

На правах рукописи

МАРАХОВА АННА ИГОРЕВНА

**УНИФИКАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
И КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РАСТИТЕЛЬНОЙ ОСНОВЕ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Самара – 2017

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Сорокина Алла Анатольевна – доктор фармацевтических наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Браславский Валерий Борисович, доктор фармацевтических наук, доцент; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, доцент кафедры;

Белоногова Валентина Дмитриевна, доктор фармацевтических наук, доцент; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники, заведующий кафедрой;

Ханина Миниса Абдуллаевна, доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Министерства образования Московской области, кафедра химии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в 1_00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат фармацевтических наук, доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Богатые растительные ресурсы России, многовековые традиции использования в медицине лекарственного растительного сырья (ЛРС) и препаратов на его основе обуславливают интерес к фитотерапии, и, соответственно, к фитопрепаратам. Лекарственные растения продолжают оставаться источником получения лекарственных препаратов, которые составляют около 40% номенклатуры лекарственных средств, выпускаемых в нашей стране.

Лекарственные средства, в том числе и ЛРС, включены в список продукции, подлежащей обязательной сертификации, что подразумевает проведение испытаний (контроля качества). Обеспечение надлежащего качества ЛРС во многом зависит от правильной организации контроля, его действенности и эффективности, а также от уровня требований, заложенных в нормативную документацию (НД), и используемых методов анализа. Наиболее широко при работе с ЛРС применяют спектрофотометрию – для количественного определения флавоноидов, антраценпроизводных, сапонинов и других групп биологически активных соединений (БАС) и титриметрию, используемую для определения дубильных веществ, органических кислот и др.

Анализ существующей НД показал, что в большинстве случаев оценка качества сырья проводится без учета получаемых из него препаратов. В Государственной фармакопее (ГФ) РФ XIII издания наметилась тенденция к исправлению этой ситуации. В фармакопейные статьи на отдельные виды ЛРС включены несколько показателей содержания различных групп БАС, учитывающих получаемые из сырья препараты.

При разработке конкретных методик авторы чаще всего идут путем адаптации существующих методик, часто не принимается во внимание влияние одних групп БАС на другие. Разнообразие химического состава следует учитывать не только при выборе методики анализа, которая должна быть

селективна по отношению к аналиту, но и при проведении очистки и/или экстракции.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости проведения системных информационно-аналитических и экспериментальных исследований по изучению влияния различных факторов на выбор объективных методик для стандартизации ЛРС по отдельным группам БАС и повышению требований к качеству ЛРС и лекарственных препаратов (ЛП).

Степень разработанности темы исследования. Анализ литературы показал, что наиболее универсальными и перспективными методами для стандартизации ЛРС и суммарных препаратов на его основе являются спектрофотометрия и потенциометрия. Проблеме совершенствования методологических подходов к использованию спектрофотометрии при стандартизации ЛРС в последнее время уделяется повышенное внимание (работы В.А. Куркина, И.А. Самылиной, Н.В. Бубенчиковой, Б.В. Браславского, А.В. Куркиной, О.В. Евдокимовой и др.), однако авторы, как правило, делают акцент на одну группу БАС, не рассматривая проблему в целом. Необходимо также отметить, что современная приборная база позволяет проверить и уточнить некоторые параметры существующих методик для повышения их точности и объективности.

Недостаточно внимания в работах ведущих ученых в области фармакогнозии уделяется вопросу применения потенциометрического метода в анализе ЛРС, несмотря на то, что метод является фармакопейным и включен в ГФ РФ XIII изд.

Цели и задачи исследования. Целью работы является проведение комплексных теоретических и экспериментальных исследований по вопросам унификации физико-химических методов стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения и органические кислоты, и получаемых из него препаратов на основе систематического анализа комплекса БАС различной химической природы.

