг) и никель ($0,059 \pm 0,007$ мг/кг), причём барий содержится в значительно больших количествах, чем все остальные элементы данной группы. Калий, селен, теллур, вольфрам, таллий и висмут были ниже предела обнаружения.

Содержание тяжёлых металлов (ртуть ($0,058 \pm 0,007$ мг/кг), свинец ($0,069 \pm 0,005$ мг/кг), кадмий ($0,002 \pm 0,0005$ мг/кг)) и мышьяка ($0,014 \pm 0,003$ мг/кг) в образце находится на уровнях, соответствующих предельно допустимым концентрациям (ПДК). Цветки липы соответствуют требованиям ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [38].

В результате определения минерального состава слоевищ ламинарии методом ИСП-МС было выявлено 19 элементов (Таблица 17).

Таблица 17 – Элементный состав слоевищ ламинарии

Элемент	Концентрация
<i>Макроэлементы, мг/кг</i>	
Ca	$247,28 \pm 45,85$
Mg	$214,39 \pm 0,001$
<i>Микроэлементы, мг/кг</i>	
Sr	$16,14 \pm 4,24$
Fe	$3,82 \pm 1,09$
B	$2,66 \pm 0,54$
Al	$1,60 \pm 0,39$
Zn	$0,26 \pm 0,031$
Mn	$0,17 \pm 0,042$
Cu	$0,038 \pm 0,014$
<i>Ультрамикроэлементы, мг/кг</i>	
Te	$0,17 \pm 0,0001$
Ba	$0,17 \pm 0,042$
Ni	$0,070 \pm 0,016$
V	$0,033 \pm 0,009$
Cr	$0,025 \pm 0,008$
Ag	$0,022 \pm 0,006$
Se	$0,021 \pm 0,004$
Mo	$0,014 \pm 0,005$
Co	$0,009 \pm 0,002$
Ga	$0,001 \pm 0,0002$
<i>Содержание тяжёлых металлов и мышьяка, мг/кг</i>	
As	$1,25 \pm 0,011$
Hg	$0,012 \pm 0,001$
Pb	$0,011 \pm 0,002$
Cd	$0,006 \pm 0,001$

Среди макроэлементов слоевищ ламинарии наибольшую концентрацию показали кальций ($247,28 \pm 45,85$ мг/кг) и магний ($214,39 \pm 0,001$ мг/кг). Анализ микроэлементов выявил, что доминирующим представителем является стронций ($16,14 \pm 4,24$ мг/кг), за которым следуют железо ($3,82 \pm 1,09$ мг/кг) и бор ($2,66 \pm 0,54$ мг/кг). Остальные микроэлементы – алюминий ($1,60 \pm 0,39$ мг/кг), цинк ($0,258 \pm 0,031$ мг/кг), марганец ($0,168 \pm 0,042$ мг/кг) и медь ($0,038 \pm 0,014$ мг/кг) – присутствуют в более низких концентрациях. В группе ультрамикроэлементов наибольшие значения зарегистрированы для теллура ($0,172 \pm 0,0001$ мг/кг) и бария ($0,166 \pm 0,042$ мг/кг), за которыми следуют никель ($0,070 \pm 0,016$ мг/кг), ванадий ($0,033 \pm 0,009$ мг/кг) и хром ($0,025 \pm 0,008$ мг/кг). Остальные элементы (серебро, селен, молибден, кобальт и галлий) обнаружены в ещё более низких концентрациях. Концентрации калия, золота, таллия, висмута, сурьмы и вольфрама были ниже предела обнаружения.

Определение тяжёлых металлов и мышьяка показало наличие в наибольшей концентрации мышьяка ($1,25 \pm 0,011$ мг/кг), а также присутствие ртути ($0,012 \pm 0,001$ мг/кг), свинца ($0,011 \pm 0,002$ мг/кг) и кадмия ($0,006 \pm 0,001$ мг/кг). Все значения укладываются в диапазон ПДК, в том числе и содержание мышьяка, концентрация которого не должна превышать 90 мг/кг по ФС.2.5.0080.18. Слоевища ламинарии соответствуют требованиям ГФ РФ XV издания. [38, 59]

В исследуемом образце семян льна выявлено 17 элементов (Таблица 18).

Таблица 18 – Элементный состав семян льна

Элемент	Концентрация
<i>Макроэлементы, мг/кг</i>	
Mg	$160,66 \pm 3,23$
Ca	$58,05 \pm 0,84$
<i>Микроэлементы, мг/кг</i>	
Fe	$3,01 \pm 0,10$
Zn	$2,35 \pm 0,09$
Mn	$1,15 \pm 0,03$
B	$0,82 \pm 0,090$
Cu	$0,60 \pm 0,070$
Sr	$0,42 \pm 0,004$

Продолжение Таблицы 18

Al	$0,34 \pm 0,011$
<i>Ультрамикроэлементы, мг/кг</i>	
Ni	$0,066 \pm 0,004$
Ba	$0,042 \pm 0,003$
Cr	$0,023 \pm 0,006$
Mo	$0,015 \pm 0,001$
Se	$0,008 \pm 0,001$
Co	$0,008 \pm 0,0004$
Ag	$0,002 \pm 0,0001$
V	$0,001 \pm 0,0001$
<i>Содержание тяжёлых металлов и мышьяка, мг/кг</i>	
Cd	$0,005 \pm 0,001$
Pb	$0,001 \pm 0,0004$
As	$0,0002 \pm 0,00003$

В составе макроэлементов семян льна преобладающим элементом оказался магний ($160,66 \pm 3,23$ мг/кг), за которым следуют кальций ($58,05 \pm 0,84$ мг/кг). Среди микроэлементов наибольшую концентрацию продемонстрировали железо ($3,01 \pm 0,10$ мг/кг) и цинк ($2,35 \pm 0,09$ мг/кг). Марганец ($1,15 \pm 0,03$ мг/кг), бор ($0,821 \pm 0,090$ мг/кг), медь ($0,602 \pm 0,070$ мг/кг), стронций ($0,423 \pm 0,004$ мг/кг) и алюминий ($0,340 \pm 0,011$ мг/кг) присутствуют в меньших количествах. В группе ультрамикроэлементов самая высокая концентрация оказалась у никеля ($0,066 \pm 0,004$ мг/кг), далее идут барий ($0,042 \pm 0,003$ мг/кг), хром ($0,023 \pm 0,006$ мг/кг), молибден ($0,015 \pm 0,001$ мг/кг), селен ($0,008 \pm 0,001$ мг/кг), кобальт ($0,008 \pm 0,0004$ мг/кг), серебро ($0,002 \pm 0,0001$ мг/кг) и ванадий ($0,001 \pm 0,0001$ мг/кг). Калий, галлий, висмут, сурьма, теллур, таллий и вольфрам были ниже предела обнаружения.

Анализ содержания тяжёлых металлов и мышьяка показал, что кадмий содержится в концентрации $0,005 \pm 0,001$ мг/кг, свинец – $0,001 \pm 0,0004$ мг/кг, мышьяк – $0,0002 \pm 0,00003$ мг/кг, а концентрация ртути ниже предела обнаружения. По данным показателям семена льна полностью соответствуют нормам ОФС.1.5.3.0009 [38].

Сравнительный анализ цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна выявил различия в уровнях отдельных эссенциальных и токсичных элементов, обусловленные видом исследуемого растения. При этом все исследуемые объекты укладываются в нормы тяжёлых металлов и мышьяка. В элементном составе цветков липы наибольшую концентрацию имеют кальций, магний, железо, алюминий и барий. Минеральный состав слоевищ ламинарии характеризуется преобладанием макроэлементов (кальций и магний) и выраженным содержанием микроэлемента стронция, что определяет его специфический минеральный состав. Элементный состав семян льна определяется преобладанием магния среди макроэлементов и значительным содержанием железа и цинка в группе микроэлементов, что придает им характерный минеральный профиль.

Таким образом, нами исследованы комплексы БАС в цветках липы, слоевищах ламинарии, семенах льна. Таблица 19 отражает содержание основных групп БАС в объектах исследования.

Таблица 19 – Основные группы БАС

Группа БАС	Содержание БАС		
	Цветки липы	Слоевища ламинарии	Семена льна
Общее содержание ЖК, г/100 г	0,30	0,67	42,4
Сумма флавоноидов в пересчёте на рутин (СФМ), %	2,78	—	—
Суммарное содержание свободных аминокислот, мг/100 г	366,61	1177,82	201,14
Сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу (СФМ), %	2,54	2,22	2,41
Общее содержание элементов, мг/кг	420,54	486,94	253,64
Примечание: Количественные данные суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ и суммы флавоноидов представлены в главе 4			

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Методом ТСХ подтверждено наличие моносахаридов в составе ПСХ для всех объектов, а именно: рамнозы, ксилозы, арабинозы, глюкозы, галактозы. Также для цветков липы характерны глюкуроновая и галактуриновая кислоты, для слоевищ ламинарии – манноза и глюкуроновая кислота, а для семян льна – галактуриновая кислота.

2. Более детально изучены флавоноиды методом УЭЖХ-УФ/МС/МС. В цветках липы идентифицированы: кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид, кверцетин-3-глюкозид-7-рамнозид, тилирозид, рутин, кверцетин-3-глюкозид, кемпферитрин, кемпферол 3-рутинозид, кверцетин-3-арабинозид, астрагалин, кверцетин 3-рамнозид, кемпферол 7-рамнозид, кверцетин 3-глюкуронид, прунетин-4'-рутинозид. В семенах льна посевного был обнаружен неолинустиатин.

3. Исследовано содержание аминокислот методом ВЭЖХ в цветках липы, слоевищах ламинарии, семенах льна. В каждом из объектов исследования идентифицированы 16 аминокислот. При этом в цветках липы наибольшей концентрацией обладают серин (106,54 мг/100 г), пролин (96,73 мг/100 г), аспарагиновая (25,27 мг/100 г) и глутаминовая (23,20 мг/100 г) кислоты, а также фенилаланин (17,36 мг/100 г). Для слоевищ ламинарии характерны глутаминовая (770,28 мг/100 г) и аспарагиновая (193,91 мг/100 г) кислоты, пролин (79,83 мг/100 г) и аланин (45,56 мг/100 г). В семенах льна преобладающими аминокислотами являются аргинин (44,68 мг/100 г), глутаминовая кислота (26,53 мг/100 г), серин (20,92 мг/100 г) и лизин (18,12 мг/100 г).

4. Жирнокислотный состав был определён методом ГХ-ПИД. Установлено, что в цветках липы содержится 26, в слоевищах ламинарии – 31, а в семенах льна – 22 ЖК, при этом среди насыщенных ЖК во всех образцах доминирует пальмитиновая кислота с концентрациями 39,74 %, 25,31 % и 6,30 % соответственно. Из ненасыщенных ЖК в цветках липы преобладает линолевая

кислота (17,37 %), в слоевищах ламинарии максимальное содержание имеет олеиновая кислота (23,99 %), а в семенах льна – α -линоленовая кислота (45,40 %).

5. Исследование, проведённое методом ГХ/МС, позволило выявить основной состав летучих веществ. Так, в цветках липы преобладают ментон (22,68 %), карвон (14,13 %), хотриенол (11,030 %) и пулегон (7,71 %). В слоевищах ламинарии доминирующими компонентами являются карвон (21,13 %), 2-нонен-1-ол (14,55 %), гексаналь (10,28 %) и ментон (7,14 %). Для семян льна характерны высокие концентрации 2-бутанона (40,006 %), ацетона (17,86 %), карвона (6,48 %) и 1-гексанола (5,14 %).

6. Методом ИСП-МС установлено содержание элементов, тяжёлых металлов и мышьяка в цветках липы, слоевищах ламинарии и семенах льна (нормы не превышены). В цветках липы преобладают такие элементы, как кальций ($352,65 \pm 16,31$ мг/кг), магний ($54,23 \pm 1,99$ мг/кг), железо ($3,76 \pm 0,99$ мг/кг), алюминий ($3,20 \pm 1,14$ мг/кг) и барий ($0,41 \pm 0,066$ мг/кг). Минеральный состав слоевищ ламинарии характеризуется высоким содержанием макроэлементов – кальция ($247,28 \pm 45,85$ мг/кг) и магния ($214,39 \pm 0,001$ мг/кг), а также заметным присутствием микроэлемента стронция ($16,14 \pm 4,24$ мг/кг), что обуславливает специфику минерального состава. Для семян льна характерно выраженное преобладание магния ($160,66 \pm 3,23$ мг/кг) среди макроэлементов, а также значительные концентрации железа ($3,01 \pm 0,10$ мг/кг) и цинка ($2,35 \pm 0,09$ мг/кг) среди микроэлементов.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЦВЕТКОВ ЛИПЫ, СЛОЕВИЩ ЛАМИНАРИИ, СЕМЯН ЛЬНА

ПСХ относятся к группе БАС, широко применяемых в медицине. Они входят в состав соединений цветков липы, семян льна и слоевищ ламинарии. Для цветков липы также характерны флавоноиды. Указанные группы БАС переходят в водные извлечения изучаемых ЛРП. В данный момент ФС на цветки липы регламентирует проводить контроль качества по суммарному содержанию флавоноидов (ГФ РФ XV издания) [57], для слоевищ ламинарии по содержанию йода и ПСХ [59], для семян льна по содержанию ПСХ [58]. В обоих случаях применяется известная методика определения суммы ПСХ гравиметрическим методом, которая является достаточно трудоёмкой и длительной, а также низкоспецифичной. Затруднён анализ малых содержаний аналита, в связи с низкой чувствительностью метода. Помимо ПСХ совместно осаждаются извлечённые из ЛРП балластные и сопутствующие компоненты, что дополнительно искажает измерение и увеличивает погрешность. В результате анализа фиксируется лишь суммарный выход всего комплекса и при таком методе невозможно определить содержание каждого отдельного углевода. [99]

В зарубежной и отечественной научной литературе представлены различные методики (пикриновая, фенолсернокислая и орциновая) СФМ-анализа ПСХ, которые, не смотря на свою популярность, обладают рядом недостатков, в том числе связанных с пробоподготовкой и реагентами. Фенолсернокислая методика предполагает тщательный подбор унифицированных условий пробоподготовки и анализа [31]. Кроме того, при использовании методики пентозы вступают в реакцию с большей вероятностью, чем гексозы [77]. Недостатком является необходимость использования канцерогенного фенольного реагента (фенол – летучий, высокотоксичный, едкий реагент) [115]. Кроме того, методика не

позволяет получить достоверные количественные результаты, поскольку молярный коэффициент экстинкции для разных сахаров различается, что приводит к неодинаковому отклику на разные гетерополисахариды [115].

Согласно ГФ РФ XIV издания для определения ПСХ в цветках липы предлагается использовать методику СФМ-анализа с пикриновой кислотой. Однако, данная методика имеет свои сложности, включая строгий контроль за уровнем pH, необходимость длительного нагревания реакционной смеси, а также добавление специальных реагентов для повышения селективности анализа. Кроме того, результаты, полученные с использованием этой методики, могут быть несколько завышены из-за химической неспецифичности реактивов по отношению к анализируемым БАС. Принцип методики основан на фотометрической реакции пикриновой кислоты с моносахаридами, ведущей к образованию аминопикриновой кислоты за счет восстановления нитрогруппы до аминогруппы сахаром. Учитывая, что извлечения из растительного сырья обычно содержат и другие компоненты, способные участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, общее содержание сахаров может быть значительно выше фактического [30, 53].

В связи с вышеперечисленными причинами, в представленной работе мы предлагаем измерять сумму восстанавливающих сахаров в составе ПСХ методом СФМ с антроновым реактивом (Рисунки 27, 28). Методика с антроновым реактивом по сравнению с фенолсернокислой методикой и методикой с пикриновой кислотой является более избирательной по отношению к сахарам (преимущественно реагируют гексозы, которые как раз наиболее выражены в объектах исследования); альдегидные функциональные группы сахаров редко присутствуют в других классах БАС растительного происхождения [53, 115].

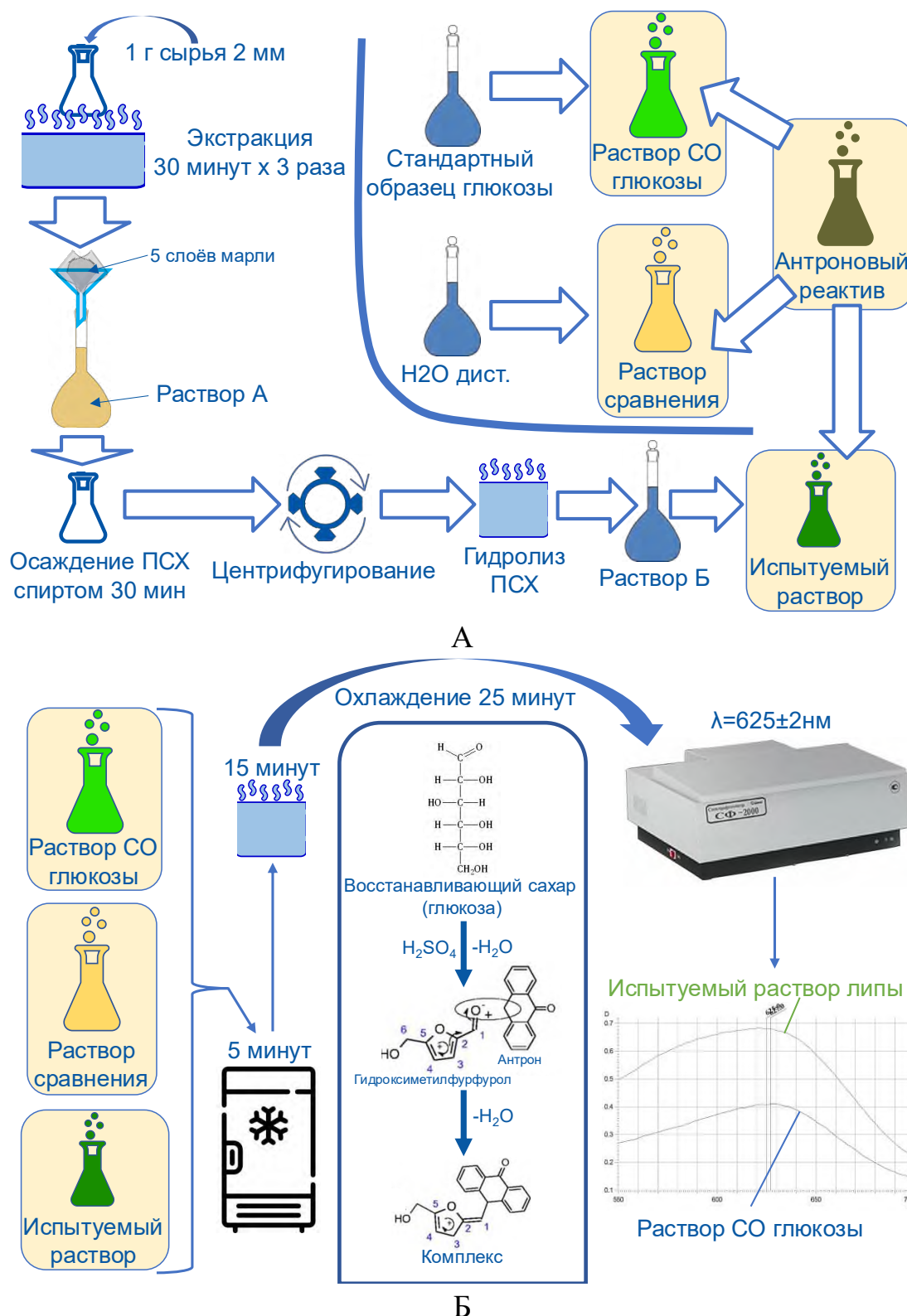


Рисунок 27 – Схема методики определения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ: пробоподготовка (А), условия реакции комплексообразования и химизм (Б)

На Рисунке 27 изображена общая схема разработанной методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ

[44, 111]. Сущность методики заключается в том, что в среде концентрированной серной кислоты сложные углеводы сначала проходят процесс расщепления до моносахаридов, затем дегидратируют до оксиметилфурфурола, который вступает в реакцию азосочетания с антроном. Образуется комплексное соединение синевато-зелёного оттенка с высокими коэффициентами экстинкции, причём от количества сахаров в растворе пропорционально изменяется интенсивность полученной окраски. [31, 99]

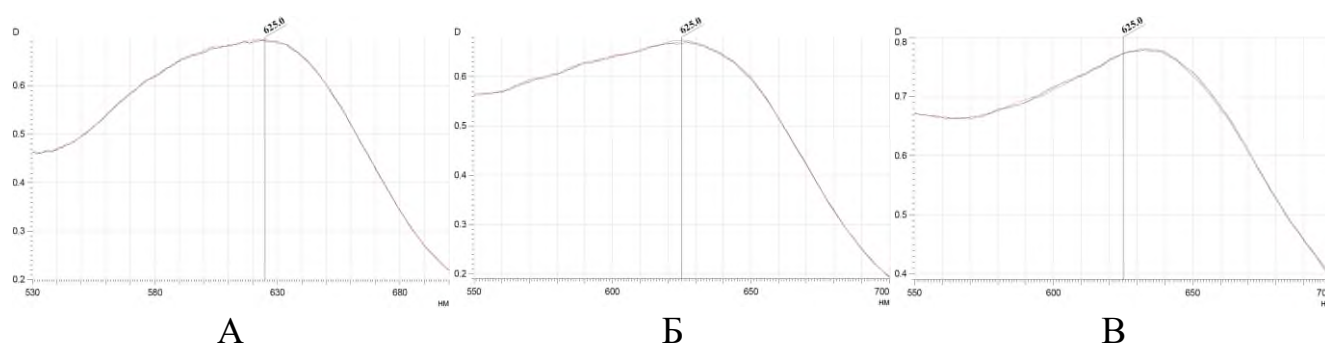


Рисунок 28 – Спектры ($\lambda_{\text{max}} = 625 \text{ нм}$) испытуемых растворов цветков липы (А), слоевищ ламинарии (Б), семян льна (В) с антроновым реагентом

Спектры для комплекса ПСХ с антроновым реагентом ($\lambda = 625 \text{ нм}$) для семян льна, цветков липы и слоевищ ламинарии представлены на Рисунке 28.

Согласно литературным источникам, цветки липы богаты флавоноидами, которые переходят в водное извлечение. К ключевым группам БАС цветков липы относятся ПСХ и полифенольные соединения: дубильные вещества, флавоноиды, гидроксикоричные и фенольные кислоты [17, 44, 46, 111, 112]. Используемая в действующей ФС на цветки липы СФМ-методика измерения суммы флавоноидов является технологически устаревшей из-за трудоёмкости процедуры, длительности и необходимости использовать большое количество реактивов, что повышает стоимость анализа. В связи с этим для измерения концентрации суммы флавоноидов была разработана и валидирована новая СФМ-методика, которая отличается простотой выполнения, скоростью и экономичностью (Рисунок 29).

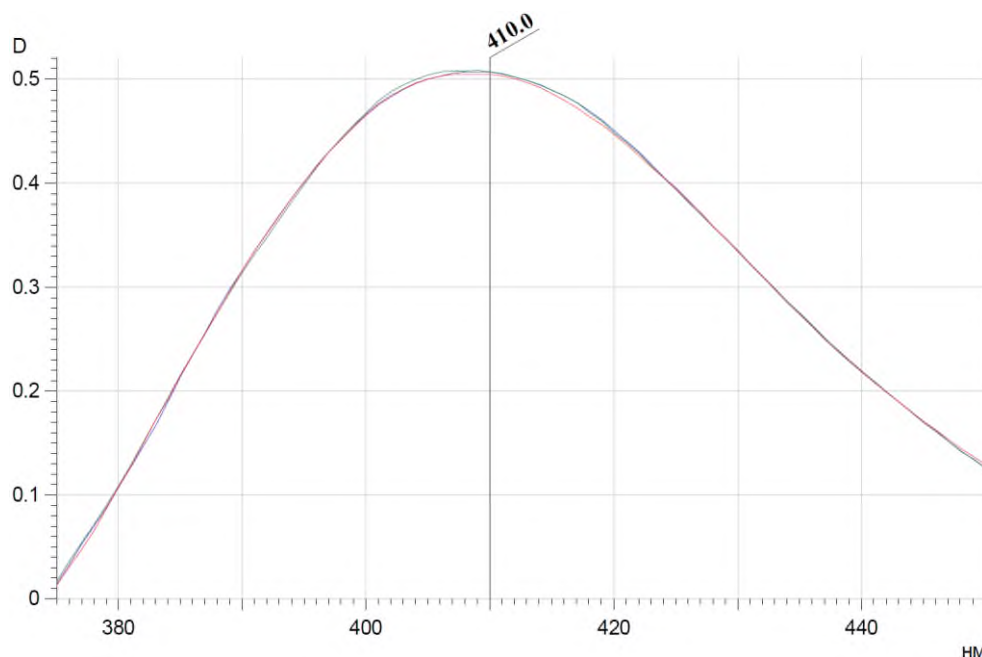


Рисунок 29 — Спектр УФ-поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 410$ нм для комплекса флавоноидов цветков липы с AlCl_3

Максимум поглощения комплекса флавоноидов цветков липы с хлоридом алюминия при 410 нм представлен на Рисунке 29.

При разработке методик для извлечения флавоноидов и ПСХ из ЛРП установлены ключевые параметры. Определяли тип и концентрацию экстрагента, размер частиц сырья, продолжительность и кратность экстракции, а также соотношение экстрагента и сырья. Подбирали оптимальные условия для проведения реакции комплексообразования (время реакции комплексообразования, соотношение «экстракт-комплексообразователь»). [14, 15, 44, 111]

Согласно требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» выполняли валидацию СФМ методик по измерению процентного содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ и суммы флавоноидов по следующим показателям: специфичность, линейность и репрезентативность, правильность, повторяемость, внутрिलाбораторная прецизионность (воспроизводимость) [1, 4, 14, 15, 18, 34, 45, 50–52].

4.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов методом спектрофотометрии в цветках липы

Разработка методики:

В состав ПСХ объектов исследования в основном входят гексозы в форме пираноз, поэтому глюкоза была выбрана в качестве СО. Литературные данные подтверждают, что, при использовании антронового метода, общее содержание сахаров выражается в пересчёте на глюкозу [71]. С уроновыми кислотами и пентозами антроновый реактив взаимодействует слабо, зато преимущественно реагирует с гексозами [115]. Комплекс сахаров из извлечения липы с антроновым реактивом имеет максимум поглощения при длине волны 625 ± 2 нм (Рисунок 28). Аналогичный максимум поглощения при длине волны 627 ± 2 нм отмечен для комплекса глюкозы, использованной в качестве СО (Рисунок 30). [31, 44, 111]

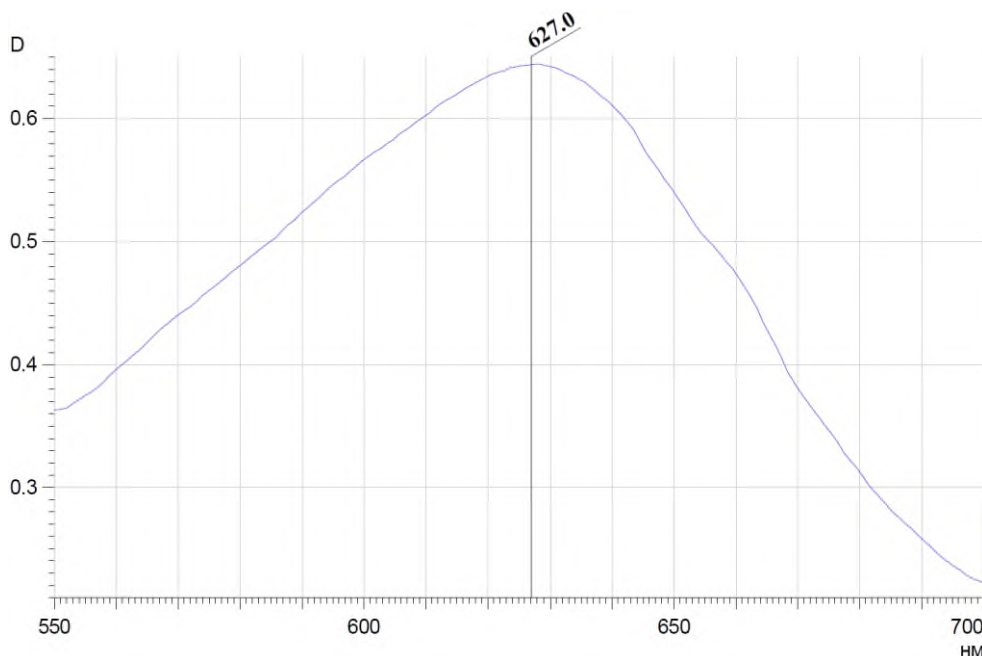


Рисунок 30 – УФ-спектр комплекса СО глюкозы с антроновым реактивом в максимуме при 627 нм

Для установления полноты экстракции восстанавливающих сахаров из цветков липы определяли влияние степени измельченности сырья (Таблица 20),

кратности экстрагирования (Таблица 21), соотношения сырья и экстрагента (Таблица 22) и оптимального времени экстракции (Таблица 23). При выборе степени измельченности использовали частицы сырья, проходящие через сито с диаметром отверстий 0,5; 1; 2; 3 мм (Таблица 20). Показано, что максимальное извлечение ПСХ достигается при измельчении сырья до размера частиц 2 мм. [44, 111]

Таблица 20 – Влияние степени измельченности цветков липы на выход ПСХ в извлечение

Размер частиц, мм	Концентрация ПСХ, %
0,5	2,12
1,0	2,44
2,0	2,60
3,0	2,23

Установлено, что наиболее полная экстракция ПСХ из цветков липы достигается трехкратной экстракцией (Таблица 21) водой дистиллированной при соотношении «сырье – экстрагент» – 1:30 (Таблица 22).

Таблица 21 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из цветков липы от кратности экстракции

Число циклов экстракции	Концентрация ПСХ, %
1	2,01
2	2,13
3	2,60
4	2,22

Таблица 22 – Влияние соотношения сырья:экстрагент на полноту извлечения ПСХ цветков липы

Отношение сырья к экстрагенту	Концентрация ПСХ, %
1:20	2,16
1:30	2,60
1:50	2,35
1:70	2,31
1:90	2,07

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 30 минут (Таблица 23).

Таблица 23 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из цветков липы от времени экстракции

Продолжительность экстракции, мин	Концентрация ПСХ, %
15	1,90
20	2,11
25	2,44
30	2,60
35	2,50
40	2,31
45	2,12

По итогам проведённых экспериментов установлено: для достижения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента антронового реактива в соотношении экстракт-комплексообразователь 1:2 (Таблица 24).

Таблица 24 – Влияние соотношения объема извлечения из цветков липы и комплексообразователя на результаты определения содержания восстанавливающих сахаров

Пропорция «извлечение:комплексообразователь»	Концентрация ПСХ, %
1:0,5	1,99
1:1	2,14
1:1,5	2,36
1:2	2,54
1:2,5	2,49

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после добавления комплексообразователя в течение 40 минут (Таблица 25). Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 25 минут и сохраняется до конца наблюдаемого периода.

Таблица 25 – Влияние времени после добавления комплексообразователя на результаты определения содержания восстанавливающих сахаров

Время после добавления комплексообразователя, мин	Концентрация ПСХ, %
15	1,76
20	2,40
25	2,55
30	2,54
40	2,53

Результаты измерения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье методом СФМ с антроновым реактивом на разных сериях приведены в Таблице 26. В ФС ГФ РФ XIV издания на цветки липы использовалась СФМ методика с пикриновой кислотой. Для суммы восстанавливающих сахаров (в составе ПСХ) в пересчете на глюкозу была введена норма «не менее 2,0 %». В связи с необходимостью установления чёткого диапазона рН пробоподготовка занимала слишком много времени и была трудоёмкой, что приводило к большому количеству ошибок и нестабильным результатам спектрофотометрического определения. Методика с антроновым реактивом в данной диссертации лишена недостатков, характерных для пикринового метода. Преимущество заключается в меньшем количестве необходимых реактивов, скорости выполнения эксперимента, в сочетании с низким процентом ошибок. Для цветков липы рекомендуем ввести предварительную норму «не менее 1,7 %».

Таблица 26 – Результаты определения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в цветках липы

Серия	Концентрация ПСХ, %
1	2,21
2	2,18
3	2,32
4	2,16
5	2,20
Среднее значение	2,21

Реактивы и материалы:

- СО глюкозы (Sigma-Aldrich, CAS: 59-23-4, чистота 99,5 %)
- Спирт этиловый 96 % (АО “РФК”)
- Вода дистиллированная
- Антрон (Glenthams, CAS: 90-44-8)
- Концентрированная H_2SO_4 (Сигма Тек, CAS: 7664-93-9)

Суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 250 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 80}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО глюкозы;

W – показатель влажности сырья, %;

P – чистота фармакопейного СО глюкозы, %;

a_1 – навеска сырья, г;

a_0 – навеска фармакопейного СО глюкозы, г.

Приготовление раствора СО:

Для методики готовят водный раствор СО глюкозы с концентрацией 48 мкг/мл [14, 15, 44].

Метрологические характеристики методики:

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что относительное стандартное отклонение (RSD) методики с доверительной вероятностью 95 % составляет около 5 %, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики. Содержание восстанавливающих сахаров в образцах ЛРП составило $2,54 \pm 0,13$ % (принятое опорное значение). В Таблице 27 приведены метрологические характеристики для методики определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в цветках липы. [14, 15, 44]

Таблица 27 – Метрологические показатели ($t(P, f) = 2,57, n = 6, P_x = 0,95$)

f	$\bar{X}, \%$	S_x	S^2_x	$S_{\bar{x}}$	$t(P, 6)$	Δx	$\bar{\varepsilon}, \%$	$RSD, \%$
5	2,54	0,12	0,014	0,049	2,57	0,13	4,93	4,70

Валидационные характеристики методики:

Специфичность.

Специфичность считается доказанной, если ни растворитель, используемый при пробоподготовке, ни реактивы, ни компоненты плацебо не искажают результат. В данном случае методика специфична, т.к. раствор экстрагента (вода дистиллированная) с антроновым реактивом, в отличие от испытуемого раствора, не обладает оптической плотностью (Рисунок 31). [52]

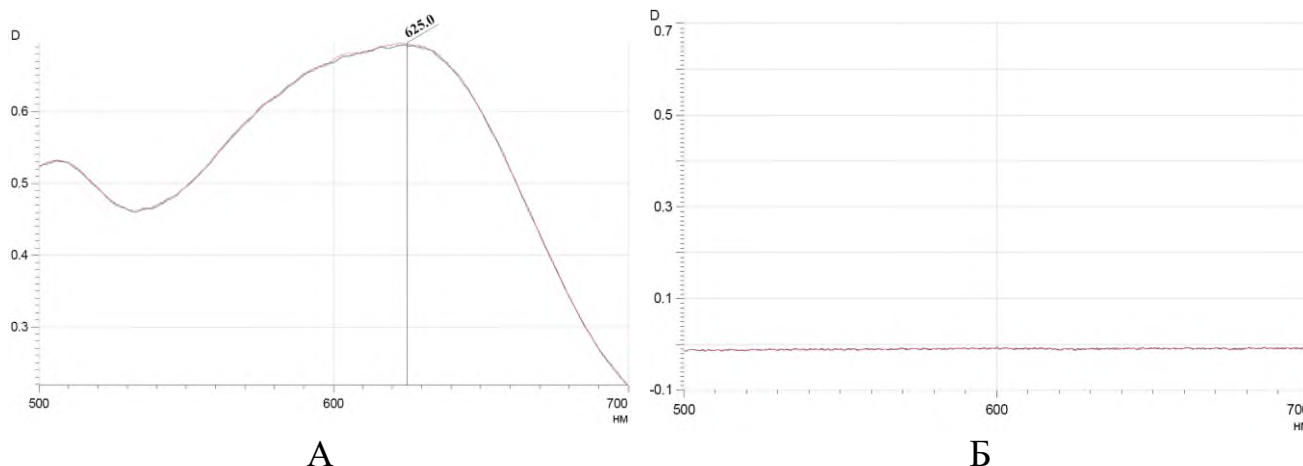


Рисунок 31 – УФ-спектры испытуемого раствора (А) и раствора экстрагента с антроновым реактивом (Б) при 625 нм

Линейность и репрезентативность.

Проводили оценку зависимости оптической плотности (y) от концентрации активного вещества (x). Данная зависимость описывается уравнением линейной регрессии типа $y=b_0+b_1x$. Степень приближения выражается величиной коэффициента корреляции (репрезентативность). Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций глюкозы – 58,33; 75; 100; 125; 150 % от нормируемого значения. Значение оптической плотности (А) рассчитывали как среднее из трёх измерений.

Линейность и репрезентативность была доказана с помощью установления критерия приемлемости – коэффициента корреляции, который должен быть равен не менее 0,995. В нашем случае он оказался равен 0,999 (Таблица 28, Рисунок 32).

Таблица 28 – Валидационное испытание линейности

Степень соответствия нормируемому значению, %	Содержание глюкозы в растворе, мкг/мл	Показатель оптической плотности
58,33	28	0,241
75	36	0,382
100	48	0,548
125	60	0,749
150	72	0,922

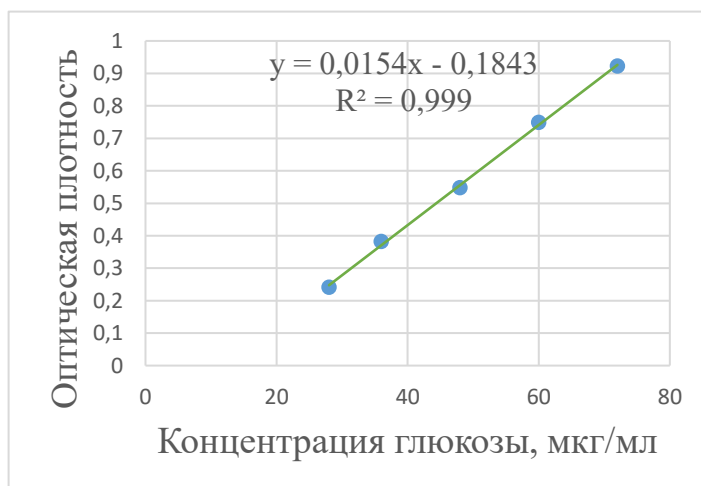


Рисунок 32 – Калибровочный график «концентрация глюкозы – оптическая плотность»

Повторяемость.

Для определения повторяемости проводился анализ одним аналитиком на одной серии в течение короткого промежутка времени с использованием одних и тех же реактивов и оборудования в шести повторностях.

Результаты анализа повторяемости, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95 %, вычисленные значения RSD – 4,70 % и доверительного интервала среднего значения – 0,13 % не превышают критериев приемлемости – 5 %. Полученные результаты

свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 29).

Таблица 29 – Результаты определения повторяемости методики

Повторность	Навеска, г	Полученное значение, %
1	1,0000	2,61
2	1,0003	2,41
3	1,0004	2,39
4	1,0002	2,65
5	1,0001	2,52
6	1,0002	2,66
Среднее значение, %		2,54
Доверительный интервал (P=95 %), %		2,54 ± 0,13 % 2,41–2,67
RSD, %		4,70

Внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Проводился анализ, с применением одинакового набора реактивов, двумя аналитиками на трёх сериях в разное время в трёх повторностях для каждого аналитика.

Величина относительного стандартного отклонения результатов при оценке внутрилабораторной прецизионности равняется 2,86–4,09 % (не превышает 5 %), что свидетельствует о прецизионности методики (Таблица 30).

Таблица 30 – Валидационное испытание воспроизводимости

Исследователь	Номер эксперимента	Концентрация ПСХ, %		
		Образец №1	Образец №2	Образец №3
1	1	2,53	2,32	2,37
1	2	2,46	2,58	2,40
1	3	2,53	2,57	2,34
2	4	2,36	2,53	2,16
2	5	2,47	2,54	2,31
2	6	2,39	2,54	2,21
Среднее значение, %		2,46	2,51	2,30
RSD, %		2,86	3,85	4,09

Правильность.

Правильность определяли методом добавок путём проведения анализа одним аналитиком на одной серии с установленной концентрацией определяемого вещества с добавлением разного количества стандарта. Для каждого уровня добавок проводили определение в трёх повторностях. Критерием приемлемости для данного раздела является «выход» (открываемость) recovery, величина которого должна находиться в пределах 95–105 % и определяется отношением полученного к ожидаемому значению, переведённое в проценты.

Средняя величина процента «выхода» в разработанной методике составила 97,79 % (Таблица 31). Данное значение укладывается в допустимые пределы, доказывая правильность методики.

Таблица 31 – Валидационное испытание правильности

Обнаружено, мг	Добавлено СО глюкозы, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Величина открываемости, %
25,21	10,0	35,21	35,08	99,63
25,21	10,0	35,21	35,06	99,57
25,21	10,0	35,21	35,07	99,60
25,21	20,0	45,21	43,25	95,66
25,21	20,0	45,21	43,25	95,66
25,21	20,0	45,21	43,21	95,58
25,21	30,0	55,21	53,97	97,75
25,21	30,0	55,21	54,00	97,81
25,21	30,0	55,21	53,97	97,75
25,21	40,0	65,21	64,02	98,18
25,21	40,0	65,21	64,00	98,14
25,21	40,0	65,21	64,01	98,16
Среднее значение, %				97,79

4.2. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии в цветках липы

Разработка методики:

В ходе разработки методики необходимо было определить, какой СО стоит использовать. Для этого в диапазоне длин волн 300–500 нм исследовали испытуемые образцы цветков липы и выявили, что значение оптической плотности максимально при $\lambda = 410 \pm 2$ нм (Рисунок 29). Среди распространённых флавоноидов аналогичный максимум оптической плотности демонстрирует рутин (Рисунок 33). [14, 15, 44]

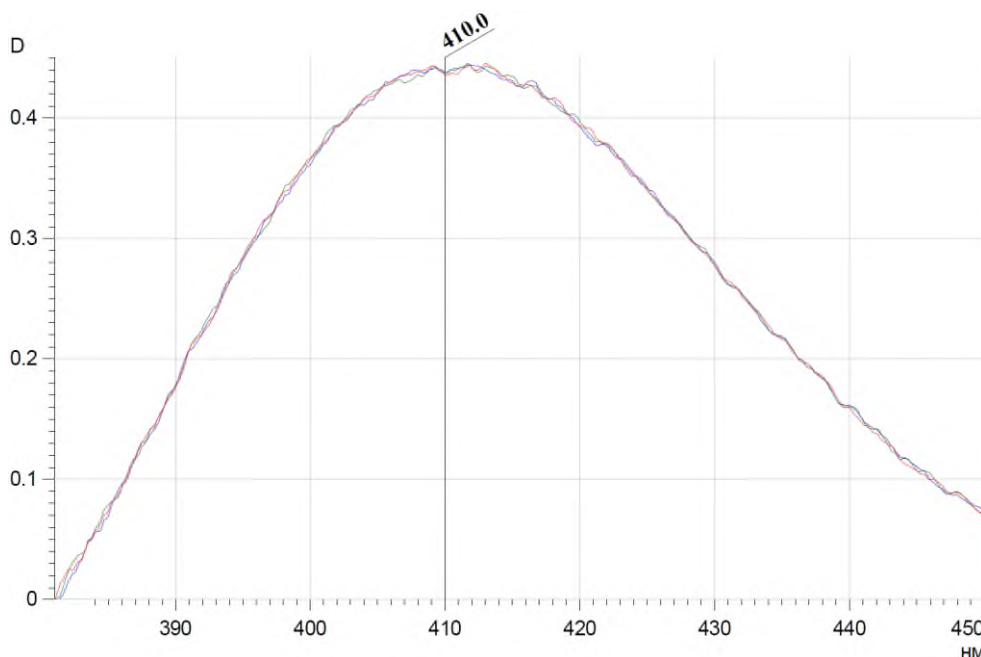


Рисунок 33 – УФ-спектр ($\lambda_{\text{max}} = 410$ нм) для комплекса «СО рутин – AlCl_3 »

В связи с перечисленными выше данными, целесообразно применять в качестве вещества сравнения СО рутин. Расчёты суммарного содержания флавоноидов стоит проводить в пересчёте на рутин [14, 15, 44].

Для установления полноты экстракции флавоноидов из цветков липы изучали влияние концентрации спирта этилового (Таблица 32), степени измельченности сырья (Таблица 33), кратности экстрагирования (Таблица 34), соотношения сырья и экстрагента (Таблица 35) и оптимального времени

экстракции (Таблица 36). В результате использования этанола в качестве экстрагента в различных концентрациях (40–96 %) выявлена оптимальная концентрация равная 70 % (Таблица 32). [14, 15, 41, 44]

Таблица 32 – Зависимость степени извлечения флавоноидов из цветков липы от концентрации этилового спирта

Концентрация спирта этилового, %	Концентрация флавоноидов, %
40	0,98
70	2,80
96	1,77

При выборе степени измельченности использовали частицы сырья, проходящие через сито с диаметром отверстий 0,5; 1; 2 мм (Таблица 33). Показано, что максимальное извлечение флавоноидов достигается при измельчении сырья до размера частиц 1 мм.