Задачи, решаемые для достижения поставленной цели:

1. Провести информационно-аналитические исследования по методам определения БАС в ЛРС и растительных препаратах в существующей НД и научной литературе.
2. Разработать методики потенциометрического титрования дубильных веществ и органических кислот в сырье и жидких лекарственных формах.
3. Изучить возможность использования титриметрии и потенциометрии в количественном определении минеральных веществ в ЛРС (на примере определения кальция и магния).
4. Исследовать особенности спектрофотометрического определения флавоноидов и антраценпроизводных в системе «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов на его основе с учетом различий в их химическом составе.
5. Составить общий алгоритм разработки методики спектрофотометрического определения фенольных соединений в ЛРС и препаратах.
6. Предложить общий алгоритм разработки методик определения БАС при стандартизации ЛРС с учетом получаемых препаратов и состава метаболома ЛР.
7. Изучить влияние некоторых факторов (ультразвук, постоянное и переменное электрическое напряжение, рН экстрагента) на эффективность экстракции флавоноидов и дубильных веществ из ЛРС.

Научная новизна исследования. Получены новые экспериментальные данные, доказывающие приоритет использования потенциометрического детектирования конечной точки титрования при определении дубильных веществ и органических кислот в 18 видах ЛРС (корневищах бадана, корневищах и корнях кровохлебки, плодах черники, соплодиях ольхи, коре дуба, корневищах лапчатки, корневищах с корнями диоскореи ниппонской, траве душицы, траве пустырника, цветках ромашки аптечной, траве Melissa лекарственной, листьях мяты перечной, листьях шалфея, траве зверобоя, плодах шиповника, плодах рябины, плодах калины, плодах черной смородины),

2 сборах (витаминных № 1, 2) и 26 ЛП (настоях и отварах из перечисленного ЛРС, настойках пустырника и зверобоя, комплексных препаратах «Тонзилгон Н», «Стоматофит», «Доппельгерц Нервотоник») по сравнению с индикаторными методиками титрования.

Проведенные валидационные исследования показали, что потенциометрическое титрование дает сходимые результаты с индикаторным титрованием по методике ГФ РФ XIII изд. у всех изученных видов сырья. Потенциометрическое титрование позволяет определять суммарное содержание органических кислот (алифатических, фенолкарбоновых, гидроксикоричных и др.) и дубильных веществ (конденсированных, гидролизующихся) и выдвигать гипотезы о накоплении изучаемых групп БАС.

Впервые установлены условия для эффективной экстракции макроэлементов из ЛРС на примере кальция и магния в ионном виде (патент РФ № 2466387 «Способ количественного определения кальция и магния в лекарственном растительном сырье») и разработана универсальная титриметрическая методика их совместного и отдельного определения предложенным методом, достигнуто упрощение и ускорение анализа.

Разработан способ количественного потенциометрического определения элементного состава на примере кальция в жидких экстрактах из ЛРС (патент РФ № 117691 «Способ определения кальция и магния в жидких экстрактах из растительного сырья»), включающий подбор оптимального значения рН, обеспечивающего наиболее полный переход кальция в ионную форму. Предложенный способ позволяет проводить анализ без пробоподготовки и отличается экспрессивностью и экономичностью.

На основании собственных исследований, проведенных на 5 видах ЛРС (трава чабреца, пустырника, цветки календулы, ромашки, листья крапивы) и 5 ЛП (настойки пустырника, календулы, зверобоя, жидкие экстракты чабреца, крапивы, препарат «Доппельгерц Нервотоник»), а также анализа литературы по определению суммы флавоноидов в ЛРС выявлены закономерности влияния рН

извлечения на положение максимума поглощения комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом и выбор стандартного образца.

Предложен алгоритм разработки методик стандартизации ЛРС и препаратов на его основе с учетом многообразия групп БАС.

При проведении системного изучения влияния электрического напряжения низких частот на экстракцию дубильных веществ и флавоноидов были получены результаты, позволившие разработать установку для холодной водной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья (патент РФ № 142485) под действием постоянного и переменного напряжения.