Таблица 33 – Влияние степени измельченности цветков липы на выход флавоноидов в извлечение

Размер частиц, мм	Концентрация флавоноидов, %
0,5	2,20
1,0	2,80
2,0	2,31

Установлено, что наиболее полная экстракция флавоноидов из цветков липы достигается однократной экстракцией (Таблица 34) водой дистиллированной при соотношении «сырье – экстрагент» – 1:50 (Таблица 35).

Таблица 34 – Зависимость полноты извлечения флавоноидов из цветков липы от кратности экстракции

Число циклов экстракции	Концентрация флавоноидов, %
1	2,80
2	2,26
3	2,80

Таблица 35 – Влияние соотношения сырья:экстрагент на полноту извлечения флавоноидов цветков липы

Пропорция сырья и спирта	Концентрация флавоноидов, %
1:20	2,28
1:30	2,30
1:50	2,80
1:70	2,28
1:90	2,14

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 1,5 часа (Таблица 36).

Таблица 36 – Зависимость полноты извлечения флавоноидов из цветков липы от времени экстракции

Продолжительность экстракции, часы	Концентрация флавоноидов, %
0,5	1,86
1,0	2,22
1,25	2,66
1,5	2,80
1,75	2,71
2,0	2,69
2,5	2,67

По итогам проведённых экспериментов установлено: для достижения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % в соотношении экстракт-комплексообразователь 1:2 (Таблица 37) [14, 15, 44].

Таблица 37 – Зависимость результатов определения содержания флавоноидов от соотношения объёма извлечения из цветков липы и комплексообразователя

Пропорция «извлечение:комплексообразователь»	Концентрация флавоноидов, %
1:0,5	2,09
1:1	2,42
1:1,5	2,61

Продолжение Таблицы 37

1:2	2,78
1:2,5	2,66

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после добавления комплексообразователя в течение 1 часа 30 минут (Таблица 38). Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 1 час и сохраняется до конца наблюдаемого периода.

Таблица 38 – Влияние времени после добавления комплексообразователя на результаты определения содержания флавоноидов

Время после добавления комплексообразователя, мин	Концентрация флавоноидов, %
60	2,11
75	2,69
90	2,88
105	2,83
120	2,83

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин методом СФМ на разных сериях приведены в Таблице 39. Предлагаем установить для цветков липы предварительную норму «не менее 2,0 %». В настоящее время для суммы флавоноидов в пересчёте на кверцетин в сухом сырье цветков липы согласно ГФ РФ XV издания определена норма «не менее 0,4 %». Эта методика является устаревшей и характеризуется длительностью и трудоёмкостью выполняемого анализа. Для проведения эксперимента необходимо использовать большое количество реактивов. При разработке нашей методики было доказано, что оптимально использовать рутин в качестве стандартного образца, вместо кверцетина. Также преимущества нашей методики – скорость и простота выполнения.

Таблица 39 – Результаты определения содержания суммы флавоноидов в цветках липы

Серия	Концентрация флавоноидов, %
1	2,63
2	2,52
3	2,57
4	2,51
5	2,59
Среднее значение	2,56

Реактивы и материалы:

- Аллюминия хлорид гексагидрат (Sigma-Aldrich, CAS: 7784-13-6)
- СО рутина (Sigma-Aldrich, CAS: 153-18-4, чистота 98,0 %)
- Этанол 96 % (АО “РФК”)
- Ледяная уксусная кислота (АО «База №1 Химреактивов», CAS: 64-19-7)
- Вода дистиллированная

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

- где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;
 A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;
 a_1 – навеска сырья, г;
 a_0 – навеска фармакопейного СО рутина, г;
 P – содержание рутина в фармакопейном СО рутина, %;
 W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{260 \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 480,77}{a \cdot (100 - W)},$$

- где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

- a – навеска сырья, г;
 260 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм ($A_{1\text{ см}}^1\%$);
 W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора СО:

Для методики готовят раствор СО рутина в спирте 96 % с концентрацией 500 мкг/мл.

Метрологические характеристики методики:

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что относительная ошибка методики с доверительной вероятностью 95 % составляет около 3 %, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики. Содержание флавоноидов в образцах ЛРП составило $2,78 \pm 0,09$ % (принятое опорное значение). В Таблице 40 приведены метрологические характеристики для методики определения суммы флавоноидов в цветках липы. [14, 15, 44]

Таблица 40 – Метрологические показатели ($t(P, f) = 2,57, n = 6, P_x = 0,95$)

f	$\bar{X}, \%$	S_x	S_x^2	$S_{\bar{x}}$	$t(P, 6)$	Δx	$\bar{\varepsilon}, \%$	$RSD, \%$
5	2,78	0,09	0,008	0,037	2,57	0,09	3,41	3,25

Валидационные характеристики методики:

Специфичность.

Специфичность считается доказанной, если ни растворитель, используемый при пробоподготовке, ни реактивы, ни компоненты плацебо не искажают результат. Специфичность методики подтверждается тем, что испытуемый раствор с комплексообразователем (раствор 2 % хлорида алюминия в 96 % этаноле) обладает оптической плотностью. В то время как в раствор экстрагента (этанол 70 %) с комплексообразователем не проявляет оптической плотности (Рисунок 34). [52]

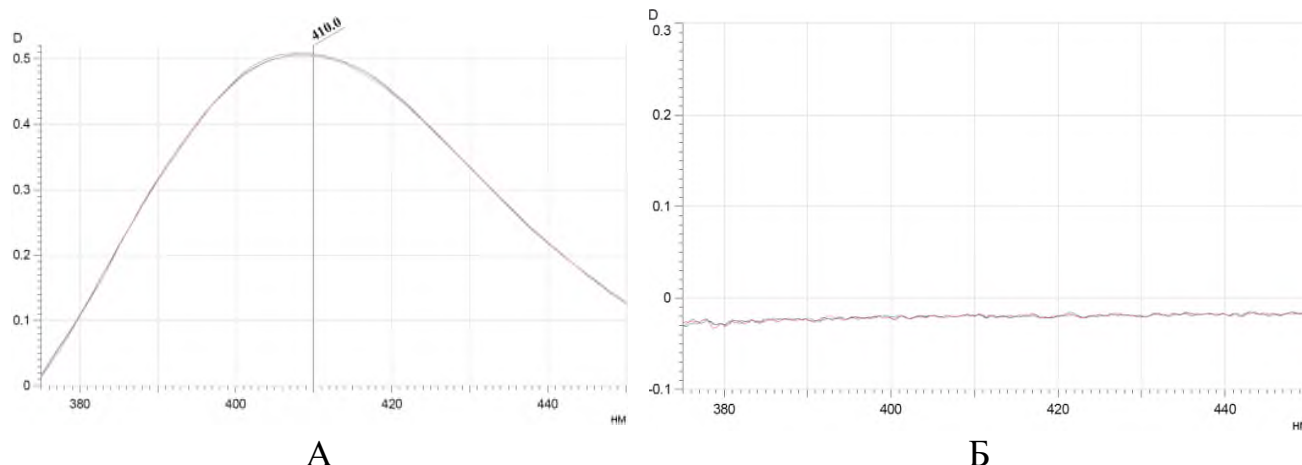


Рисунок 34 – УФ-спектры испытуемого раствора (А) и экстрагента (Б) с комплексообразователем, при $\lambda = 410$ нм

Линейность и репрезентативность.

Проводили оценку зависимости оптической плотности (y) от концентрации активного вещества (x), которая описывается уравнением линейной регрессии типа $y=b_0+b_1x$, степень приближения к которому выражается величиной коэффициента корреляции (репрезентативность). Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций рутина – 50, 75, 100, 125, 150 % от нормируемого значения. Значение оптической плотности (А) рассчитывали как среднее из трёх измерений.

Линейность и репрезентативность была доказана с помощью установления критерия приемлемости – коэффициента корреляции, который должен быть равен не менее 0,995. В нашем случае он оказался равен 0,999 (Таблица 41, Рисунок 35).

Таблица 41 – Показатели линейности

Доля от нормируемого значения, %	Концентрация рутина в растворе, мкг/мл	Показатель оптической плотности
50	250	0,229
75	375	0,327
100	500	0,444
125	625	0,560
150	750	0,660

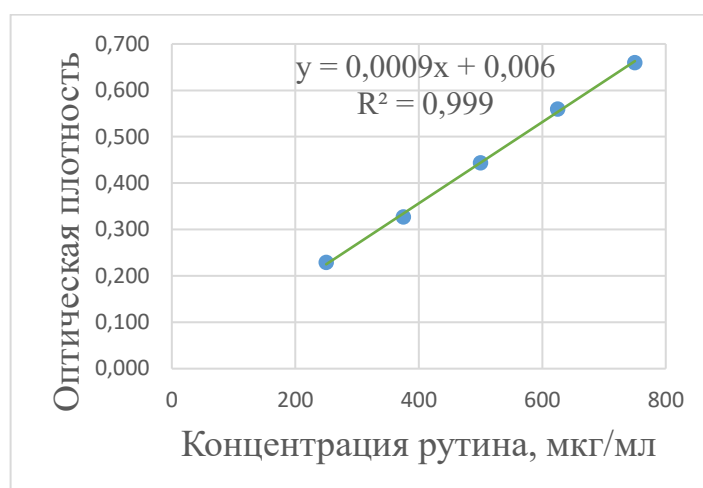


Рисунок 35 – Калибровочный график «концентрация рутина – оптическая плотность»

Повторяемость.

Для определения повторяемости проводился анализ одним аналитиком на одной серии в течение короткого промежутка времени с использованием одних и тех же реактивов и оборудования в шести повторностях.

Результаты анализа повторяемости, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95 %, вычисленные значения RSD – 3,25 % и доверительного интервала среднего значения – 0,09 % не превышают критериев приемлемости – 5 %, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 42).

Таблица 42 – Результаты определения повторяемости методики

Повторность	Навеска, г	Полученное значение, %
1	1,2500	2,85
2	1,2500	2,74
3	1,2499	2,91
4	1,2500	2,67
5	1,2503	2,80
6	1,2502	2,71
Среднее значение, %		2,78
RSD, %		3,25
Доверительный интервал (P=95 %), %		2,78 ± 0,09 % 2,69–2,87

Внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Проводился анализ, с применением одинакового набора реактивов, двумя аналитиками на трёх сериях в разное время в трёх повторностях для каждого аналитика.

Величина относительного стандартного отклонения результатов при оценке внутрилабораторной прецизионности равняется 2,97–4,67 % (не превышает 5 %), что свидетельствует о прецизионности методики (Таблица 43).

Таблица 43 – Валидационное испытание воспроизводимости

Исследователь	Номер эксперимента	Концентрация флавоноидов, %		
		Образец №1	Образец №2	Образец №3
1	1	2,85	2,50	2,59
1	2	2,67	2,63	2,64
1	3	2,78	2,57	2,73
2	4	2,71	2,72	2,80
2	5	2,89	2,54	2,51
2	6	2,54	2,58	2,67
Среднее значение, %		2,74	2,59	2,66
RSD, %		4,67	2,97	3,85

Правильность.

Правильность определяли методом добавок путём проведения анализа одним аналитиком на одной серии с установленной концентрацией определяемого вещества с добавлением разного количества стандарта. Для каждого уровня добавок проводили определение в трёх повторностях. Критерием приемлемости для данного раздела является «выход» (открываемость) recovery, величина которого должна находиться в пределах 95–105 % и определяется отношением полученного к ожидаемому значению, переведённое в проценты.

Средняя величина процента «выхода» в разработанной методике составила 97,86 % (Таблица 44). Данное значение укладывается в допустимые пределы, доказывая правильность методики.

Таблица 44 – Валидационное испытание правильности

Обнаружено, мг	Добавлено СО рутина, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Величина открываемости, %
34,73	10,0	44,73	43,24	96,67
34,73	10,0	44,73	44,01	98,39
34,73	10,0	44,73	42,98	96,09
34,73	20,0	54,73	54,52	99,62
34,73	20,0	54,73	52,21	95,40
34,73	20,0	54,73	53,17	97,15
34,73	30,0	64,73	63,11	97,50
34,73	30,0	64,73	63,18	97,61
34,73	30,0	64,73	63,53	98,15
34,73	40,0	74,73	74,60	99,83
34,73	40,0	74,73	74,06	99,10
34,73	40,0	74,73	73,88	98,86
Среднее значение, %				97,86

4.3. Разработка и валидация методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов методом спектрофотометрии в слоевищах ламинарии

Разработка методики:

В состав ПСХ объектов исследования в основном входят гексозы в форме пираноз, поэтому глюкоза была выбрана в качестве СО. Литературные данные подтверждают, что, при использовании антронового метода, общее содержание сахаров выражается в пересчёте на глюкозу [71]. С уроновыми кислотами и пентозами антроновый реактив взаимодействует слабо, зато преимущественно реагирует с гексозами [115]. Комплекс сахаров из извлечения ламинарии с антроновым реактивом имеет максимум поглощения при длине волны 625 ± 2 нм (Рисунок 28). Аналогичный максимум поглощения при длине волны 627 ± 2 нм отмечен для комплекса глюкозы, использованной в качестве СО (Рисунок 30). [31, 44, 111]

С целью оценки полноты извлечения восстанавливающих сахаров из слоевищ ламинарии исследовали влияние степени измельченности сырья (Таблица

45), кратности экстрагирования (Таблица 46), соотношения сырья и экстрагента (Таблица 47) и оптимального времени экстракции (Таблица 48) [14, 15, 44]. При выборе степени измельченности использовали частицы сырья, проходящие через сито с диаметром отверстий 0,5; 1; 2; 3 мм (Таблица 45). Показано, что максимальное извлечение ПСХ достигается при измельчении сырья до размера частиц 2 мм.

Таблица 45 – Влияние степени измельченности слоевищ ламинарии на выход ПСХ в извлечение

Размер частиц, мм	Концентрация ПСХ, %
0,5	2,10
1,0	2,21
2,0	2,27
3,0	2,19

Установлено, что наиболее полная экстракция ПСХ из слоевищ ламинарии достигается трехкратной экстракцией (Таблица 46) водой дистиллированной при соотношении «сырьё – экстрагент» – 1:30 (Таблица 47).

Таблица 46 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из слоевищ ламинарии от кратности экстракции

Число циклов экстракции	Концентрация ПСХ, %
1	2,11
2	2,21
3	2,27
4	2,20

Таблица 47 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из слоевищ ламинарии от соотношения сырья/экстрагент

Пропорция сырья и экстрагента	Концентрация ПСХ, %
1:20	2,19
1:30	2,27
1:50	2,20
1:70	2,11
1:90	2,09

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 30 минут (Таблица 48).

Таблица 48 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из слоевищ ламинарии от времени экстракции

Продолжительность экстракции, мин	Концентрация ПСХ, %
15	1,93
20	2,05
25	2,19
30	2,27
35	2,17
40	2,15
45	2,11

По итогам проведённых экспериментов установлено: для достижения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента антронового реактива в соотношении экстракт-комплексообразователь 1:2 (Таблица 49). [14, 15, 44]

Таблица 49 – Влияние соотношения объема извлечения из слоевищ ламинарии и комплексообразователя на результаты определения содержания восстанавливающих сахаров

Пропорция «извлечение:комплексообразователь»	Концентрация ПСХ, %
1:0,5	1,87
1:1	1,96
1:1,5	2,10
1:2	2,22
1:2,5	2,20

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после добавления комплексообразователя в течение 40 минут (Таблица 50). Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 25 минут и сохраняется до конца наблюдаемого периода.

Таблица 50 – Влияние времени после добавления комплексообразователя на результаты определения содержания восстанавливающих сахаров

Время после добавления комплексообразователя, мин	Концентрация ПСХ, %
15	1,69
20	2,14
25	2,29
30	2,28
40	2,26

Результаты измерения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье методом СФМ с антроновым реактивом на разных сериях приведены в Таблице 51. Рекомендуем установить предварительную норму для слоевищ ламинарии «не менее 1,5 %». Ранее в ГФ РФ XIV издания для слоевищ ламинарии была установлена норма «не менее 8,0 %» для ПСХ в абсолютно сухом сырье, которые определяли методом гравиметрии. Данный метод является длительным в исполнении, в отличие от метода СФМ, который мы использовали. Наша методика более специфична и чувствительна.

Таблица 51 – Результаты определения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в слоевищах ламинарии

Серия	Концентрация ПСХ, %
1	2,32
2	2,12
3	2,33
4	2,28
5	2,17
Среднее значение	2,24

Реактивы и материалы:

Описание используемых реактивов приведено в главе 4.1. настоящей работы.

Расчёт содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ:

Расчётная формула приведена в главе 4.1. настоящей работы.

Приготовление раствора СО:

Приготовление раствора СО описано в главе 4.1. настоящей работы.

Метрологические характеристики методики:

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что относительная ошибка методики с доверительной вероятностью 95 % составляет около 4 %, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики. Содержание восстанавливающих сахаров в образцах ЛРП составило $2,22 \pm 0,10$ % (принятое опорное значение). В Таблице 52 приведены метрологические характеристики для методики определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в слоевищах ламинарии. [14, 15, 44]

Таблица 52 – Метрологические показатели ($t(P, f) = 2,57$, $n = 6$, $P_x = 0,95$)

f	$\bar{X}$, %	S_x	S^2_x	$S_{\bar{x}}$	$t(P, 6)$	Δx	$\bar{\epsilon}$, %	RSD , %
5	2,22	0,09	0,009	0,039	2,57	0,10	4,46	4,25

Валидационные характеристики методики:

Специфичность.

Условия и результаты проведения испытания описаны в главе 4.1. настоящей работы.

Линейность и репрезентативность.

Условия и результаты проведения испытания описаны в главе 4.1. настоящей работы.

Повторяемость.

Для определения повторяемости проводился анализ одним аналитиком на одной серии в течение короткого промежутка времени с использованием одних и тех же реактивов и оборудования в шести повторностях.

Результаты анализа повторяемости, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95 %, вычисленные значения RSD – 4,25 % и доверительного интервала среднего значения – 0,10 % не превышают критериев приемлемости – 5 %, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 53).

Таблица 53 – Результаты определения повторяемости методики

Повторность	Навеска, г	Полученное значение, %
1	1,0001	2,10
2	1,0002	2,35
3	1,0003	2,18
4	1,0001	2,24
5	1,0001	2,30
6	1,0000	2,15
Среднее значение, %		2,22
RSD, %		4,25
Доверительный интервал (P=95 %), %		2,22 ± 0,10 % 2,12–2,32

Внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Проводился анализ, с применением одинакового набора реактивов, двумя аналитиками на трёх сериях в разное время в трёх повторностях для каждого аналитика. Величина относительного стандартного отклонения результатов при оценке внутрилабораторной прецизионности равняется 2,94–4,12 % (не превышает 5 %), что свидетельствует о прецизионности методики (Таблица 54).

Таблица 54 – Валидационное испытание воспроизводимости

Исследователь	Номер эксперимента	Концентрация ПСХ, %		
		Образец №1	Образец №2	Образец №3
1	1	2,12	2,05	2,08
1	2	2,25	2,18	2,19
1	3	2,18	2,12	2,12
2	4	2,33	2,09	2,25
2	5	2,09	2,23	2,14
2	6	2,23	1,99	2,10
Среднее значение, %		2,20	2,11	2,15
RSD, %		4,02	4,12	2,94

Правильность.

Правильность определяли методом добавок путём проведения анализа одним аналитиком на одной серии с установленной концентрацией определяемого вещества с добавлением разного количества стандарта. Для каждого уровня

добавок проводили определение в трёх повторностях. Критерием приемлемости для данного раздела является «выход» (открываемость) recovery, величина которого должна находиться в пределах 95–105 % и определяется отношением полученного к ожидаемому значению, переведённое в проценты.

Средняя величина процента «выхода» в разработанной методике составила 97,51 % (Таблица 55). Данное значение укладывается в допустимые пределы, доказывая правильность методики.

Таблица 55 – Валидационное испытание правильности

Обнаружено, мг	Добавлено СО глюкозы, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Величина открываемости, %
22,23	10,0	32,23	32,04	99,41
22,23	10,0	32,23	32,21	99,94
22,23	10,0	32,23	32,12	99,66
22,23	20,0	42,23	40,19	95,17
22,23	20,0	42,23	41,46	98,18
22,23	20,0	42,23	41,17	97,49
22,23	30,0	52,23	51,44	98,49
22,23	30,0	52,23	50,64	96,96
22,23	30,0	52,23	50,51	96,71
22,23	40,0	62,23	59,54	95,68
22,23	40,0	62,23	60,02	96,45
22,23	40,0	62,23	59,77	96,05
Среднее значение, %				97,51

4.4. Разработка и валидация методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов методом спектрофотометрии в семенах льна

Разработка методики:

В состав ПСХ объектов исследования в основном входят гексозы в форме пираноз, поэтому глюкоза была выбрана в качестве СО. Литературные данные подтверждают, что, при использовании антронового метода, общее содержание сахаров выражается в пересчёте на глюкозу [71]. С уроновыми кислотами и

пентозами антроновый реактив взаимодействует слабо, зато преимущественно реагирует с гексозами [115]. Комплекс сахаров из извлечения льна с антроновым реактивом имеет максимум поглощения при длине волны 625 ± 2 нм (Рисунок 28). Аналогичный максимум поглощения при длине волны 627 ± 2 нм отмечен для комплекса глюкозы, использованной в качестве СО (Рисунок 30). [31, 44, 111]

С целью оценки полноты извлечения восстанавливающих сахаров из семян льна исследовали влияние степени измельченности сырья (Таблица 56), кратности экстрагирования (Таблица 57), соотношения сырья и экстрагента (Таблица 58) и оптимального времени экстракции (Таблица 59) [14, 15, 44]. При выборе степени измельченности использовали частицы сырья, проходящие через сито с диаметром отверстий 0,5; 1; 2; 3 мм (Таблица 56). Показано, что максимальное извлечение ПСХ достигается при измельчении сырья до размера частиц 2 мм.

Таблица 56 – Влияние степени измельченности семян льна на выход ПСХ в извлечение

Размер частиц, мм	Концентрация ПСХ, %
0,5	2,20
1,0	2,33
2,0	2,45
3,0	2,31

Установлено, что наиболее полная экстракция ПСХ из семян льна достигается трехкратной экстракцией (Таблица 57) водой дистиллированной при соотношении «сырье – экстрагент» – 1:30 (Таблица 58).

Таблица 57 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из семян льна от кратности экстракции

Число циклов экстракции	Концентрация ПСХ, %
1	2,14
2	2,26
3	2,45
4	2,38

Таблица 58 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из семян льна от соотношения сырьё/экстрагент

Пропорция сырья и экстрагента	Концентрация ПСХ, %
1:20	2,28
1:30	2,45
1:50	2,33
1:70	2,28
1:90	2,14

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 30 минут (Таблица 59).

Таблица 59 – Зависимость полноты извлечения ПСХ из семян льна от времени экстракции

Продолжительность экстракции, мин	Концентрация ПСХ, %
15	2,01
20	2,22
25	2,39
30	2,45
35	2,35
40	2,29
45	2,21

По итогам проведённых экспериментов установлено: для достижения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента антронового реактива в соотношении экстракт-комплексообразователь 1:2 (Таблица 60). [14, 15, 44]

Таблица 60 – Влияние соотношения объема извлечения из семян льна и комплексообразователя на результаты определения содержания восстанавливающих сахаров

Пропорция «извлечение:комплексообразователь»	Концентрация ПСХ, %
1:0,5	1,97
1:1	2,12
1:1,5	2,29

Продолжение Таблицы 60

1:2	2,41
1:2,5	2,36

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после добавления комплексообразователя в течение 40 минут (Таблица 61). Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 25 минут и сохраняется до конца наблюдаемого периода.

Таблица 61 – Влияние времени после добавления комплексообразователя на результаты определения содержания восстанавливающих сахаров

Время после добавления комплексообразователя, мин	Концентрация ПСХ, %
15	1,81
20	2,28
25	2,52
30	2,51
40	2,51

Результаты измерения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье методом СФМ с антроновым реактивом на разных сериях приведены в Таблице 62. Рекомендуем установить предварительную норму для семян льна «не менее 1,6 %». Ранее в ГФ РФ XIV издания для семян льна была установлена норма «не менее 7,0 %» для суммы ПСХ в абсолютно сухом сырье, которую определяли методом гравиметрии. Данный метод является длительным в исполнении, в отличие от метода СФМ, который мы использовали. Наша методика более специфична и чувствительна.

Таблица 62 – Результаты определения содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в семенах льна

Серия	Концентрация ПСХ, %
1	2,54
2	2,52
3	2,53

Продолжение Таблицы 62

4	2,51
5	2,54
Среднее значение	2,53

Реактивы и материалы:

Описание используемых реактивов приведено в главе 4.1. настоящей работы.

Расчёт содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ:

Расчётная формула приведена в главе 4.1. настоящей работы.

Приготовление раствора СО:

Приготовление раствора СО описано в главе 4.1. настоящей работы.

Метрологические характеристики методики:

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что относительная ошибка методики с доверительной вероятностью 95 % составляет около 4 %, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики. Содержание восстанавливающих сахаров в образцах ЛРП составило $2,41 \pm 0,09$ % (принятое опорное значение). В Таблице 63 приведены метрологические характеристики для методики определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в семенах льна. [14, 15, 44]

Таблица 63 – Метрологические показатели ($t(P, f) = 2,57, n = 6, P_x = 0,95$)

f	$\bar{X}, \%$	S_x	S^2_x	$S_{\bar{x}}$	$t(P, 6)$	Δx	$\bar{\varepsilon}, \%$	$RSD, \%$
5	2,41	0,09	0,008	0,036	2,57	0,09	3,83	3,65

Валидационные характеристики методики:

Специфичность.

Условия и результаты проведения испытания описаны в главе 4.1. настоящей работы.

Линейность и репрезентативность.

Условия и результаты проведения испытания описаны в главе 4.1. настоящей работы.

Повторяемость.

Для определения повторяемости проводился анализ одним аналитиком на одной серии в течение короткого промежутка времени с использованием одних и тех же реактивов и оборудования в шести повторностях.

Результаты анализа повторяемости, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95 %, вычисленные значения RSD – 3,65 % и доверительного интервала среднего значения – 0,09 % не превышают критериев приемлемости – 5 %, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 64).

Таблица 64 – Результаты определения повторяемости методики

Повторность	Навеска, г	Полученное значение, %
1	1,0003	2,36
2	1,0001	2,47
3	1,0000	2,54
4	1,0000	2,35
5	1,0002	2,41
6	1,0000	2,30
Среднее значение, %		2,41
RSD, %		3,65
Доверительный интервал (P=95 %), %		2,41 ± 0,09 % 2,32–2,50

Внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Проводился анализ, с применением одинакового набора реактивов, двумя аналитиками на трёх сериях в разное время в трёх повторностях для каждого аналитика.

Величина относительного стандартного отклонения результатов при оценке внутрилабораторной прецизионности равняется 3,39–4,28 % (не превышает 5 %), что свидетельствует о прецизионности методики (Таблица 65).

Таблица 65 – Валидационное испытание воспроизводимости

Исследователь	Номер эксперимента	Концентрация ПСХ, %		
		Образец №1	Образец №2	Образец №3
1	1	2,31	2,41	2,21
1	2	2,45	2,29	2,37
1	3	2,38	2,36	2,12
2	4	2,50	2,17	2,24
2	5	2,36	2,45	2,18
2	6	2,29	2,30	2,30
Среднее значение, %		2,38	2,33	2,24
RSD, %		3,39	4,28	3,97

Правильность.

Правильность определяли методом добавок путём проведения анализа одним аналитиком на одной серии с установленной концентрацией определяемого вещества с добавлением разного количества стандарта. Для каждого уровня добавок проводили определение в трёх повторностях. Критерием приемлемости для данного раздела является «выход» (открываемость) recovery, величина которого должна находиться в пределах 95–105 % и определяется отношением полученного к ожидаемому значению, переведённое в проценты.

Средняя величина процента «выхода» в разработанной методике составила 96,78 % (Таблица 66). Данное значение укладывается в допустимые пределы, доказывая правильность методики.

Таблица 66 – Валидационное испытание правильности

Обнаружено, мг	Добавлено СО глюкозы, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Величина открываемости, %
24,11	10,0	34,11	32,46	95,16
24,11	10,0	34,11	32,96	96,63
24,11	10,0	34,11	32,77	96,07
24,11	20,0	44,11	42,48	96,30
24,11	20,0	44,11	42,55	96,46
24,11	20,0	44,11	42,61	96,60
24,11	30,0	54,11	52,31	96,67
24,11	30,0	54,11	52,27	96,60
24,11	30,0	54,11	52,46	96,95

Продолжение Таблицы 66

24,11	40,0	64,11	63,01	98,28
24,11	40,0	64,11	62,73	97,85
24,11	40,0	64,11	62,69	97,79
Среднее значение, %				96,78

В результате проведённых экспериментов были разработаны и успешно прошли валидацию спектрофотометрические методики определения содержания восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна, а также суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье цветков липы. Полученные методики могут быть рекомендованы для стандартизации указанных ЛРП, производимых на территории РФ. Результаты проведенных валидационных испытаний позволяют предложить включение данных методик количественного определения в проекты ФС на изучаемые объекты.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Разработаны методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ методом СФМ для цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна. Также разработана методика количественного определения суммы флавоноидов методом СФМ для цветков липы. Для оптимального извлечения фракции флавоноидов из цветков липы необходимо провести однократную экстракцию 1,25 г измельчённого сырья (частицы размером 1 мм) в течение 1,5 часов 70 % этанолом. Для ПСХ изучаемых ЛРП оптимальным режимом является трёхкратная экстракция водой по 30 мин из навески 1,0 г (частицы размером 2 мм).

2. Комплексная валидация по показателям правильности, повторяемости, воспроизводимости, специфичности, линейности и репрезентативности подтвердила возможность применения методик для определения суммы флавоноидов в цветках липы и суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в цветках липы, слоевищах ламинарии и семенах льна.

3. Для цветков липы сумма флавоноидов находится в пределах 2,50–2,91 %. Сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ составила: 2,16–2,66 % – в цветках липы; 1,99–2,35 % – в слоевищах ламинарии; 2,12–2,54 % – в семенах льна.

4. На основании полученных результатов, рекомендуется установить следующие предварительные нормы: «не менее 2,0 %» для показателя «Сумма флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье цветков липы»; «не менее 1,6 %» (семена льна), «не менее 1,7 %» (цветки липы), «не менее 1,5 %» (слоевища ламинарии) для показателя «Сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье». Перечисленные показатели включены в проекты ФС соответствующих объектов (Приложение А). ЛРП всех объектов заложены на хранение и исследования будут проводиться дальше.

ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ В СОСТАВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В ВОДНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЯХ И РАЗОВОЙ ДОЗЕ ПРИЁМА

В ходе анализа НД и научной литературы не было выявлено работ, систематическим образом описывающих стандартизацию исследуемых объектов и учитывающих принцип «сквозной стандартизации» фармацевтических субстанций растительного происхождения (ФСРП) и лекарственных препаратов на их основе, с применением высокоспецифичных методов анализа. Поэтому мы провели количественное определение основных групп БАС в водных извлечениях, приготовленных из ЛРП цветков липы и семян льна в различных лекарственных формах (ЛФ), а также в разовой дозе препарата из слоевищ ламинарии с применением разработанных и валидированных методик спектрофотометрического анализа (подробные условия методик указаны в главе 4).

5.1. Определение суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в водных извлечениях цветков липы

Водное извлечение измельчённых цветков липы, выпускаемых в пачках готовят по методике, указанной в инструкции по медицинскому применению ЛРП.

Затем в коническую колбу помещают 20 мл водного извлечения, прибавляют 60 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Водное извлечение порошка цветков липы, выпускаемых в фильтр-пакетах готовят по инструкции на упаковке препарата: в эмалированную либо стеклянную

посуду закладывают два фильтр-пакета (3,0 г); приливают 200 мл кипятка, а затем и выдерживают 15 минут накрыв крышкой; после настаивания пакетики отжимают. Объем полученного водного извлечения доводят кипяченой водой до 200 мл.

Затем в коническую колбу помещают 40 мл водного извлечения, прибавляют 120 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Далее с полученными водными извлечениями после реакции с антроновым реактивом проводят измерения оптической плотности относительно раствора сравнения и раствора СО глюкозы.

Результаты определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ спектрофотометрическим методом в водных извлечениях цветков липы представлены в Таблице 67.

Таблица 67 – Водные извлечения цветков липы: содержание суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ

ЛФ	Содержание, %						RSD, %
	1	2	3	4	5	Среднее	
ЛРС-порошок в фильтр-пакетах	0,13	0,14	0,13	0,13	0,13	$0,13 \pm 0,01$	3,39
Измельчённое ЛРС в пачках	0,21	0,22	0,23	0,22	0,22	$0,22 \pm 0,01$	3,21

В водных извлечениях измельчённых цветков липы сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу составила 0,22 %, в фильтр-пакетах обнаружено 0,13 %, что меньше, чем в исходном ЛРП (2,54 %) в 11,5 раз и в 19,5 раз соответственно.

5.2. Определение суммы флавоноидов в водных извлечениях цветков липы

Водные извлечения из порошка и измельчённых цветков липы готовят аналогичным образом.

Для приготовления раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл водного извлечения, прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Испытуемые растворы готовят следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл водного извлечения, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки. Далее относительно раствора СО рутина и раствора сравнения определяют оптическую плотность.

Результаты определения суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом в водных извлечениях цветков липы представлены в Таблице 68.

Таблица 68 – Содержание суммы флавоноидов в водных извлечениях цветков липы

ЛФ	Содержание, %						RSD, %
	1	2	3	4	5	Среднее	
ЛРС-порошок в фильтр-пакетах	0,11	0,11	0,11	0,10	0,11	0,11 ± 0,01	4,14
Измельчённое ЛРС в пачках	0,22	0,23	0,22	0,24	0,22	0,23 ± 0,01	3,96

Сумма флавоноидов в пересчёте на рутин в водных извлечениях измельчённых цветков липы равна 0,23 %, тогда как в фильтр-пакетах выявлено 0,11 %. По сравнению с исходным ЛРП (2,78 %) данные значения ниже в 12 и 21 раз соответственно.

5.3. Определение суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в разовой дозе приёма слоевищ ламинарии

Согласно инструкции на упаковке препарата, слоевища ламинарии применяют по 0,5–1 чайной ложке 1 раз в день, запивая водой. Исходя из этого, нам было необходимо рассчитать значение суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в разовой дозе приёма (1 чайная ложка) слоевищ ламинарии.

Как было установлено в главе 4 с помощью валидированной методики, в ЛРП слоевищ ламинарии содержится 2,22 % восстанавливающих сахаров в составе ПСХ. Поэтому в 100 граммах ЛРП содержится 2,22 грамма ПСХ. Масса 1 чайной ложки ЛРП слоевищ ламинарии (разовая доза приёма) = 2,5836 г. Это в 38,7 раз меньше, чем 100 г: $100/2,5836 = 38,7056$. Значит в разовой дозе приёма в 38,7056 раз меньше ПСХ, чем в исходном ЛРП и содержится: $2,22/38,7056 = 0,0573560415$ г = 57,36 мг.

5.4. Определение суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в водных извлечениях семян льна

Водное извлечение семян льна готовят по инструкции ЛРП: 1,5 чайной ложки семян + 200 мл горячей воды → 15 минут нагревают на кипящей водяной бане с накрытой крышкой. Затем полученное водное извлечение процеживают и отжимают оставшееся сырье.

Затем коническую колбу помещают 5 мл водного извлечения, прибавляют 15 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Далее после реакции с антроновым реактивом проводят измерения оптической плотности относительно раствора сравнения и раствора СО глюкозы.

Результаты определения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ спектрофотометрическим методом в водных извлечениях семян льна представлены в Таблице 69.

Таблица 69 – Водные извлечения семян льна: содержание суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ

ЛФ	Содержание, %						RSD, %
	1	2	3	4	5	Среднее	
Цельное ЛРС в пачках	0,17	0,17	0,19	0,18	0,18	0,18 ± 0,01	4,70

В водных извлечениях цельных семян льна сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу составила 0,18 %, что меньше, чем в исходном ЛРП (2,41 %) в 13 раз.

В Таблице 70 указано содержание суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ и суммы флавоноидов, а также их процент перехода из ФСРП в водные извлечения изучаемых объектов.

Таблица 70 – Сравнительная таблица содержания суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ и суммы флавоноидов в ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и в водных извлечениях на основе данных ЛРП

ЛРП	ЛФ	Содержание БАС, %	Переход БАС, %
<i>Сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ</i>			
Цветки липы	Исходный ЛРП	2,54	100
	Водные извлечения на основе измельчённых ФСРП	0,22	8,66
	Водные извлечения на основе порошка, выпускаемого в фильтр-пакетах	0,13	5,12
Слоевища ламинарии	Исходный ЛРП	2,22	100
	Разовая доза приёма ЛРП	2,22	100
Семена льна	Исходный ЛРП	2,41	100
	Водные извлечения на основе цельных ФСРП	0,18	7,47

Продолжение Таблицы 70

<i>Сумма флавоноидов</i>			
Цветки липы	Исходный ЛРП	2,78	100
	Водные извлечения на основе измельчённых ФСРП	0,23	8,27
	Водные извлечения на основе порошка, выпускаемого в фильтр-пакетах	0,11	3,96

В результате проведённых экспериментов с использованием разработанных и валидированных методик определено содержание суммы флавоноидов и суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в водных извлечениях на основе ФСРП цветков липы, семян льна и в разовой дозе приёма слоевищ ламинарии, а также рассчитаны проценты перехода БАС из исходных ЛРП в водные извлечения и разовую дозу приёма слоевищ ламинарии. Таким образом была выполнена «сквозная стандартизация» цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Для водных извлечений проведена оценка суммарного содержания восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу: цветки липы – 0,22 % (из измельчённых ФСРП) и 0,13 % (из фильтр-пакетов); семена льна – 0,18 % (из цельных ФСРП). Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в водных извлечениях из измельчённых цветков липы в пачках составляет 0,23 %, тогда как для извлечений из порошка в фильтр-пакетах – 0,11 %. В разовой дозе приёма слоевищ ламинарии содержатся 57,36 мг восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчёте на глюкозу.

2. Установлено, что основные группы БАС, определяющие фармакологические эффекты, экстрагируются из ЛРП в водные извлечения и разовую дозу приёма изучаемых объектов. Восстанавливающие сахара в составе ПСХ переходят в водные извлечения из исходных ФСРП в количестве 5–9 %. В разовую дозу слоевищ ламинарии переходят 100 % БАС, т.к. исходный ЛРП употребляют без предварительной подготовки. Флавоноиды из ЛРП цветков липы переходят в водные извлечения в размере 4–8 %.

3. Проведена «сквозная стандартизация» и сравнение содержания БАС в ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и в водных извлечениях на основе данных ЛРП.

ГЛАВА 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ЦВЕТКОВ ЛИПЫ, СЛОЕВИЩ ЛАМИНАРИИ, СЕМЯН ЛЬНА

Измерение АРА проводили *in vitro* методом ДФПГ, в результате чего идёт восстановление ДФПГ и снижается оптическая плотность раствора [118].

На основании полученных результатов изучения АРА водных извлечений (Таблицы 71–74) была построена зависимость процента падения оптической плотности ДФПГ от концентрации извлечений слоевищ ламинарии и семян льна (сухой остаток, мкг/мл), от суммы флавоноидов извлечений цветков липы (мкг/мл) (Рисунки 36–39). Оптимальные значения разведений получали экспериментальным путём.

Таблица 71 – АРА водного извлечения измельчённых цветков липы ($n = 3$, $P_x = 0,95$, $t(P, f) = 4,30$)

Разведение	Сумма флавоноидов, мкг/мл	Падение оптической плотности ДФПГ, %	IC50, мкг/мл
1:2560	1,02	$69,57 \pm 2,66$	$0,70 \pm 0,07$
1:5120	0,51	$38,27 \pm 1,67$	
1:10240	0,24	$23,15 \pm 0,97$	
1:20480	0,13	$14,20 \pm 1,64$	
1:40960	0,05	$11,73 \pm 1,18$	

Таблица 72 – АРА водного извлечения порошка цветков липы в фильтр-пакетах ($n = 3$, $P_x = 0,95$, $t(P, f) = 4,30$)

Разведение	Сумма флавоноидов, мкг/мл	Падение оптической плотности ДФПГ, %	IC50, мкг/мл
1:1280	0,82	$49,84 \pm 2,18$	$0,81 \pm 0,06$
1:2560	0,41	$31,11 \pm 1,40$	
1:5120	0,20	$19,88 \pm 1,72$	
1:10240	0,10	$13,87 \pm 0,56$	
1:20480	0,05	$10,85 \pm 0,68$	
1:40960	0,03	$9,62 \pm 0,41$	

Таблица 73 – АРА водного извлечения слоевищ ламинарии ($n = 3$, $P_x = 0,95$, $t(P,f) = 4,30$)

Разведение	Сухой остаток, мкг/мл	Падение оптической плотности ДФПГ, %	IC50, мкг/мл
1:18	898,89	$53,58 \pm 2,02$	$808,11 \pm 71,40$
1:20	809,00	$50,23 \pm 2,00$	
1:40	404,50	$33,03 \pm 1,40$	

Таблица 74 – АРА водного извлечения семян льна ($n = 3$, $P_x = 0,95$, $t(P,f) = 4,30$)

Разведение	Сухой остаток, мкг/мл	Падение оптической плотности ДФПГ, %	IC50, мкг/мл
1:2,5	1234,40	$48,82 \pm 1,99$	$1322,29 \pm 124,15$
1:3	1028,67	$39,50 \pm 1,69$	
1:4	771,50	$21,16 \pm 0,81$	
1:8	385,75	$14,90 \pm 1,02$	
1:10	308,60	$10,62 \pm 0,46$	
1:16	192,87	$4,97 \pm 0,30$	

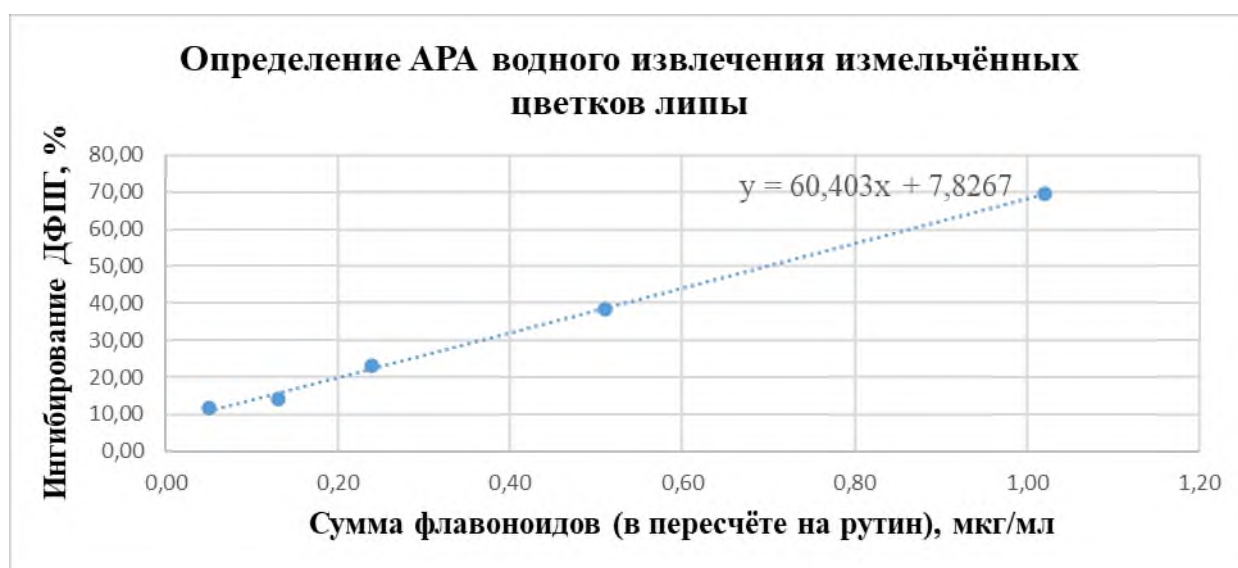


Рисунок 36 – График зависимости процента падения оптической плотности ДФПГ от суммарного содержания флавоноидов в водном извлечении измельчённых цветков липы