Предложены оптимальные условия холодной водной экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья в нативном виде (патент РФ № 2453322), и разработан способ отдельного выделения дубильных веществ и флавоноидов (патент РФ № 2522227), позволяющий выделять сумму дубильных веществ из растительного сырья при незначительной экстракции флавоноидов, а затем экстрагировать сумму флавоноидов, повысив их переход в воду.

Теоретическая значимость исследования заключается в научном обосновании подходов к разработке методик стандартизации ЛРС с учетом метаболома ЛР и принципа «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов на его основе; совершенствования методик контроля качества сырья и препаратов с использованием потенциометрического и спектрофотометрического методов анализа; выявлении влияния различных факторов (рН среды, электрическое напряжение, ультразвук) на экстракцию фенольных соединений из ЛРС.

Практическая значимость исследования. В исследовании решена важная проблема фармацевтического анализа – теоретическое и экспериментальное обоснование подходов к разработке методик стандартизации ЛРС с учетом разнообразия БАС лекарственного растения и принципа «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов на его основе; совершенствования методик контроля качества сырья и препаратов с использованием

потенциометрического и спектрофотометрического методов анализа. Полученные экспериментальные данные по изучению влияния различных факторов (рН среды, электрическое напряжение, ультразвук) позволили разработать способ отдельного выделения дубильных веществ и флавоноидов.

Результаты потенциометрии обобщены в виде математических моделей: «Определение растворимости оксалата кальция в растворах кислоты хлористоводородной и зависимость рН насыщенных растворов от аналитической концентрации кислоты хлористоводородной»; «Определение состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования»; «Окислительно-восстановительное титрование одним окислителем нескольких восстановителей в условиях термодинамического равновесия при T , $P = \text{Const}$ », на основании которых созданы компьютерные программы, облегчающие расчеты потенциометрического титрования и прямой потенциометрии в установлении количества ионов кальция.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды отечественных (И. А. Самылиной, А. А. Сорокиной, В. А. Куркина, Б. В. Браславского, В. Н. Бубенчиковой, А. В. Куркиной, Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич и др.) и зарубежных исследователей (E.C. Bate-Smith, N. Bisset, C. T. Bryant, J. V. Harborne, T. J. Mabry, H. L. Mabry et al.), развивающие использование физико-химических методов в стандартизации ЛРС и растительных препаратов; международная и российская нормативная документация по контролю качества ЛРС и растительных препаратов. Методология исследования заключалась в изучении и разработке универсальных физико-химических методик анализа природных БАС, которые могут быть применены в «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов с учетом метаболома ЛР, их обобщении в алгоритм выбора методики анализа и параметра стандартизации.

При выполнении работы были использованы методы сравнительного, документированного анализа, комплекс физико-химических методов,

технологических испытаний, математические методы анализа и обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты разработки методик потенциометрического титрования при определении дубильных веществ и органических кислот в сырье и жидких лекарственных формах.

2. Результаты использования титриметрии и прямой потенциометрии в количественном определении минеральных веществ на примере определения кальция и магния в ЛРС.

3. Результаты изучения особенностей спектрофотометрического определения флавоноидов и антраценпроизводных в системе «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов на его основе с учетом различий в их химическом составе.

4. Результаты изучения влияния некоторых факторов (ультразвук, переменное и постоянное электрическое напряжение, рН экстрагента) на эффективность экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья.

5. Результаты разработки методик потенциометрического титрования при определении дубильных веществ и органических кислот в сырье и жидких лекарственных формах.

6. Результаты использования титриметрии и прямой потенциометрии в количественном определении минеральных веществ на примере определения кальция и магния в ЛРС.

7. Результаты изучения особенностей спектрофотометрического определения флавоноидов и антраценпроизводных в системе «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов на его основе с учетом различий в их химическом составе.

8. Результаты изучения влияния некоторых факторов (ультразвук, переменное и постоянное электрическое напряжение, рН экстрагента) на эффективность экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов подтверждена многократной повторностью экспериментов; исследованием физико-химических свойств природных БАС; статистической обработкой полученных результатов и их сопоставлением с данными литературы. Достоверность первичных материалов подтверждена экспертной оценкой. Научные положения и выводы диссертации базируются на достаточных количествах анализов.