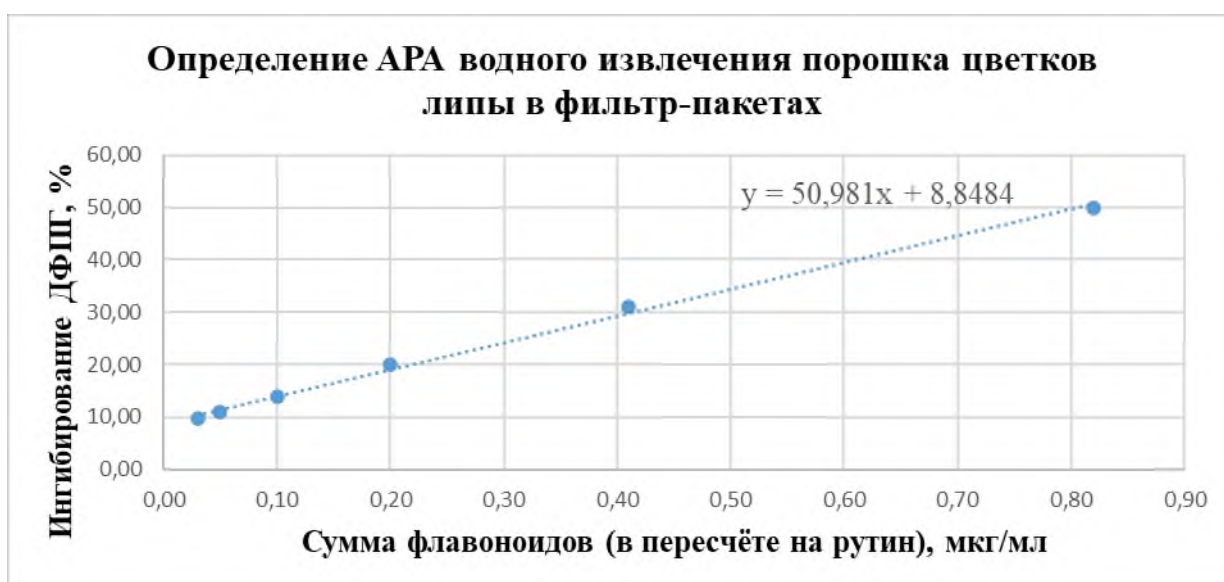


Рисунок 37 – График зависимости процента падения оптической плотности ДФПГ от суммарного содержания флавоноидов в водном извлечении порошка цветков липы в фильтр-пакетах

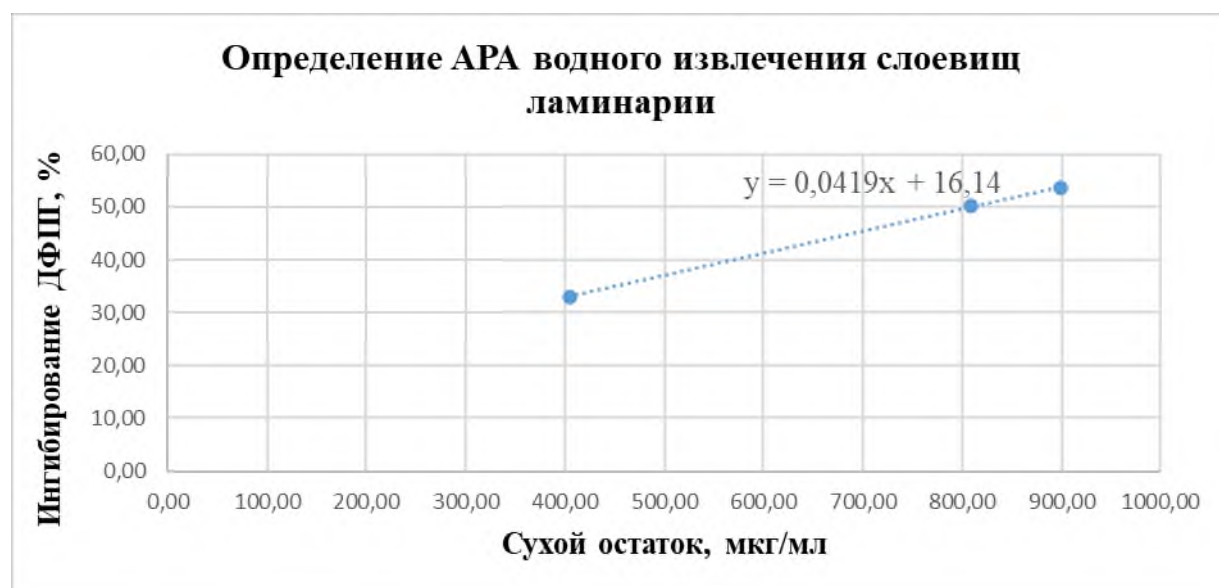


Рисунок 38 – График зависимости процента падения оптической плотности ДФПГ от концентрации извлечения слоевищ ламинарии

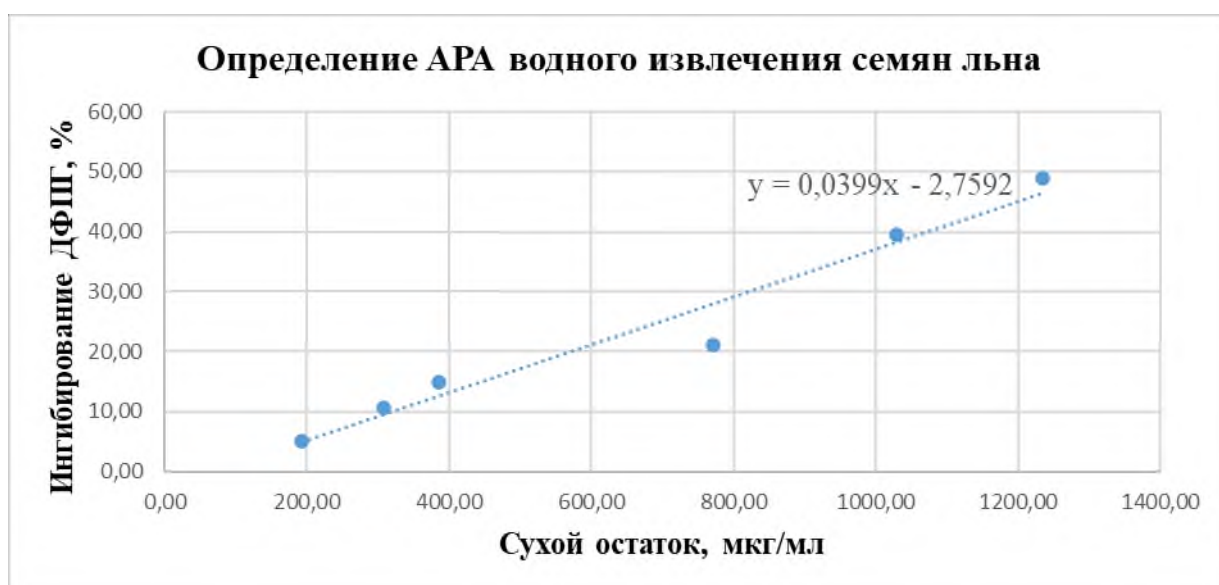


Рисунок 39 – График зависимости процента падения оптической плотности ДФП от концентрации извлечения семян льна

По графикам определяли значение полуингибирующей концентрации (IC50). Значения IC50 водных извлечений измельчённых цветков липы и порошка в фильтр-пакетах составили $0,70 \pm 0,07$ мкг/мл и $0,81 \pm 0,06$ мкг/мл соответственно, слоевищ ламинарии – $808,11 \pm 71,40$ мкг/мл, семян льна – $1322,29 \pm 124,15$ мкг/мл.

В результате анализа установлена АРА водных извлечений слоевищ ламинарии и семян льна, позволяющая предполагать наличие биологической активности. Цветки липы продемонстрировали значительную АРА, вероятнее всего из-за того, что в водные извлечения переходит большое количество флавоноидов-агликонов (рутин, гликозиды кемпферола и кверцетина). Фенольные соединения цветков липы выполняют функцию фотозащиты и привлечения опылителей, что объясняет наличие их в достаточном количестве для проявления устойчивой АРА.

У ламинарии и льна фенольные соединения, которые влияют на степень АРА, представлены в основном флоротанинами и лигнанами, которые плохо экстрагируются водой. Для морских водорослей снижена потребность в защите от УФ-света, а в масличных семенах фенольные соединения крепко связаны структурами семян. Данные факторы снижают качественно-количественный

состав фенольных соединений в водных извлечениях слоевищ ламинарии и семян льна, чем и объясняется не высокие показатели АРА.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Изучена и доказана АРА водных извлечений цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна, что позволяет предполагать наличие биологической активности.

2. Значение IC₅₀ водных извлечений измельчённых цветков липы составило $0,70 \pm 0,07$ мкг/мл, а порошка цветков липы в фильтр-пакетах – $0,81 \pm 0,06$ мкг/мл; слоевищ ламинарии – $808,11 \pm 71,40$ мкг/мл; семян льна – $1322,29 \pm 124,15$ мкг/мл. Цветки липы обладают выраженной АРА.

3. Водные извлечения цветков липы, с низким значением IC₅₀, демонстрируют высокую способность к нейтрализации свободных радикалов. Это свидетельствует о высоком содержании мощных антиоксидантных соединений (полифенолов, флавоноидов и фенольных кислот), которые могут защищать клетки от окислительного стресса. Антиоксиданты предотвращают повреждение клеточных мембран, ДНК и белков. Это может способствовать снижению риска развития хронических заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные расстройства и определённые виды рака. Многие антиоксиданты обладают способностью уменьшать воспаление, что подтверждает целесообразность использования цветков липы в качестве природного противовоспалительного средства. Высокие значения IC₅₀ для водных извлечений слоевищ ламинарии и семян льна указывают на то, что их фитохимический состав существенно отличается. Они содержат небольшое количество полифенольных соединений, что снижает их эффективность в нейтрализации свободных радикалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совершенствование контроля качества ЛРП, широко востребованных на отечественном фармацевтическом рынке, является актуальной задачей. ЛРП содержат комплекс БАС с разнообразной фармакологической активностью, характеризуются доступностью, хорошей переносимостью, низким риском побочных реакций и подходят для применения пациентам различных возрастных групп.

На российском рынке популярны ЛРП, основными БАС которых являются ПСХ. Они обладают иммуномодулирующими, детоксикационными, противовоспалительными, обволакивающими, гипогликемическими и ранозаживляющими свойствами, а также могут пролонгировать действие других лекарственных средств. В результате предварительного анализа отобраны 3 вида ЛРС с высоким содержанием ПСХ: семена льна, слоевища ламинарии и цветки липы. Формы выпуска препаратов – цельное/измельчённое сырьё в пачках или порошок в фильтр-пакетах для приготовления водных извлечений в домашних условиях.

Сложность и многокомпонентность состава ЛРП требует разработки оптимальных методик стандартизации и анализа, что является актуальной задачей современной фармацевтической науки.

Выполнено исследование химического состава, а также содержания БАС в ЛРП семян льна, цветков липы, слоевищ ламинарии и их водных извлечений. Проведены расчёты процентов перехода БАС в разовую дозу приёма слоевищ ламинарии и в водные извлечения семян льна, цветков липы. Получены результаты, подтверждающие высокое содержание ПСХ в ЛРП семян льна, цветков липы и слоевищ ламинарии, наличие флавоноидов в ЛРП цветков липы и присутствие иных БАС. Доказано в ходе экспериментов, что фармакологически значимые группы БАС указанных объектов полностью переходят в водные

извлечения и разовую дозу приёма в количествах, соответствующих разведениям конечных препаратов.

В представленной работе использованы современные физико-химические методы (ТСХ, СФМ в УФ и видимой области спектра) для разработки методик анализа подлинности и определения содержания основных групп БАС (флавоноидов и ПСХ) для изучаемых ЛРП. Дополнительно исследованы химический состав и группы БАС ЛРП цветков липы, слоевищ ламинарии, семян льна и водных извлечений на основе данных ЛРП. Применяли высокоселективные методы: газовая хроматография с разными типами детекторов, ИСП-МС, ВЭЖХ и другие. Рассчитаны значения IC₅₀ и определена АРА водных извлечений изучаемых объектов методомДФПГ.

Результаты данной работы использованы при подготовке обновлённых проектов ФС на слоевища ламинарии, семена льна посевного, цветки липы. Предложенные методики количественного определения основных групп БАС могут быть рекомендованы к включению в ГФ РФ. Представленные данные обеспечивают методическую базу для конструирования оптимальных ЛФ и создания новых продуктов из исследуемых объектов и их водных извлечений.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате проведённого обзора литературы, установлена необходимость в дальнейшем совершенствовании методов контроля качества для ЛРП слоевищ ламинарии, семян льна, цветков липы и их водных извлечений с акцентом на определение концентрации ключевых групп БАС.

2. Методом УЭЖХ-УФ/МС/МС определен неолинустицин из группы цианогенгликозидов в семенах льна, а в цветках липы выявлено 13 флавоноидов (производные кверцетина и кемпферола). В семенах льна, цветках липы и слоевищах ламинарии российского производства методами ГХ-ПИД, ВЭЖХ, ГХ/МС, ТСХ обнаружены следующие БАС: летучие органические вещества, ЖК, аминокислоты, моносахариды в составе ПСХ. Методом ИСП-МС исследовано содержание мышьяка, тяжёлых металлов и элементов (нормы не превышены).

3. Предложены и экспериментально обоснованы СФМ методики определения суммы флавоноидов (пересчёт на рутин) для цветков липы и суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ (пересчёт на глюкозу) для семян льна, слоевищ ламинарии и цветков липы. Валидация методик проведена по критериям: репрезентативность, воспроизводимость, специфичность, правильность, повторяемость, линейность. Методики могут быть использованы для стандартизации ЛРП – липы цветки, слоевища ламинарии, семена льна, выпускаемых на территории РФ.

4. Уточнены и рекомендованы к включению в проекты ФС такие показатели качества, как «сумма флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье» и «сумма восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье». Рассчитаны значения суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ (в пересчёте на глюкозу) для ЛРП, водных извлечений и для разовой дозы приёма слоевищ ламинарии: ЛРП цветков липы – 2,16–2,66 % (в водных извлечениях из измельчённых ФСРП – 0,21–0,23 %, из фильтр-пакетов – 0,13–0,14 %); ЛРП слоевищ ламинарии – 1,99–2,35 % (в разовой дозе приёма – 57,36

мг); ЛРП семян льна – 2,12–2,54 % (в водных извлечениях из цельных ФСРП – 0,17–0,19 %). Проведено количественное определение суммы флавоноидов в пересчёте на рутин: в ЛРП цветков липы их содержание составило 2,50–2,91 %; в водных извлечениях из измельчённых цветков липы, выпускаемых в пачках – 0,22–0,24 %; в водных извлечениях порошка цветков липы, расфасованных в фильтр-пакеты – 0,10–0,11 %. Тем самым установлено, что основные группы БАС, определяющие фармакологическое действие, переходят из ЛРП в разовую дозу приёма и в водные извлечения на основе данных ЛРП.

5. С помощью метода ДФПГ изучена АРА водных извлечений цветков липы, слоевищ ламинарии и семян льна. Цветки липы обладают выраженной АРА (IC_{50} водных извлечений измельчённых цветков липы = $0,70 \pm 0,07$ мкг/мл, IC_{50} водных извлечений порошка цветков липы в фильтр-пакетах = $0,81 \pm 0,06$ мкг/мл); значение IC_{50} водных извлечений слоевищ ламинарии составило $808,11 \pm 71,40$ мкг/мл, а семян льна – $1322,29 \pm 124,15$ мкг/мл.

6. Итоги валидационных испытаний дают основание рекомендовать включение разработанных методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы восстанавливающих сахаров в составе ПСХ в проекты ФС ГФ РФ последующего издания: «Льна посевного семена, цельные для приготовления настоя», «Ламинарии слоевища (морская капуста), измельченные», «Липы цветки, порошок для приготовления настоя», «Липы цветки, измельченные для приготовления настоя». В Приложении А представлены обновлённые проекты ФС.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты могут использоваться для подготовки лабораторных регламентов и контроля качества. Представляется целесообразным внедрение полученных результатов (методики стандартизации ключевых групп БАС для ЛРП слоевищ ламинарии, семян льна и цветков липы) в практику лабораторий контроля качества.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Совокупность результатов диссертационной работы может стать основой для рационального проектирования и разработки оптимальных ЛФ для семян льна, цветков липы, слоевищ ламинарии. На базе представленной информации об объектах исследования возможно создавать новые продукты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АО – акционерное общество

АРА – антирадикальная активность

БАС – биологически активные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ РБ – Государственная фармакопея Республики Беларусь

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором

ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

ЖК – жирные кислоты

ЗАО – закрытое акционерное общество

ИК – инфракрасный

ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырьё

ЛФ – лекарственные формы

НД – нормативная документация

ООО – общество с ограниченной ответственностью

ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции

ОФС – общая фармакопейная статья

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПКФ – производственно-коммерческая фирма

ПО – программное обеспечение

ПСХ – полисахариды

РФ – Российская Федерация

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

УЭЖХ-УФ/МС/МС – ультраэффективная жидкостная хроматография с
тандемным квадрупольным масс-спектрометрическим УФ-детектированием

ФС – фармакопейная статья

ФСРП – фармацевтическая субстанция растительного происхождения

IC₅₀ – полуингибирующая концентрация

RSD – относительное стандартное отклонение

T_{уд.} – время удерживания

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барсукова, Ю. Н. Разработка и валидация методики спектрофотометрического определения кислоты аминапроновой в многокомпонентном гемостатическом средстве / Ю. Н. Барсукова, О. А. Мельникова, М. Ю. Мельников // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 1(22). – С. 76-83.
2. Болотова, В. Ц. Физико-химическое и фармакологическое изучение листьев липы сердцевидной и препаратов на их основе: специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / В. Ц. Болотова. – Санкт-Петербург, 2002. – 194 с.
3. Большая энциклопедия народной медицины / отв. ред. Н. Косьянова. – Москва : Эксмо, 2007.
4. Бубенчикова, В. Н. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Старчак // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 22-1(141). – С. 157-160.
5. Веселова, Д. В. Использование в современной медицине цветков липы сердцевидной / Д. В. Веселова, Э. Ф. Степанова // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4. – № 1(14). – С. 4-9.
6. Государственная фармакопея РБ, издание 2016 года, том 2 : сайт : интернет-версия. – URL: <https://djvu.online/file/6NEt2hzmJyZB9> (дата обращения: 01.01.2025).
7. Государственная фармакопея РФ XIV издания : сайт : интернет-версия. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopeia14> (дата обращения: 05.08.2024).
8. Государственная фармакопея РФ XV издания : сайт : интернет-версия. – URL: <https://pharmacopeia.regmed.ru> (дата обращения: 05.08.2024).
9. Государственный реестр лекарственных средств 2024 : сайт : интернет-версия. – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (дата обращения: 01.01.2025).

10. Европейская фармакопея 11 издания: сайт: интернет-версия. – URL: <https://pheur.edqm.eu/home> (дата обращения: 01.01.2025).
11. Жаркова, Т. А. Фармакогностическое исследование листьев липы сердцевидной, произрастающей в Московской области / Т. А. Жаркова, А. О. Ляшенко // Природные соединения и здоровье человека : Сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, Иркутск, 26 мая 2023 года. Том Выпуск 5. – Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2023. – С. 41-46.
12. Закиров, Д. У. Физиология растения льна (*Linum usitatissimum*) развитие и использование в народном хозяйстве Узбекистана / Д. У. Закиров // Современная биология и генетика. – 2024. – Т. 4. – № 10. – С. 82-88.
13. Иванцова, Л. В. К исследованию антиоксидантной активности листьев персика обыкновенного *Persica vulgaris folia* / Л. В. Иванцова, В. Д. Белоногова, Д. К. Гуляев // Традиционная медицина. – 2019. – № 3(58). – С. 10-13.
14. Кахраманова, С.Д. Изучение состава биологически активных соединений грудного сбора № 1 и лекарственного растительного препарата на его основе : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Кахраманова Сабина Джейхуновна ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2024. – 25 с.
15. Кахраманова, С.Д. Изучение состава биологически активных соединений грудного сбора № 1 и лекарственного растительного препарата на его основе : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Кахраманова Сабина Джейхуновна ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2024. – 155 с.
16. Кацуба, И. К. Исследование летучих веществ листьев и цветков мать-и-мачехи обыкновенной / И. К. Кацуба, В. С. Кисличенко, Е. Н. Новосел // Вестник Таджикского национального университета. Серия естественных наук. – 2013. – № 1-3(110). – С. 179-183.

17. Ключко, М. В. Биологическая активность и химический состав сырья липы сердцевидной и липы широколистной / М. В. Ключко, М. Н. Родин, Д. О. Боков // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2022. – № 4. – С. 73-78.
18. Кутателадзе, Г. Р. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края / Г. Р. Кутателадзе, Л. М. Федосеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8. – № 2. – С. 80-86.
19. Ламинарии слоевища измельченные (АО «Красногорсклексредства»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=28e7b04d-2b7f-47e4-8f9f-d83e42c12d97 (дата обращения: 22.09.2024).
20. Ламинарии слоевища измельченные (ООО Фирма «Здоровье»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=451a207c-4424-4296-8c0f-3af48605837c (дата обращения: 22.09.2024).
21. Лекарственные растительные препараты и лекарственные средства растительного происхождения для комплексной терапии и реабилитации пожилых пациентов с ХОБЛ / В. В. Чевидаев, М. Н. Родин, Д. О. Боков [и др.] // Фармация. – 2025. – Т. 74. – № 1. – С. 13-21.
22. Липы цветки измельченные (АО «Красногорсклексредства»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=3f9c0974-15f0-4186-ace8-cffd933c4499 (дата обращения: 22.09.2024).
23. Липы цветки измельченные (ООО Фирма «Здоровье»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=8462391a-4c38-489e-854d-cdc9f50a54f8 (дата обращения: 22.09.2024).
24. Липы цветки порошок (АО «Красногорсклексредства»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=8fdeb44c-c514-4e22-

9b9e-7ced9b725d2f (дата обращения: 22.09.2024).

25. Липы цветки порошок (ООО Фирма «Здоровье»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL:

https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=0e767a93-cbb5-4b5d-b3fb-16e3e9b5e697 (дата обращения: 22.09.2024).

26. Льна посевного семена цельные (АО «Красногорсклексредства»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL:

https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e231b508-07d4-4b84-9eee-a0f3168b64a5 (дата обращения: 22.09.2024).

27. Льна посевного семена цельные (ООО Фирма «Здоровье»). Государственный реестр лекарственных средств 2024. URL:

https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e7eb82c7-8f2b-4494-8a23-9aa8b22b3d11 (дата обращения: 22.09.2024).

28. Мартинчик, А. Н. Фитоэстрогенные свойства лигнанов семян льна / А. Н. Мартинчик, В. В. Зубцов // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81. – № 6. – С. 61-66.

29. Миневич, И. Э. Функциональная значимость семян льна и практика их использования в пищевых технологиях / И. Э. Миневич // Health, Food & Biotechnology. – 2019. – Т. 1. – № 2. – С. 97-120.

30. Никулин, А. В. Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в листьях мать-и-мачехи методом УФ-спектрофотометрии / А. В. Никулин, Г. С. Терещенко, О. Г. Потанина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19. – № 9. – С. 3-7.

31. Никулин, А.В. Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии: специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Никулин Александр Владимирович; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2021. – 386 с.

32. Особенности накопления восстанавливающих сахаров цветками липы

сердцевидной (*Tilia cordata* Miller, 1768) в Воронежской области / Н. А. Дьякова, А. И. Сливкин, С. П. Гапонов [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10. – № 4. – С. 147-153.

33. Осовская, И. И. Морские водоросли. Применение в биотехнологии / И. И. Осовская, А. А. Приходько. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, 2020. – 78 с.

34. ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Государственная фармакопея РФ XV издания. [Электронное издание]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru> (дата обращения 02.08.2024).

35. ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Государственная фармакопея РФ XV издания. [Электронное издание]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru> (дата обращения 02.08.2024).

36. ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары». Государственная фармакопея РФ XV издания. [Электронное издание]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru> (дата обращения 02.08.2024).

37. ОФС.1.5.3.0007 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения». Государственная фармакопея РФ XV издания. [Электронное издание]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru> (дата обращения 02.08.2024).

38. ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Государственная фармакопея РФ XV издания. [Электронное издание]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru> (дата обращения: 07.09.2024).

39. Оценка качественных признаков льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.) / А. Д. Симагин, С. А. Захарова, О. Е. Ханбабаева, С. Л. Белопухов // Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов: Сборник научных трудов М. – С. 233-236.

40. Пищевая ценность и функциональные свойства семян льна / А. Н. Мартинчик, А. К. Батурин, В. В. Зубцов, В. Ю. Молофеев // Вопросы питания. –

2012. – Т. 81. – № 3. – С. 4-10.

41. Получение и стандартизация жидкого экстракта душицы турецкой / Д. О. Боков, Н. Б. Демина, С. Л. Морохина, Д. М. Попов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 1(6). – С. 26-32.

42. Попов, Д. М. Метод ВЭЖХ и определение углеводов в лекарственном растительном сырье / Д. М. Попов, Н. А. Боровикова, Н. Г. Селезенев // Фармация. – 2014. – № 1. – С. 3-5.

43. Попов, Д. М. Сравнительное качественное и количественное определение углеводов в цветках и листьях липы сердцевидной / Д. М. Попов, Н. В. Зарубина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 2(3). – С. 50-53.

44. Разработка и валидация методики количественного определения полисахаридов в цветках липы / М. Н. Родин, Д. О. Боков, С. Д. Кахраманова, И. А. Самылина // Фармация. – 2024. – Т. 73. – № 7. – С. 5-13.

45. Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов / М. А. Джавахян, М. Г. Токарева, Ю. Э. Прожогина, Е. И. Каленикова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – № 3. – С. 118-127.

46. Родин, М. Н. Исследование профиля флавоноидов цветков липы / М. Н. Родин, Д. О. Боков, Н. Б. Лазарева // Фармация. – 2024. – Т. 73. – № 3. – С. 10-14.

47. Справочник Видаль “Лекарственные препараты в России”: сайт : интернет-версия. – URL: <https://www.vidal.ru/> (дата обращения: 01.01.2025).

48. Сравнительное изучение компонентного и жирно-кислотного состава семян льна посевного / А. А. Богачев, Н. А. Гаврилова, Е. Е. Курдюков [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2020. – № 1(29). – С. 12-22.

49. Трапезникова, А. С. Химический анализ цветков липы, произрастающих в различных климатических зонах / А. С. Трапезникова, С. Ю. Горайнова // Молодежная наука и современность : Материалы 87-ой Международной научной конференции студентов и молодых ученых. В 4-х томах, Курск, 20–21 апреля 2022 года. Том III. – Курск: Курский государственный медицинский университет, 2022.

– С. 362-363.

50. Тринеева, О. В. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 1. – С. 164-169.

51. Тринеева, О. В. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях крапивы двудомной / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, С. С. Воропаева // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – № 1. – С. 138-144.

52. Тринеева, О. В. Разработка и валидация методики определения суммы свободных и связанных простых сахаров в плодах облепихи крушиновидной / О. В. Тринеева, М. А. Казьмина, А. И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 1(18). – С. 138-143.

53. Тринеева, О. В. Сравнительная характеристика определения сахаров различными методами в листьях крапивы двудомной / О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – № 2. – С. 91-97.

54. Фармакопея Китайской Народной Республики, издание 2020 года : сайт : интернет-версия. – URL: <https://chp.health-china.com> (дата обращения: 01.01.2025).

55. Фракционный состав эфирного масла душицы обыкновенной Красноярского края / А. А. Алякин, А. А. Ефремов, С. В. Качин, О. О. Данилова // Химия растительного сырья. – 2010. – № 1. – С. 99-104.

56. ФС.2.5.0024.15 «Липы цветки». Государственная фармакопея РФ XIV издания. [Электронное издание]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения 02.08.2024).

57. ФС.2.5.0024 «Липы цветки». Государственная фармакопея РФ XV издания. [Электронное издание]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru> (дата обращения 02.08.2024).

58. ФС.2.5.0026.15 «Льна посевного семена». Государственная фармакопея РФ XIV издания. [Электронное издание]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения 02.08.2024).

59. ФС.2.5.0080.18 «Ламинарии слоевища». Государственная фармакопея РФ XIV издания. [Электронное издание]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения 02.08.2024).
60. Цыганова, Т. Б. Полисахариды семян льна: практическое применение / Т. Б. Цыганова, И. Э. Миневич, Л. Л. Осипова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2019. – № 2. – С. 24-36.
61. Чеснокова, Н. А. Ламинария - морской женьшень / Н. А. Чеснокова // European Scientific Conference: Сборник статей XX Международной научно-практической конференции, Пенза, 17 мая 2020 года. – Пенза: «Наука и Просвещение» (ИП Гуляев Г.Ю.), 2020. – С. 283-285.
62. A new method of quantitative determination of flavonoids in linden flowers / N. A. Gavrilova, M. S. Shurygina, E. E. Kurdyukov [et al.] // University proceedings. Volga region. Natural sciences. – 2020. – Vol. 2. – № 2. – P. 5-13.
63. Ak, İ. Antioxidant Activities of *Eucheuma* sp. (Rhodophyceae) and *Laminaria* sp. (Phaeophyceae) / İ. Ak, G. Türker // Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. – 2019. – Vol. 7. – P. 154-159.
64. Alberdi-Cedeño, J. A Global Study by 1H NMR Spectroscopy and SPME-GC/MS of the in Vitro Digestion of Virgin Flaxseed Oil Enriched or not with Mono-, Di- or Tri-Phenolic Derivatives. Antioxidant Efficiency of These Compounds / J. Alberdi-Cedeño, M. L. Ibargoitia, M. D. Guillén // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 312.
65. Amino acids and fatty acids profile of chia (*Salvia hispanica* L.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) seed / S. Nitrayová, M. Brestenský, J. Heger [et al.] // Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2014. – Vol. 8. – № 1. – P. 72-76.
66. Analysis and Decrease of Cyanogenic Glucosides in Flaxseed // Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. – 2005. – Vol. 34. – № 6. – P. 875-879.
67. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica* / J. Wang, Q. Zhang, Z. Zhang, Z. Li // International Journal of Biological Macromolecules. – 2008. – Vol. 42. – № 2. – P. 127-132.
68. Assessment report on *Linum usitatissimum* L., semen / J. Wiesner, B. Merz, C. Werner, H. Pinto Ferreira // European Medicines Agency. – 2014. – P. 1-59.

69. Banerjee, K. A flaxseed oil emulgel formulation for prospective food applications synthesis and characterization / K. Banerjee, N. Thiagarajan, P. Thiagarajan // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2017. – Vol. 10. – № 6. – P. 1802.
70. Blikra, M. J. Iodine from brown algae in human nutrition, with an emphasis on bioaccessibility, bioavailability, chemistry, and effects of processing: A systematic review / M. J. Blikra, S. Henjum, I. Aakre // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2022. – Vol. 21. – № 2. – P. 1517-1536.
71. Cerning, B. J. A note on sugar determination by the anthrone method / B. J. Cerning // Cereal Chemistry. – 1975. – Vol. 52. – P. 857-860.
72. Chinou, I. Assessment report on *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia x vulgaris* Heyne or their mixtures, flos / I. Chinou // European Medicines Agency. – 2012. – P. 1-20.
73. Comparison of volatile compounds of hot-pressed, cold-pressed and solvent-extracted flaxseed oils analyzed by SPME-GC/MS combined with electronic nose: Major volatiles can be used as markers to distinguish differently processed oils / C. Q. Wei, W. Y. Liu, W. P. Xi [et al.] // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2015. – Vol. 117. – № 3. – P. 320-330.
74. Dowd, M. K. Fatty acid composition of *Tilia* spp. seed oils / M. K. Dowd, M. C. Farve // Grasas y Aceites. – 2013. – Vol. 64. – № 3. – P. 243-249.
75. Duarte, S. Flaxseed in Diet: A Comprehensive Look at Pros and Cons / S. Duarte, M. A. Shah, A. Sanches Silva // Molecules. – 2025. – Vol. 30. – № 6. – P. 1335.
76. Effect of Microbial Fermentation on the Fishy-Odor Compounds in Kelp (*Laminaria japonica*) / W. Zhu, B. Jiang, F. Zhong [et al.] // Foods. – 2021. – Vol. 10. – № 11. – P. 2532.
77. Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method / F. Yue, J. Zhang, J. Xu [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2022. – Vol. 9. – P. 963318.
78. Englyst, K. N. Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates / K. N. Englyst, S. Liu, H. N. Englyst // European Journal of Clinical Nutrition. – 2007. – Vol. 61. – № 1. – P. S19-S39.

79. Essential Oil Composition of *Tilia cordata* Flowers / R. Kowalski, T. Baj, K. Kalwa [et al.] // Journal of Essential Oil Bearing Plants. – 2017. – Vol. 20. – № 4. – P. 1137-1142.
80. Evaluation of Flexural Strength of Epoxy Resin Based hybrid Composites Reinforced with Jute, Banana and Flax Natural Fibers for Bio medical applications / T. N. Babu, A. K. Singh, A. Mandliya [et al.] // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2018. – Vol. 11. – № 2. – P. 547-552.
81. Evaluation of suspending properties of mucilage of *Linum usitatissimum* Linn. seeds / C. D. Khadse, R. B. Kakade, V. K. Deshmukh, D. S. Mohale // Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2010. – Vol. 2. – № 3. – P. 208-210.
82. Fitton, J. H. Therapies from Fucoidan; Multifunctional Marine Polymers / J. H. Fitton // Marine Drugs. – 2011. – Vol. 9. – № 10. – P. 1731-1760.
83. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food / A. Goyal, V. Sharma, N. Upadhyay [et al.] // Journal of Food Science and Technology. – 2014. – Vol. 51. – № 9. – P. 1633-1653.
84. Flax and Flaxseed Oil (*Linum usitatissimum*): A Review by the Natural Standard Research Collaboration / E. Basch, S. Bent, J. Collins [et al.] // Journal of the Society for Integrative Oncology. – 2007. – Vol. 5. – № 3. – P. 92-105.
85. Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber / K. K. Singh, D. Mridula, J. Rehal, P. Barnwal // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2011. – Vol. 51. – № 3. – P. 210-222.
86. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities / A. E. D. A. Bekhit, A. Shavandi, T. Jodjaja [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2018. – Vol. 13. – P. 129-152.
87. Flaxseed mucilage hydrogel based floating drug delivery system: Design and evaluation / S. Ramteke, N. Haigune, S. More [et al.] // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2022. – Vol. 15. – № 4. – P. 1549-1554.
88. Fucoidan and Cancer: A Multifunctional Molecule with Anti-Tumor Potential / F. Atashrazm, R. Lowenthal, G. Woods [et al.] // Marine Drugs. – 2015. – Vol. 13. – № 4. – P. 2327-2346.

89. Gutte, K. B. Bioactive components of flaxseed and its health benefits / K. B. Gutte, A. K. Sahoo, R. C. Ranveer // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. – 2015. – Vol. 31. – № 1. – P. 42-51.
90. Hall, C. Flaxseed / C. Hall, M. C. Tulbek, Y. Xu // Advances in food and nutrition research. – 2006. – Vol. 51. – P. 1-97.
91. Identification of Phlorotannins in the Brown Algae, *Saccharina latissima* and *Ascophyllum nodosum* by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry / R. R. R. Sardari, J. Prothmann, O. Gregersen [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 1. – P. 43.
92. Identification of Volatile Compounds of Kombu (*Laminaria* spp.) and Their Odor Description. / H. Takahashi, H. Sumitani, Y. Inada, D. Mori // Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. – 2002. – Vol. 49. – № 4. – P. 228-237.
93. Inhibitory Effects of Polyphenols-Rich Components From Three Edible Seaweeds on Inflammation and Colon Cancer in vitro / L. Yi, Q. Wang, H. Luo [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2022. – Vol. 9. – P. 856273.
94. Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland / O. K. Kosakowska, K. Bączek, J. L. Przybył [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2015. – Vol. 78. – P. 58-65.
95. Iodine-induced thyrotoxicosis after ingestion of kelp-containing tea / K. Müssig, C. Thamer, R. Bares [et al.] // Journal of General Internal Medicine. – 2006. – Vol. 21. – № 6. – P. C11-C14.
96. IR-spectroscopy of polysaccharide flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) products / I. E. Minevich, L. L. Osipova, A. P. Nechiporenko [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2019. – Vol. 7. – № 2. – P. 274-282.
97. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Laminaria japonica*: A review / H. Y. Li, Y. L. Yi, S. Guo [et al.] // Food Chemistry. – 2022. – Vol. 370. – P. 131010.
98. Kajla, P. Flaxseed—a potential functional food source / P. Kajla, A. Sharma, D. R. Sood // Journal of Food Science and Technology. – 2015. – Vol. 52. – № 4. – P. 1857-

1871.

99. Kakhramanova, S. D. Quantification of polysaccharides in medicinal plant raw materials / S. D. Kakhramanova, D. O. Bokov, I. A. Samylina // *Farmaciya (Pharmacy)*. – 2020. – Vol. 69. – № 8. – P. 5-12.
100. Keshri, J. P. Algae in medicine / J. P. Keshri // *Medicinal Plants: Various Perspectives*. – 2012. – P. 31-50.
101. Kim, S. K. Physical, Chemical, and Biological Properties of Wonder Kelp—*Laminaria* / S. K. Kim, I. Bhatnagar. – 2011. – Vol. 64. – P. 85-96.
102. Lipids and Composition of Fatty Acids of *Saccharina latissima* Cultivated Year-Round in Integrated Multi-Trophic Aquaculture / G. Marinho, S. Holdt, C. Jacobsen, I. Angelidaki // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – № 7. – P. 4357-4374.
103. Metabolomic Approach for Characterization of Polyphenolic Compounds in *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Sargassum fusiforme* and *Ascophyllum nodosum* / P. Shen, Y. Gu, C. Zhang [et al.] // *Foods*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 192.
104. Modern quality control methods of flax seeds herbal drugs in Russia / D. O. Bokov, M. N. Rodin, M. N. Bogachuk [et al.] // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2024. – Vol. 17. – № 10. – P. 4840-4846.
105. Molecular investigations of flaxseed mucilage polysaccharides / R. Roulard, E. Petit, F. Mesnard, L. Rhazi // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 86. – P. 840-847.
106. Oomah, B. D. Cyanogenic compounds in flaxseed / B. D. Oomah, G. Mazza, E. O. Kenaschuk // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1992. – Vol. 40. – № 8. – P. 1346-1348.
107. Physicochemical Properties of the Soluble Dietary Fiber from *Laminaria japonica* and Its Role in the Regulation of Type 2 Diabetes Mice / X. Wang, L. Zhang, L. Qin [et al.] // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14. – № 2. – P. 329.
108. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity / N. Shen, T. Wang, Q. Gan [et al.] // *Food Chemistry*. – 2022. – Vol. 383. – P. 132531.
109. Poljšak, N. *Tilia* sp. Seed Oil—Composition, Antioxidant Activity and Potential Use / N. Poljšak, N. Kočevar Glavač // *Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 11. – № 11. –

P. 4932.

110. Polysaccharides from *Laminaria japonica*: Structural characteristics and antioxidant activity / C. Cui, J. Lu, D. Sun-Waterhouse [et al.] // LWT. – 2016. – Vol. 73. – P. 602-608.

111. Rodin, M. N. Determination of polysaccharide content in linden flowers by anthrone method / M. N. Rodin, D. O. Bokov, I. A. Samylina // XXV International Congress PHYTOPHARM 2024 : Book of Abstracts, Saint Petersburg, 07–09 октября 2024 года. – Saint Petersburg: Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 2024. – P. 117-118.

112. Rodin, M. N. Study of flavonoids of the herbal drug “*Tiliae flores*” / M. N. Rodin, D. O. Bokov // Integration network of the pharmaceutical ecology in the modern environment, 14–16 ноября 2023 года. – Moscow: I.M. Sechenov First Moscow State Medica.

113. Rodin, M. N. Study of *Laminariae thalli* phenolic compounds by LC MS method / M. N. Rodin, D. O. Bokov // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования: сборник статей по материалам XCIV Международной научно-практической конференции, Москва, 25 марта 2025 года. – Москва: ООО “Интернаука”, 2025. – С. 60-67.

114. Rodin, M. N. Composition of biologically active compounds of three-part beggarticks herb / M. N. Rodin, D. O. Bokov, I. A. Samylina // Farmaciya (Pharmacy). – 2022. – Vol. 71. – № 2. – P. 22-26.

115. Rühmann, B. Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides / B. Rühmann, J. Schmid, V. Sieber // Frontiers in Microbiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 565.

116. Study of the Elemental Composition of Pectoral Species No. 2 and Its Components / V. V. Chevidaev, D. O. Bokov, I. V. Gravel, I. A. Samylina // Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation. – 2023. – Vol. 14. – № 2. – P. 171-180.

117. The chemical composition of the three-part beggarticks (*Bidens tripartita* L.) / M. Rodin, D. Potapova, D. Bokov [et al.] // BIO Web of Conferences. – 2023. – Vol. 71. –

P. 02005.

118. The study of flavonoid composition and antioxidative activity of nootropic species / E. A. Dorovskikh, D. A. Trashchenkova, T. Y. Kovaleva, V. A. Ermakova // Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. – 2020. – Vol. 23. – № 4. – P. 33-37.

119. Thompson, L. U. Flaxseed in human nutrition / L. U. Thompson, S. C. Cunnane // AOCS Press. – 2003. – № Ed.2. – P. vi + 458.

120. UHPLC-DAD-MS/MS analysis of extracts from linden flowers (*Tiliae flos*): Differences in the chemical composition between five *Tilia* species growing in Europe / M. Ziaja, K. A. Pawłowska, K. Józefczyk [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2020. – Vol. 154. – P. 112691.

121. Variation in the Chemical Composition of *Saccharina Japonica* with Harvest Area and Culture Period / J. H. Hwang, N. G. Kim, H. C. Woo [et al.] // Journal of Aquaculture Research and Development. – 2014. – Vol. 5. – № 7. – P. 1-7.

122. Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed / B. D. Oomah, E. O. Kenaschuk, W. Cui, G. Mazza // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1995. – Vol. 43. – № 6. – P. 1484-1488.

123. Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller Oils / L. Fitsiou, O. Tzakou, M. Hancianu, A. Poiata // Journal of Essential Oil Research. – 2007. – Vol. 19. – № 2. – P. 183-185.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

***Проект статьи оформлен согласно текущей ФС.2.5.0024 «Липы цветки», изменён раздел “Количественное определение”**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Липы цветки,
измельченные для приготовления настоя**
Tiliae flores

ФС

Взамен ФС.2.5.0024

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Собранные во время цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых деревьев липы сердцевидной – *Tilia cordata* Mill. и липы широколистной – *Tilia platyphyllos* Scop., сем. липовых – *Tiliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Цветки».

Измельчённое сырьё. Смесь цветков, цветоножек и кусочков прицветников различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельчённого сырья под лупой (10× и др.) видны кусочки слегка опушённых прицветных листьев светло-жёлтого, зеленовато-жёлтого или светло-зелёного цвета; чашелистики или их части, густо опушённые (с внутренней стороны и по краю), жёлто-серого, зеленовато-серого, реже светло-коричневого цвета; лепестки яйцевидной формы бело-жёлтого цвета; тычинки, пестик или их части, опушённые, светло-жёлтого цвета; кусочки цветоножек и цветоносов, опушённые, светло-зелёного, зелёного или серо-зелёного цвета; отдельные

цветочные бутоны и незрелые сильноопушённые плоды (орешки) светло-зелёного или серо-зелёного цвета.

Цвет лепестков беловато-жёлтый, чашелистиков зеленовато- или желтовато-серый, светло-коричневый, прицветных листьев – светло-жёлтый или зеленовато-жёлтый, светло-зелёный. Запах слабый, характерный.

Микроскопические признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения». Раздел «Листья».

Измельчённое сырьё. При рассмотрении микропрепарата прицветного листа с поверхности, с обеих сторон листа видны сильноизвилистые стенки клеток эпидермиса. Кутикула продольно-морщинистая с обеих сторон. Морщинистость очень сильно выраженная. Устьица только на нижней стороне, овальные, с 4–6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Жилки сопровождаются вытянутыми клетками с утолщёнными слабоизвилистыми стенками. Вдоль жилок пролегают секреторные ходы, наполненные розовым содержимым. Волоски встречаются преимущественно в средней части прицветного листа, вблизи места срастания его с цветоносом. Волоски 2 типов: головчатые – с многоклеточной овальной головкой на короткой 1–3-клеточной ножке и звёздчато-лучистые, состоящие из 3–8 длинных извилистых клеток, сросшихся основаниями. Мезофилл очень рыхлый, типа аэренхимы, с друзами, реже с призматическими кристаллами кальция оксалата, особенно многочисленными вблизи жилок.