Апробация результатов исследования. Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии «Актуальные проблемы науки фармацевтических ВУЗов: от разработки до коммерциализации», Пермь, 2011; Конференции Курского государственного медицинского университета «Фармацевтические технологии», Курск, 2011; Научно-методической конференции «Гаммермановские чтения – 2011», Санкт-Петербург, 2011; XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2012; Московской международной гомеопатической конференции «Развитие гомеопатического метода в современной медицине», Москва, 2012; Первой российской конференции по медицинской химии с международным участием, Москва, 2013; V Международной научной конференции SCIENCE4HEALTH, Москва, 2013; 5-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2013» «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ», Воронеж, 2013; II научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», Москва, 2014.

Апробация диссертации прошла на межкафедральной конференции в ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, 2015).

Внедрение результатов исследования. Разработаны проекты НД для Государственной фармакопеи XIII издания: проект ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье»; проект ФС «Шиповника плоды», включающие методики потенциметрического титрования.

Разработаны методики количественного определения флавоноидов в цветках ромашки аптечной; антраценпроизводных в сборе противогеморроидальном; дубильных веществ в коре дуба, которые включены в НД предприятия ЗАО «Здоровье» (Акт от 14.02.2014 г.).

Разработанные методики потенциметрического титрования органических кислот и дубильных веществ в ЛРС и препаратах апробированы в ООО «Центр контроля качества лекарственных средств «ЦЕНТР ЭКОФАРМ» при проведении серийных анализов ЛРС (Акт от 02.04. 2013 г.). Применение потенциметрического титрования при определении дубильных веществ и органических кислот показали, что данный метод может быть использован для установления содержания указанных групп БАС в видах сырья, которые не стандартизируются по их содержанию.

Полученные результаты по разработке подходов к анализу флавоноидов, органических кислот, дубильных веществ и минеральных компонентов в ЛРС и препаратах с учетом сопутствующих соединений метаболома растения используются в учебных процессах на кафедрах фармакогнозии ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, Институте биохимической технологии и нанотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», факультете непрерывного образования Московского филиала частного учреждения «Образовательная организация высшего образования «Медицинский университет «Реавиз», что подтверждено актами внедрения.

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов (90 % общего объема). В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведено планирование исследований, выполнены экспериментально-аналитические исследования по разработке и валидации аналитических методик, осуществлена статистическая обработка и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии и выполнении всех этапов исследования: от постановки задач и их реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ университета. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (№ государственной регистрации 01201168237) по теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 3, 6, 7 паспорта специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 55 печатных работ, из которых 2 монографии, 24 статьи в журналах, рецензируемых ВАК Минобрнауки России, 22 из которых – по результатам экспериментального исследования и 2 обзорные статьи по теме диссертации. По результатам исследования также получено 5 патентов (4 патента РФ на изобретение и 1 патент на полезную модель).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 313 страницах машинописного текста, содержит 101 таблицу и 93 рисунка и состоит из

введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственно экспериментальных исследований, общих выводов и приложения. Список литературы содержит 335 источников, из них 103 – на иностранном языке.

Во введении сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе рассмотрены современные методы анализа БАС в ЛРС, особое внимание уделено фенольным соединениям (флавоноидам, фенолкарбоновым кислотам, дубильным веществам и др.) и свободным органическим кислотам. Также приведено информационно-аналитическое исследование по способам повышения эффективности экстракции БАС из ЛРС, как традиционных, так и инновационных.

Во второй главе приведены характеристика объектов исследования – ЛРС и растительных препаратов, краткое описание методов анализа, приборов и реактивов, использованных в работе, а также статистической обработки результатов анализа.

В третьей главе представлены результаты исследований по разработке методик потенциометрического анализа дубильных веществ, органических кислот и макроэлементов на примере кальция в «сквозной» стандартизации ЛРС и препаратов на его основе. Показаны преимущества и возможность применения разработанных методик в анализе сырья, содержащего большие и малые количества анализируемых соединений. Описаны математические модели: «Определение растворимости оксалата кальция в растворах кислоты хлористоводородной и зависимость рН насыщенных растворов от аналитической концентрации кислоты хлористоводородной»; модель по определению состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования; модель окислительно-восстановительного титрования одним окислителем нескольких восстановителей в условиях термодинамического равновесия при T , $P = \text{Const}$, которые легли в основу соответствующих компьютерных программ, которые

облегчают проведение расчетов и прогнозирование результата при разработке аналитических методик и рутинном анализе.

В четвертой главе предложен алгоритм разработки фотометрических методик анализа и показана возможность его применения. С использованием алгоритма разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы и настойке календулы, цветках ромашки, траве пустырника, его настое и настойке, траве чабреца, настое, настойке и жидком экстракте чабреца, листьях крапивы, настое, настойке гомеопатической матричной и жидком экстракте. Обнаружено, что использование алгоритма позволяет систематизировать этапы разработки методики и избежать ошибок в выборе длины волны и стандартного образца.

В пятой главе представлена схема разработки и методология выбора методики анализа и соответствующего параметра стандартизации ЛРС с учетом соединений метаболома растения и принципов «сквозной» стандартизации.

Шестая глава содержит данные по исследованию влияния различных физических и химических факторов на эффективность экстракции БАС из ЛРС (ультразвук, переменное и постоянное электрическое напряжение, рН среды).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили 23 вида ЛРС различных морфологических групп, растительные ЛП (пачки, фильтр-пакеты), отвечающие требованиям действующей нормативной документации фирм-производителей ОАО «Красногорсклексредства» и ЗАО «Здоровье», а также сырье из кафедрального фонда кафедры фармакогнозии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова: Бадана корневища, Шиповника плоды, Донника трава, Дуба кора, Душицы трава, Крапивы листья, Кровохлебки корневища и корни, Крушины кора, Лапчатки корневища, Мелиссы лекарственной трава, Мята перечной листья, Ноготков цветки, Ромашки цветки, Рябины плоды, Смородины черной плоды, Чабреца трава, Черники обыкновенной плоды,

Шалфея листья, Зверобоя трава, Пустырника трава, Шалфея листья, Бессмертника цветки, Диоскореи nipпонской корневища и три сбора: Витаминные № 1, 2, Противогеморроидальный, также водные и водно-спиртовые извлечения из перечисленных видов сырья и сборов; жидкие экстракты левзеи, элеутерококка, водяного перца, «Ротокан», «Тонзилгон», «Стоматофит», «Доппельгерц Нервотоник».

Спектры поглощения извлечений из сырья и сборов снимали на регистрирующих спектрофотометрах Specord M40, M20 (Specord, Германия); Lambda 950 (PerkinElmer, США), Cary Varian 4000 («Agilent Technologies», Австралия), оптическую плотность измеряли в кювете с толщиной слоя 10 мм. Определение содержания свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту и дубильных веществ в пересчете на танин методом потенциометрического титрования проводили на рН-метре – рН-410 (фирма Аквилон, Россия). Исследования влияния ультразвука на эффективность экстракции флавоноидов и дубильных веществ проводили с использованием ультразвуковой ванны с рабочей частотой 35 кГц; влияния электрического напряжения – с помощью оригинального устройства (патент РФ № 142485).

В качестве стандартных образцов (СО) при разработке методик были использованы: галловая кислота, имп. CAS № 5995-86-8; гиперозид, ФС 42-0106-03; кверцетин, имп. CAS № 6151-25-3; лютеолин, имп. CAS № 491-70-3; рутин ГСО, ФС 42-2508-87; апигенин CAS № 520-36-5; рутин, имп. CAS № 207671-50-9; танин ГСО ГОСТ 936211. Все используемые реактивы были квалификации не ниже «чистые для анализа» («ч. д. а.»).