Клетки эпидермиса лепестка прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками. Наблюдаются клетки со слизью. Кутикула с верхней стороны слабо выражено штриховатая. В мезофилле располагаются друзы кальция оксалата. Волоски такие же, как на прицветном листе, присутствуют вильчатые волоски, состоящие из 2 извилистых клеток, сросшихся основаниями. Простые волоски встречаются редко с нижней стороны лепестка и по краю лепестка. На верхушке лепестка цветка клетки эпидермиса образуют сосочковидные выросты.

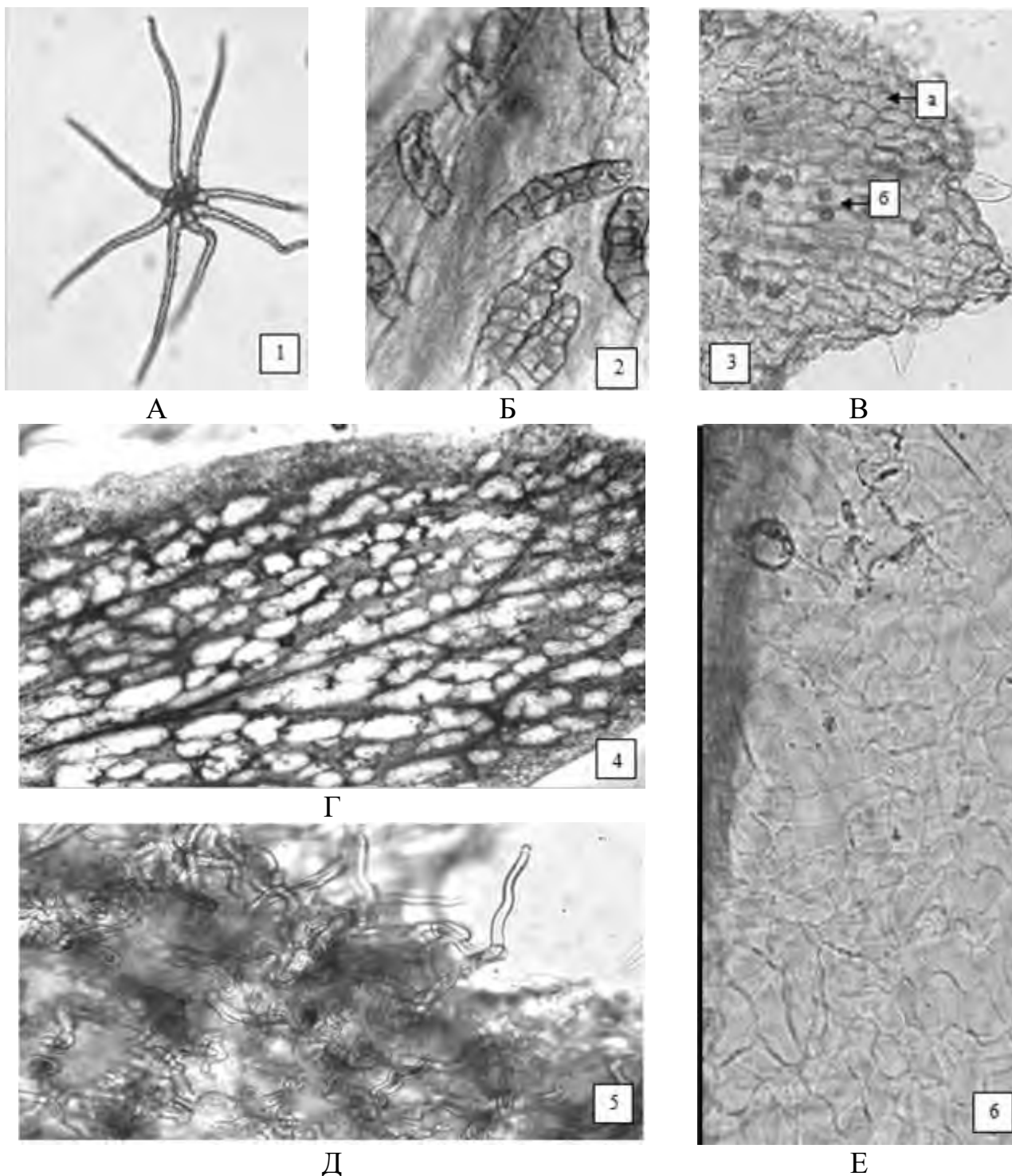
Клетки эпидермиса чашелистика многоугольные с прямыми и слабоизвилистыми стенками, кутикула продольно-морщинистая, устьица на

верхней стороне аномоцитного типа. Волоски такие же, как на прицветном листе и, кроме того, у основания чашелистиков с верхней стороны располагаются длинные прямые параллельные волоски, состоящие из 2 параллельных клеток, сросшихся основаниями. В мезофилле располагаются друзы кальция оксалата. На поперечном срезе чашелистика видны крупные полости слизистых клеток.

Пыльца округло-угловатая, гладкая, сплюснутая с 3 щелевидными отверстиями.

Эпидермис цветоножки состоит из клеток прямоугольной формы с прямыми стенками без устьиц. В паренхиме содержатся друзы кальция оксалата. Проводящие пучки сопровождаются клетками-идиобластами с коричнево-оранжевым содержимым, механическими волокнами и пористыми толстостенными клетками.

Тычинки и пестик содержат друзы. Пестик опушён волосками, сидящими пучками и выходящими по 2–10 из общего основания. Волоски извилистые тонкостенные.



Д

Е

Рисунок А.1 – Липы цветки

А – звёздчато-лучистый волосок (200×); Б – головчатые волоски (200×);
 В – фрагмент верхушки лепестка цветка: а – сосочковидные клетки эпидермиса, б –
 – друзы кальция оксалата (200×); Г – фрагмент лепестка с идиобластами со
 слизию (40×); Д – вильчатые волоски (200×); Е – аэренхима (200×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Пластика. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подвижная фаза (ПФ). Вода—муравьиная кислота безводная—толуол—этилацетат 8:10:14:60.

Испытуемый раствор. В колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают около 1,0 г сырья, измельчённого до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, прибавляют 10 мл спирта 96 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения, полученное извлечение фильтруют через беззольный фильтр.

Раствор рутина. Растворяют 5 мг рутина в 10 мл спирта 96 %.

Раствор кофейной кислоты. Растворяют 2 мг кофейной кислоты в 10 мл спирта 96 %.

Реактив для детектирования 1. Дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 %.

Реактив для детектирования 2. Макрогола 400 раствор спиртовой 5 %. На линию старта пластинки в виде полос длиной 10 мм и шириной 2 мм наносят по 10 мкл раствора рутина, раствора кофейной кислоты, испытуемого раствора. Пластику с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой, предварительно насыщенную в течение 1 ч ПФ, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластику выдерживают при температуре 100–105 °С в течение 5–10 мин, ещё тёплую обрабатывают последовательно реактивом для детектирования 1, затем реактивом для детектирования 2 и через 15 мин просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Результат. На хроматограмме раствора рутина должна обнаруживаться зона адсорбции жёлтого или оранжево-жёлтого цвета.

На хроматограмме раствора кофейной кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: две зоны адсорбции жёлтого или жёлто-оранжевого цвета – на уровне зоны адсорбции рутина и выше неё; зона адсорбции синего или фиолетово-синего цвета на уровне зоны адсорбции кофейной кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

Качественная реакция

К 10 мл настоя липы цветков (1:20) прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают, появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Не более 13,0 % (ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

Зола общая. Не более 10,0 % (ОФС «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 3,0 % (ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

Измельчённость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Измельчённое сырьё: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Допустимые примеси. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Изменившие окраску части соцветия (потемневшие и почерневшие).
Измельчённое сырьё: не более 4 %.

Другие части липы (листья и побеги). *Измельчённое сырьё:* не более 1 %.

Органическая примесь. *Измельчённое сырьё:* не более 0,3 %.

Минеральная примесь. Не более 0,1 %.

Тяжёлые металлы и мышьяк. В соответствии с ОФС «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Заражённость вредителями запасов. В соответствии с ОФС «Определение степени заражённости лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Измельчённое сырьё.* Суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье – не менее 1,7 %; суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье – не менее 2,0 %.

Сумма восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов

Антроновый реактив. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г антрона, прибавляют серную кислоту или смесь серная кислота – вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в тёмное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч. Срок годности при хранении в тёмном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

Исходный раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито 2 мм. В коническую колбу помещают 1,0 г (точная навеска) измельчённого сырья, добавляют 30 мл воды, доведённой до кипения, и кипятят с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Горячее извлечение фильтруют через 5 слоёв марли, предварительно смоченных водой дистиллированной, или через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Марлю (вату) с сырьём помещают в ту же коническую колбу и повторяют экстракцию в описанных выше условиях ещё два раза. Полученные извлечения объединяют и доводят объём полученного раствора водой до метки (раствор А).

В коническую колбу помещают 25 мл раствора А, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки (раствор Б).

Испытуемый раствор. В колбу помещают 3 мл раствора Б, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор СО глюкозы. Около 12 мг (точная навеска) стандартного образца глюкозы безводной растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают. В колбу помещают 3 мл полученного раствора, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор сравнения. В колбу помещают 3 мл воды, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Через 25 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора стандартного образца глюкозы в указанных выше условиях относительно раствора сравнения.

Суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 250 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 80}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где A_1 — оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 — оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы;

a_1 — навеска сырья, г;

a_0 — навеска фармакопейного стандартного образца глюкозы, г;

P — содержание глюкозы в фармакопейном стандартном образце глюкозы, %;

W — влажность сырья, %.

Сумма флавоноидов

Исходный раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают около 1,25 г (точная навеска) измельченного сырья, прибавляют 50 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ мл. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости

доводят спиртом 70 % до первоначальной массы. Содержимое колбы фильтруют через беззольный фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора, прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Исходный раствор стандартного образца рутина. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,05 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца рутина, растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл спирта 96 %, охлаждают, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Испытуемый раствор стандартного образца рутина. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора фармакопейного стандартного образца рутина, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Раствор сравнения стандартного образца рутина. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора стандартного образца рутина, прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Через 1 час измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора стандартного образца рутина в указанных выше условиях относительно раствора сравнения стандартного образца рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

- где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;
 A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца рутина;
 a_1 – навеска сырья, г;
 a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца рутина, г;
 P – содержание рутина в фармакопейном стандартном образце рутина, %;
 W – влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{260 \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 480,77}{a \cdot (100 - W)},$$

- где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
 a – навеска сырья, г;
 260 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм ($A_{1\text{ см}}^{1\%}$);
 W – влажность сырья, %.

УПАКОВКА, МАРКИРОВКА И ПЕРЕВОЗКА

В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и перевозка лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аспирант
 кафедры фармацевтического
 естествознания

М.Н. Родин

Научный руководитель
 к.ф.н., доцент, доцент кафедры
 фармацевтического естествознания

Д.О. Боков

***Проект статьи оформлен согласно текущей ФС.2.5.0024 «Липы цветки», изменён
раздел “Количественное определение”**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Липы цветки,
порошок для приготовления настоя
*Tiliae flores***

ФС

Взамен ФС.2.5.0024

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Собранные во время цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых деревьев липы сердцевидной – *Tilia cordata* Mill. и липы широколистной – *Tilia platyphyllos* Scop., сем. липовых – *Tiliaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Цветки».

Порошок. Смесь частиц цветков, цветоножек и прицветников липы различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×, 16×) видны: кусочки слегка опушённых прицветных листьев зелёного, светло-зелёного или зелёно-жёлтого цвета; чашелистики или их части, густо опушённые (с внутренней стороны и по краю), жёлто-серого, зеленовато-серого, реже светло-коричневого цвета; лепестки яйцевидной формы бело-жёлтого цвета; тычинки, пестик или их части, опушённые, светло-жёлтого цвета; кусочки цветоножек и цветоносов, опушённые, светло-зелёного, зелёного или серо-зелёного цвета; отдельные цветочные бутоны и незрелые сильноопушённые плоды (орешки) светло-зелёного или серо-зелёного цвета.

Цвет порошка серовато-зелёный, серовато-жёлтый или светло-коричневый с жёлтыми, тёмно-жёлтыми, коричневыми и тёмно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, характерный.

Микроскопические признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения». Раздел «Листья».

Порошок. При рассмотрении микропрепарата должны быть видны фрагменты эпидермиса прицветного листа, состоящего из клеток с извилистыми стенками; продольно-морщинистой кутикулы; овальных устьиц аномоцитного типа; головчатых волосков, состоящих из многоклеточной овальной головки на короткой 1–3-клеточной ножке (и без них); звёздчато-лучистых волосков, состоящих из 3–8 извилистых клеток, сросшихся основаниями; мезофилл листа очень рыхлый, типа аэренхимы, содержит друзы кальция оксалата, реже призматические кристаллы кальция оксалата, особенно многочисленные вблизи жилок; фрагменты лепестка с клетками эпидермиса прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками, с вильчатыми волосками, состоящими из 2 извилистых клеток, сросшихся у основания (и без них), с просвечивающимися друзами в мезофилле; фрагменты чашелистика с многоугольными клетками эпидермиса с прямыми или извилистыми стенками, продольно-морщинистой кутикулой, с овальными устьицами аномоцитного типа (и без них), со звёздчато-лучистыми волосками, состоящими из 3–8 извилистых клеток, сросшихся основаниями, с вильчатыми волосками, состоящими из 2 извилистых клеток, сросшихся у основания (и без них), с длинными прямыми параллельными волосками, состоящими из 2 параллельных клеток, сросшихся основаниями (и без них); фрагменты цветоножки с эпидермисом, представленным клетками прямоугольной формы с прямыми стенками, с просвечивающимися в паренхиме друзами кальция оксалата, со звёздчато-лучистыми волосками, состоящими из 3–8 извилистых клеток, сросшихся основаниями (и без них), с головчатыми волосками, состоящими из многоклеточной овальной головки на короткой 1–3-клеточной ножке (и без них); фрагменты тычинок, содержащих друзы в паренхиме;

фрагменты пестика, содержащего друзы в паренхиме и имеющего на поверхности извилистые тонкостенные волоски, сидящие пучками и выходящие по 2–10 из общего основания; пыльца округло-угловатой гладкой сплюсненной с 3 щелевыми отверстиями.

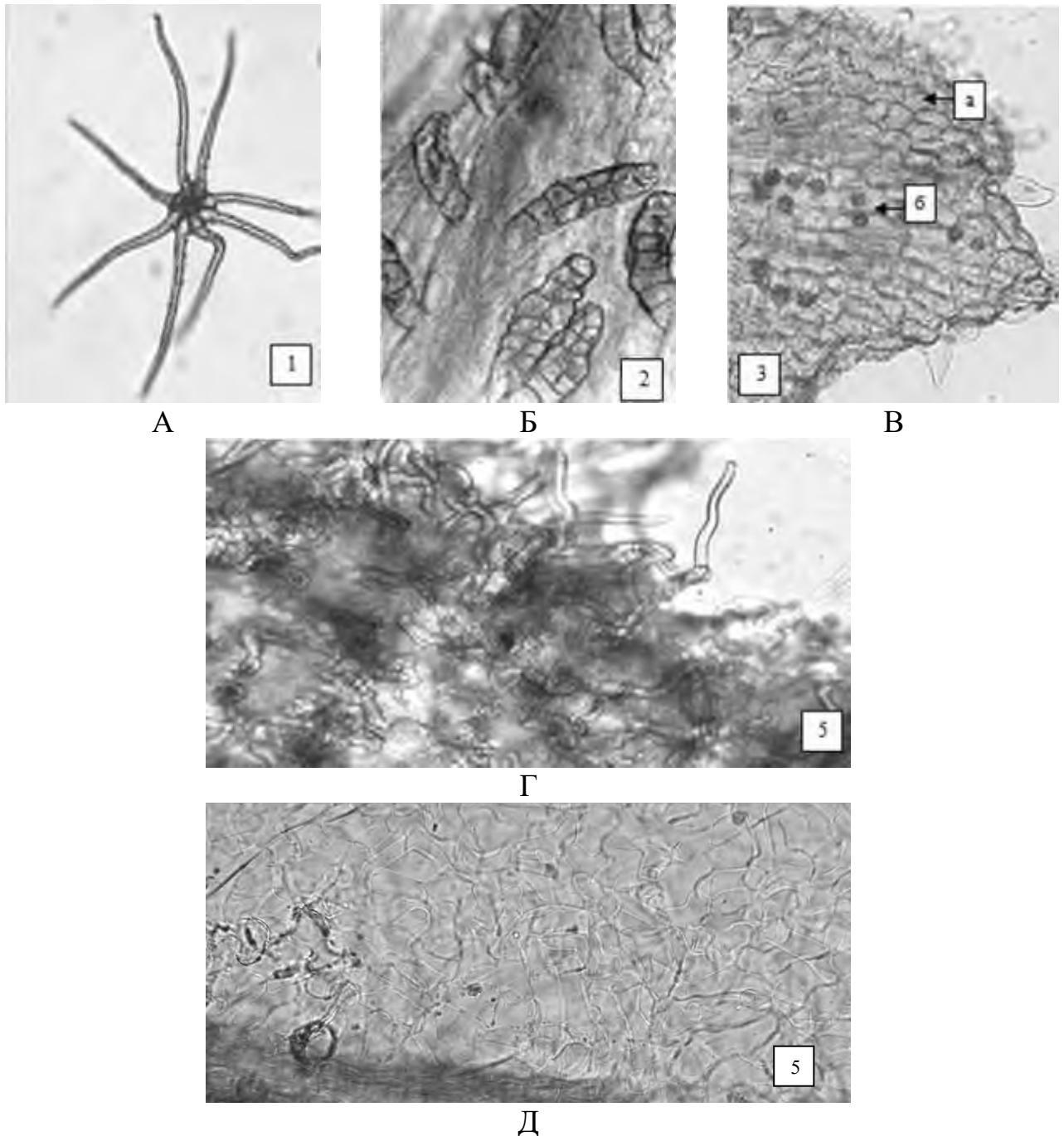


Рисунок А.2 – Липы цветки

А – звёздчато-лучистый волосок (200×); Б – головчатые волоски (200×);
 В – фрагмент лепестка цветка: а – клетки эпидермиса прямоугольной формы с прямыми или слабоизвилистыми стенками, б – друзы кальция оксалата (200×); Г – вильчатые волоски (200×); Д – аэренхима (200×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Пластика. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подвижная фаза (ПФ). Вода—муравьиная кислота безводная—толуол—этилацетат 8:10:14:60.

Испытуемый раствор. В колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают около 1,0 г сырья, измельчённого до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, прибавляют 10 мл спирта 96 %, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения, полученное извлечение фильтруют через беззольный фильтр.

Раствор рутина. Растворяют 5 мг рутина в 10 мл спирта 96 %.

Раствор кофейной кислоты. Растворяют 2 мг кофейной кислоты в 10 мл спирта 96 %.

Реактив для детектирования 1. Дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 %.

Реактив для детектирования 2. Макрогола 400 раствор спиртовой 5 %. На линию старта пластинки в виде полос длиной 10 мм и шириной 2 мм наносят по 10 мкл раствора рутина, раствора кофейной кислоты, испытуемого раствора. Пластику с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру, выложенную изнутри фильтровальной бумагой, предварительно насыщенную в течение 1 ч ПФ, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей. Пластику выдерживают при температуре 100–105 °С в течение 5–10 мин, ещё тёплую обрабатывают последовательно реактивом для детектирования 1, затем реактивом для детектирования 2 и через 15 мин просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Результат. На хроматограмме раствора рутина должна обнаруживаться зона адсорбции жёлтого или оранжево-жёлтого цвета.

На хроматограмме раствора кофейной кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: две зоны адсорбции жёлтого или жёлто-оранжевого цвета – на уровне зоны адсорбции рутина и выше неё; зона адсорбции синего или фиолетово-синего цвета на уровне зоны адсорбции кофейной кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции (фенольные соединения).

Качественная реакция

К 10 мл настоя липы цветков (1:20) прибавляют 30 мл спирта 96 % и перемешивают, появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Не более 13,0 % (ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

Зола общая. Не более 10,0 % (ОФС «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 3,0 % (ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

Измельчённость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Допустимые примеси. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Минеральная примесь. Не более 0,1 %.

Тяжёлые металлы и мышьяк. В соответствии с ОФС «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Заражённость вредителями запасов. В соответствии с ОФС «Определение степени заражённости лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Порошок. Суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье – не менее 1,7 %; суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье – не менее 2,0 %.

Сумма восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов

Антроновый реактив. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г антрона, прибавляют серную кислоту или смесь серная кислота – вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в тёмное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч. Срок годности при хранении в тёмном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

Исходный раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито 2 мм. В коническую колбу помещают 1,0 г (точная навеска) порошка, добавляют 30 мл воды, доведённой до кипения, и кипятят с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Горячее извлечение фильтруют через 5 слоёв марли, предварительно смоченных водой

дистиллированной, или через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Марлю (вату) с сырьём помещают в ту же коническую колбу и повторяют экстракцию в описанных выше условиях ещё два раза. Полученные извлечения объединяют и доводят объём полученного раствора водой до метки (раствор А).

В коническую колбу помещают 25 мл раствора А, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки (раствор Б).

Испытуемый раствор. В колбу помещают 3 мл раствора Б, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор СО глюкозы. Около 12 мг (точная навеска) стандартного образца глюкозы безводной растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают. В колбу помещают 3 мл полученного раствора, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор сравнения. В колбу помещают 3 мл воды, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Через 25 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора стандартного образца глюкозы в указанных выше условиях относительно раствора сравнения.

Суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 250 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 80}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

- где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;
 A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы;
 a_1 – навеска сырья, г;
 a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца глюкозы, г;
 P – содержание глюкозы в фармакопейном стандартном образце глюкозы, %;
 W – влажность сырья, %.

Сумма флавоноидов

Исходный раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают около 1,25 г (точная навеска) порошка, прибавляют 50 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ мл. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1,5 ч. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят спиртом 70 % до первоначальной массы. Содержимое колбы фильтруют через беззольный фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора, прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Исходный раствор стандартного образца рутина. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,05 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца рутина, растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл

спирта 96 %, охлаждают, доводят объем спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Испытуемый раствор стандартного образца рутина. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора фармакопейного стандартного образца рутина, прибавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 % в спирте 96 % и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и доводят объём раствора спиртом 96 % до метки.