Влажность сырья определяли по методике, представленной в общей статье ГФ XI, в. 1, с. 285 «Определение влажности лекарственного растительного сырья». Плотность извлечений определяли по методике ГФ XI изд., вып. 1, с. 24 (метод 1). Статистическая обработка результатов анализа проводилась в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1: Основные положения и определения», ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 «Точность

(правильность и прецизионность)», Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Н.В. Юргель и др., 2007) и ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик». Результаты исследования подвергались статистической обработке согласно общей статье ГФ XI, в. 1, с. 199, объем выборки составлял не менее 5 образцов.

Алгоритм разработки методики количественного анализа БАС в ЛРС и препаратах с учетом принципа «сквозной» стандартизации

Согласно принципу «сквозной» стандартизации ЛРС и препараты на его основе должны стандартизоваться одним и тем же методом по одним и тем же БАС. Чаще всего ЛРС и препараты на его основе стандартизуются по суммарному содержанию БАС, относящихся к одной группе, так как фармакологический эффект обусловлен суммой БАС препарата. Для того чтобы правильно определить, какую группу БАС выбрать для стандартизации сырья (назовем ее анализируемой группой), необходимо изучить химический состав сырья с позиции физико-химических свойств составляющих его компонентов. Общая схема алгоритма анализа представлена на рисунке 1. Кроме того, необходимо обратить внимание на пути использования сырья.

От того, какие препараты получают из ЛРС, зависит выбор исследуемой фракции БАС (если для получения настоя, то анализируемой группой должны быть соединения, хорошо переходящие в воду; если для изготовления настойки – то хорошо растворимые в спирте) и т.д.

Предлагаемый метод анализа должен отвечать таким качествам, как экспрессивность, экономичность, достаточная точность и селективность. Ошибки в определении анализируемой группы БАС вызваны чаще всего наличием «мешающих» сопутствующих соединений, присутствующих в значимых количествах (содержание которых, находится примерно в тех же количествах, что и в анализируемых группах БАС).

На объективность методики влияет также правильный выбор стандартного образца. Он должен быть доступным и, желательно, являться компонентом

анализируемой группы и/или иметь схожие физико-химические характеристики с определяемыми соединениями.