Раствор сравнения стандартного образца рутина. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл исходного раствора стандартного образца рутина, прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки.

Через 1 час измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора стандартного образца рутина в указанных выше условиях относительно раствора сравнения стандартного образца рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot P}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где A_1 — оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 — оптическая плотность раствора стандартного образца рутина;

a_1 — навеска сырья, г;

a_0 — навеска фармакопейного стандартного образца рутина, г;

P — содержание рутина в фармакопейном стандартном образце рутина, %;

W — влажность сырья, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{260 \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 480,77}{a \cdot (100 - W)},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора;

a — навеска сырья, г;

260 — удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм ($A_{1\text{ см}}^{1\%}$);

W — влажность сырья, %.

УПАКОВКА, МАРКИРОВКА И ПЕРЕВОЗКА

В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и перевозка лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аспирант

кафедры фармацевтического
естествознания

М.Н. Родин

Научный руководитель

к.ф.н., доцент, доцент кафедры
фармацевтического естествознания

Д.О. Боков

***Проект статьи оформлен согласно текущей ФС.2.5.0080.18 «Ламинарии слоевища (морская капуста)», изменён раздел “Количественное определение”**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ламинарии слоевища (морская капуста), ФС

измельченные

Laminariae thalli

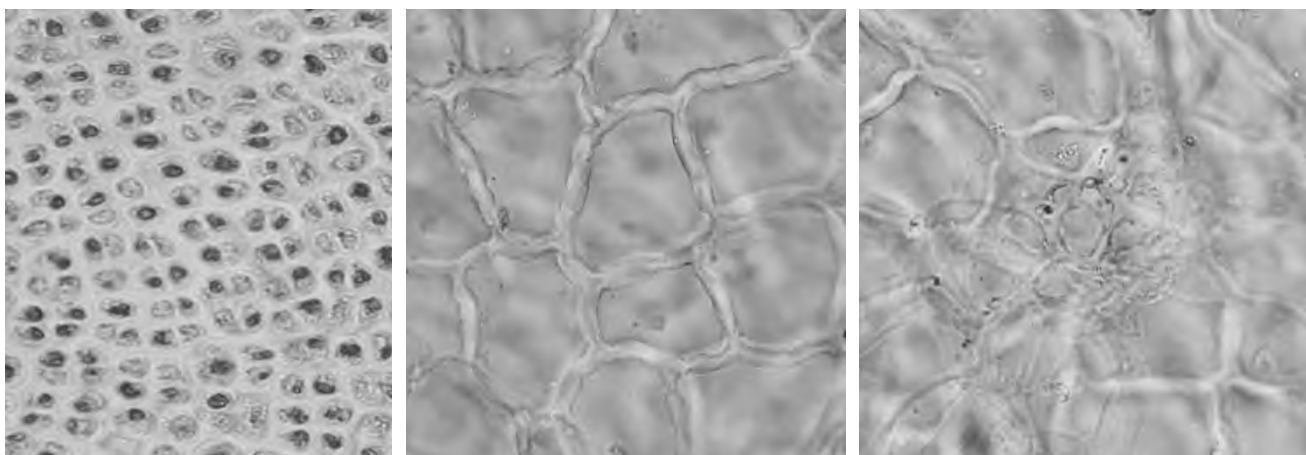
Взамен ФС.2.5.0080.18

Собранные с июня по октябрь и высушенные слоевища бурых морских водорослей ламинарии японской – *Laminaria japonica* Aresch. и ламинарии сахаристой – *Laminaria saccharina* (L.) Lam., сем. ламинариевых – *Laminariaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Измельченное сырье. Кусочки слоевищ различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого; зеленовато-коричневый, светло-коричневый, красно-коричневый, иногда желтовато-коричневый, зеленовато-черный; снаружи кусочки слоевищ покрыты белым налетом солей. Запах характерный. Вкус солоноватый.

Микроскопические признаки. Измельченное сырьё. При рассмотрении слоевищ с поверхности должен быть виден эпидермис, состоящий из мелких, почти квадратных клеток с толстыми стенками, сквозь которые просвечивают многочисленные округлые слизистые вместилища.



А

Б

В

Рисунок А.3 – Ламинарии слоевища (морская капуста)

А – фрагмент эпидермиса (400×); Б – фрагмент эпидермиса (200×);

В – вместилище со слизью в паренхиме (200×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Качественные реакции

1. Измельченное сырье в количестве 0,04 г (см. раздел «Количественное определение. Определение содержания йода») насыпают на кусочек целлофана размером 2×2 см, который сворачивают в виде пакетика, помещают в фиксатор и сжигают в колбе с кислородом вместимостью 300–400 мл (в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом»). В качестве поглощающей жидкости используют 10 мл крахмала раствора 0,5 %, содержащего 0,2 % сульфаминовой кислоты; должно наблюдаться голубое окрашивание (при наличии йода в морской капусте в количестве не менее 0,1 %).

2. К 10 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Определение содержания полисахаридов») прибавляют 10 мл спирта 96 %, перемешивают; должны наблюдаться хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

3. Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок с фильтра переносят в пробирку, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты,

разведенной 8,3 %, нагревают, затем прибавляют 10 мл медно-тарtratного реактива и снова нагревают; должен наблюдаться оранжево-красный осадок (восстанавливающие сахара).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Измельченное сырьё* – не более 15 %.

Зола общая. *Измельченное сырьё* – не более 40 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Измельченное сырьё* – не более 20 %.

Измельченность сырья. *Измельченное сырьё*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Органическая примесь. *Измельченное сырьё* – не допускается.

Песок. *Измельченное сырьё* – не более 2 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Предельно допустимое содержание мышьяка – 90 мг/кг.

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Измельченное сырьё*. Йода – не менее 0,1 %; суммы восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье – не менее 1,5 %.

Определение содержания йода

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 0,06 г (точная навеска) измельченного сырья помещают на кусочек целлофана (20 × 20 мм), который сворачивают в виде пакетика, помещают в фиксатор и сжигают в колбе с кислородом вместимостью 1000 мл (в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом»). В качестве поглощающей жидкости используют 2 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 50 мл воды. По окончании сжигания колбу интенсивно встряхивают в течение 3 мин, затем шлиф, держатель и внутренние стенки колбы промывают 100 мл воды, прибавляют в колбу по каплям до слабо-желтого окрашивания смесь, состоящую из 25 мл калия ацетата раствора 10 % в уксусной кислоте ледяной и 15 капель брома. Колбу оставляют на 2 мин, прибавляют по каплям муравьиную кислоту 85 % до обесцвечивания раствора и через 1 мин прибавляют 3 мл сульфаминовой кислоты раствора 3 %.

Содержимое колбы в течение 3 мин периодически взбалтывают, затем прибавляют 1,0 г калия йодида и титруют выделившийся йод 0,005 М раствором натрия тиосульфата (индикатор – крахмал).

Содержание йода в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,0001058 \cdot V \cdot 100 \cdot K \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где 0,0001058 – количество йода, соответствующее 1 мл 0,005 М раствора натрия тиосульфата, г;

V – объем 0,005 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование, мл;

K – поправочный коэффициент к титру 0,005 М раствора натрия тиосульфата;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Сумма восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов

Антроновый реактив. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г антрона, прибавляют серную кислоту или смесь серная кислота – вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в тёмное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч. Срок годности при хранении в тёмном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

Исходный раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито 2 мм. В коническую колбу помещают 1,0 г (точная навеска) измельчённого сырья, добавляют 30 мл воды, доведённой до кипения, и кипятят с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Горячее извлечение фильтруют через 5 слоёв марли, предварительно смоченных водой дистиллированной, или через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Марлю (вату) с сырьём помещают в ту же коническую колбу и повторяют экстракцию в описанных выше условиях ещё два раза. Полученные извлечения объединяют и доводят объём полученного раствора водой до метки (раствор А).

В коническую колбу помещают 25 мл раствора А, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки (раствор Б).

Испытуемый раствор. В колбу помещают 3 мл раствора Б, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор СО глюкозы. Около 12 мг (точная навеска) стандартного образца глюкозы безводной растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают. В колбу помещают 3 мл полученного раствора, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2-8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор сравнения. В колбу помещают 3 мл воды, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2–8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Через 25 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора стандартного образца глюкозы в указанных выше условиях относительно раствора сравнения.

Суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 250 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 80}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы;

a_1 – навеска сырья, г;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца глюкозы, г;

P – содержание глюкозы в фармакопейном стандартном образце глюкозы, %;

W – влажность сырья, %.

Определение содержания песка

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 20,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в стакан вместимостью 150 мл, прибавляют 60 мл хлористоводородной кислоты разведенной 10 % и нагревают до кипения, непрерывно помешивая до прекращения вспучивания массы. Затем стакан накрывают часовым стеклом и продолжают нагревать в течение 15 мин. По окончании нагревания стакан доливают водой доверху, энергично размешивают содержимое стеклянной палочкой и оставляют на 3 – 5 мин, после чего приступают

к отмучиванию песка. Для этого к водопроводному крану или большой бутылки с водой присоединяют при помощи резинового шланга пипетку вместимостью 5 – 10 мл и устанавливают ток воды со скоростью 160 – 170 мл/мин. Затем подставляют под ее струю стакан с анализируемой массой и погружают в него трубку на расстоянии 1–2 см от дна. Слив воды происходит через край стакана. Продолжительность отмучивания около 20 мин, после чего воду из стакана декантируют. Для удаления оставшихся частиц сырья осадок в стакане заливают 25 – 30 мл насыщенного раствора натрия хлорида, перемешивают и, дав песку осесть на дно, осторожно сливают жидкость вместе со взвешенными частицами сырья. Обработку раствором натрия хлорида повторяют 3 – 4 раза до полного удаления взвешенных частиц. Затем осадок в стакане промывают 2 – 3 раза водой и количественно переносят на беззольный фильтр.

Осадок вместе с фильтром озоляют во взвешенном тигле, помещают в муфельную печь, прокаливают в течение 15 мин при температуре 550 – 650 °С и после охлаждения взвешивают.

Содержание песка в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}$$

где m_1 – масса пустого тигля, г;
 m_2 – масса тигля с золой, г;
 a – навеска сырья, г;
 W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аспирант

кафедры фармацевтического
естествознания

М.Н. Родин

Научный руководитель

к.ф.н., доцент, доцент кафедры
фармацевтического естествознания

Д.О. Боков

***Проект статьи оформлен согласно текущей ФС.2.5.0026.15 «Льна посевного семена», изменён раздел “Количественное определение”**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Льна посевного семена,

ФС

цельные для приготовления настоя

Lini usitatissimi semina

Взамен ФС.2.5.0026.15

Собранные в период плодоношения зрелые и высушенные семена культивируемого травянистого растения льна посевного (обыкновенного) – *Linum usitatissimum* L., сем. льновых – *Linaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Семена сплюснутые, яйцевидной формы, заостренные с одного конца и округлые с другого, неравнобокие, длиной до 6 мм, шириной до 3 мм. Поверхность семян гладкая, блестящая, со светло-желтым, ясно заметным семенным рубчиком (под лупой 10× или стереомикроскопом 16×). Цвет семян от светло-желтого до темно-коричневого. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слизисто-маслянистый.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поперечного среза семени должны быть видны: кожура в виде темно-коричневой полосы, эндосперм и зародыш. При большом увеличении ясно различаются слои семенной кожуры. Эпидермис состоит из крупных, четырехугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, содержащих слизь; боковые (радиальные) стенки клеток слегка извилистые, при разбухании слизи способны выпрямляться и вытягиваться. Под эпидермисом располагается 1 – 2 ряда рыхлых паренхимных клеток почти округлой формы. Третий слой представлен механической тканью,

состоящей из одного ряда сильно утолщенных, одревесневших желтых клеток, пронизанных поровыми канальцами.

Под механической тканью расположены узкие тонкостенные клетки «поперечного слоя» (вытянуты поперек семени). Самый внутренний слой кожуры – пигментный – состоит из одного ряда четырехугольных клеток с заметно утолщенными пористыми оболочками и темно-желтым содержимым. Эндосперм состоит из многоугольных клеток, которые содержат алейроновые зерна, включающие кристаллоиды, глобоиды, и капли жирного масла (реакция с суданом III). Ткань семядолей отличается более мелкими клетками.

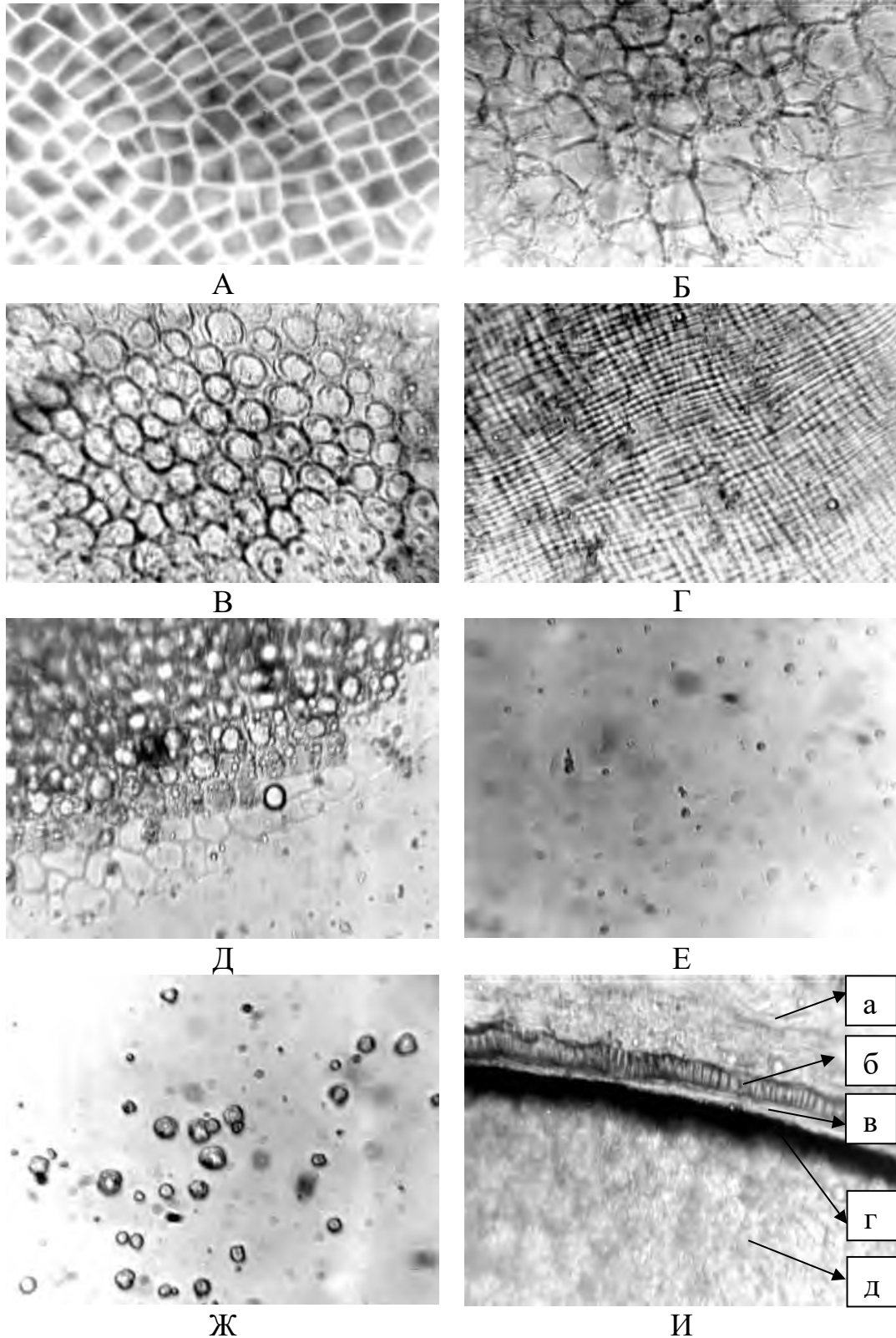


Рисунок А.4 – Льна посевного семени

А – эпидермис (250×); Б – паренхима (250×); В – механическая ткань (250×); Г – поперечный слой (250×); Д – эндосперм (250×); Е – капли жирного масла и алейроновые зерна (250×); Ж – алейроновые зерна с кристаллоидами и глобоидами (500×); И – поперечный срез семени льна (250×): а – паренхимный слой кожуры, б – механический слой, в – клетки поперечного слоя, г – пигментный слой, д – эндосперм семени

Определение основных групп биологически активных веществ

Семена льна измельчают до отсутствия цельных семян и помещают на предметное стекло в каплю туши (разведенную водой 1:10), тщательно размешивают и накрывают покровным стеклом; на темно-сером (почти черном) фоне выделяются белыми пятнами клетки со слизию.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Посторонние примеси

Другие части растения (части коробочек, плодоножек, битых семян).
Цельное сырье – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 2 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье:* сумма восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье – не менее 1,6 %.

Антроновый реактив. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г антрона, прибавляют серную кислоту или смесь серная кислота – вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в тёмное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч. Срок годности при хранении в тёмном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

Исходный раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито 2 мм. В коническую колбу помещают 1,0 г (точная навеска) измельчённого сырья, добавляют 30 мл воды, доведённой до кипения, и кипятят с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Горячее извлечение фильтруют через 5 слоёв марли, предварительно смоченных водой дистиллированной, или через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Марлю (вату) с сырьём помещают в ту же коническую колбу и повторяют экстракцию в описанных выше условиях ещё два раза. Полученные извлечения объединяют и доводят объём полученного раствора водой до метки (раствор А).

В коническую колбу помещают 25 мл раствора А, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. Сливают надосадочную жидкость и осадок растворяют в 30 мл горячей воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки (раствор Б).

Испытуемый раствор. В колбу помещают 3 мл раствора Б, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2–8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор СО глюкозы. Около 12 мг (точная навеска) стандартного образца глюкозы безводной растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают. В колбу помещают 3 мл полученного раствора, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2–8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Раствор сравнения. В колбу помещают 3 мл воды, прибавляют 6 мл антронового реактива и немедленно охлаждают при температуре 2–8 °С в течение 5 мин, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин и охлаждают.

Через 25 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора стандартного образца глюкозы в указанных выше условиях относительно раствора сравнения.

Суммарное содержание восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 250 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 80}{A_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы;

a_1 – навеска сырья, г;

a_0 – навеска фармакопейного стандартного образца глюкозы, г;

P – содержание глюкозы в фармакопейном стандартном образце глюкозы, %;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аспирант

кафедры фармацевтического
естествознания

М.Н. Родин

Научный руководитель

к.ф.н., доцент, доцент кафедры
фармацевтического естествознания

Д.О. Боков

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

УТВЕРЖДАЮ

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

Т.М. Литвинова

20 _____ г.

20 НОЯ 2024

АКТ

540

о внедрении результатов диссертации Родина Михаила Николаевича
в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания
Института фармации имени А.П. Нелюбина
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Родина Михаила Николаевича на тему «Совершенствование методов контроля качества цветков липы, семян льна, слоевищ ламинарии и лекарственных препаратов на их основе» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания при изучении дисциплины фармакогнозия и используются при проведении практических занятий в рамках образовательной программы школы мастерства «Высокотехнологичные методы микроскопического и фитохимического анализа лекарственных растительных препаратов» читаемых студентам по направлению подготовки (специальности) 33.06.01 Фармация (3.4.2. – Фармацевтическая химия, фармакогнозия).

Директор Института фармации
имени А.П. Нелюбина



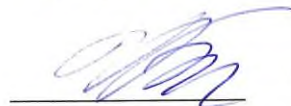
Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой
фармацевтического естествознания
Института фармации имени А.П. Нелюбина



Луферов А.Н.

Заведующий учебной частью кафедры
фармацевтического естествознания
Института фармации имени А.П. Нелюбина



Бобкова Н.В.

Начальник Учебного управления



Юдина Л.Ю.

УТВЕРЖДАЮ

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

 Т.М. Литвинова

20 _____ г.

АКТ 545

20 НОЯ 2024

о внедрении результатов диссертации Родина Михаила Николаевича
в учебный процесс кафедры аналитической, физической и коллоидной химии
Института фармации имени А.П. Нелюбина
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Родина Михаила Николаевича на тему «Совершенствование методов контроля качества цветков липы, семян льна, слоевищ ламинарии и лекарственных препаратов на их основе» внедрены в учебный процесс кафедры аналитической, физической и коллоидной химии при чтении лекций, подготовке учебных материалов и проведении семинаров для студентов по направлению подготовки (специальности) 33.06.01 Фармация (3.4.2. – Фармацевтическая химия, фармакогнозия) Института фармации имени А.П. Нелюбина.

Директор Института фармации
имени А.П. Нелюбина

 Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой
аналитической, физической и коллоидной химии
Института фармации имени А.П. Нелюбина

 Краснюк И.И. (мл.)

Заведующий учебной частью кафедры
аналитической, физической и коллоидной химии
Института фармации имени А.П. Нелюбина

 Плахотная О.Н.

Начальник Учебного управления

 Юдина Л.Ю.



Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс»
ОГРН 1237700156099, ИНН 9728089480, КПП 772701001
Юр. адрес: 117149, город Москва, Симферопольский б-р, д. 8, помещ. ½



УТВЕРЖДЕНО

Заведующий АА
ООО «СК»

Ю. В. Медведев
«13» декабря 2024 г.



Исх. №47-24

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, заведующий Аналитической Лабораторией (АЛ) ООО «СК» Медведев Юрий Владимирович и директор Центра Научных Разработок (ЦНР) ООО «СК» Суворова Александра Вадимовна удостоверяем факт внедрения методики количественного определения восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчёте на глюкозу в абсолютно сухом сырье методом дифференциальной спектрофотометрии в цветках липы, слоевищах ламинарии, семенах льна. Данная методика была разработана в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Совершенствование методов контроля качества цветков липы, семян льна, слоевищ ламинарии и лекарственных препаратов на их основе» ассистентом кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Родиным Михаилом Николаевичем.

Данная методика используется для оценки качества сырья лекарственных растений в ООО «СК».

Заведующий аналитической
лабораторией ООО «СК»,
к. фарм. н., Медведев Ю. В.

/ Медведев Ю.В.

Директор ЦНР ООО «СК»
Суворова А. В.

/ Суворова А.В.