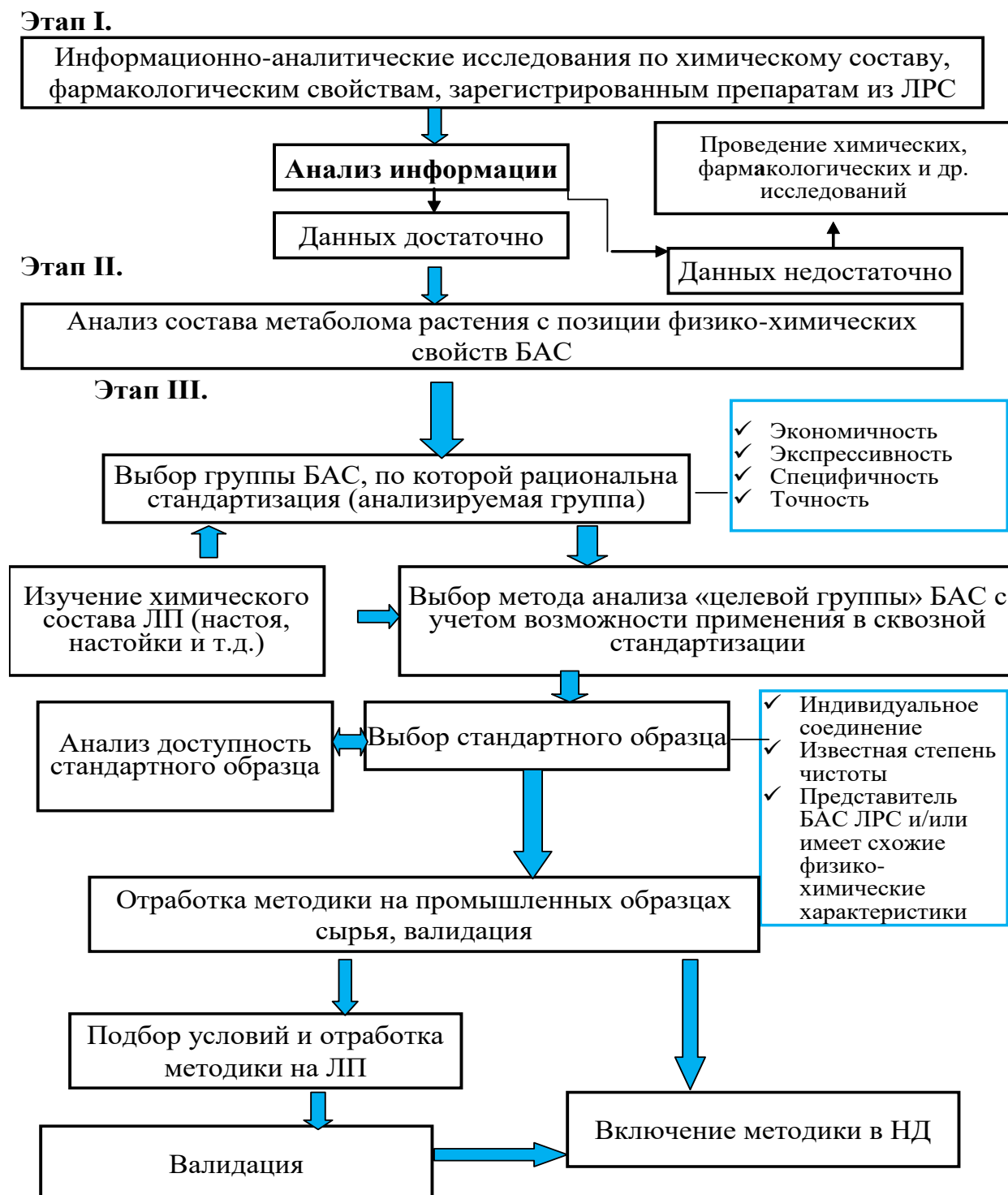


Рисунок 1. Блок-схема алгоритма разработки методики количественного анализа БАС в ЛРС и препаратах с учетом принципа «сквозной» стандартизации

Титриметрия в анализе ЛРС

Большой группой БАС, по которой стандартизация сырья проводится методом титрования, являются дубильные вещества. Для их количественного определения НД предусматривает титрование перманганатом калия, а установление конечной точки титрования проводится визуально, с помощью индикатора, что накладывает отпечаток субъективности на получаемые результаты. Использование потенциометрического метода при определении окончания титрования позволяет избежать ошибок.

Для ряда видов ЛРС и их водных извлечений была разработана методика потенциометрического анализа дубильных веществ. Особенностью стало использование потенциометрического детектирования конечной точки титрования. Для определения эквивалентного объема по полученным данным строили интегральные и дифференциальные кривые титрования (рисунки 2 и 3). На кривой титрования извлечения из корневищ змеевика присутствует два скачка титрования, предположительно соответствующих окислению двух групп дубильных веществ – конденсированных и гидролизуемых. Результаты определения в сравнении с данными методики ГФ XIII изд. представлены в таблице 1. Дубильные вещества содержатся во многих видах ЛРС, в частности в листьях мяты перечной, шалфея лекарственного, травах Melissa лекарственной и чабреца, которые используются для приготовления настоев. Была изучена возможность использования методики потенциометрического титрования в оценке содержания дубильных веществ в перечисленном ЛРС и водных извлечениях (таблица 1, рисунок 4).

В качестве объектов исследования были выбраны пять видов ЛРС, стандартизирующиеся по сумме дубильных веществ.

На примере определения суммы дубильных веществ в траве зверобоя была проведена валидация разработанной методики по следующим критериям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность и показана возможность применения методики потенциометрического определения дубильных веществ в анализе ЛРС.

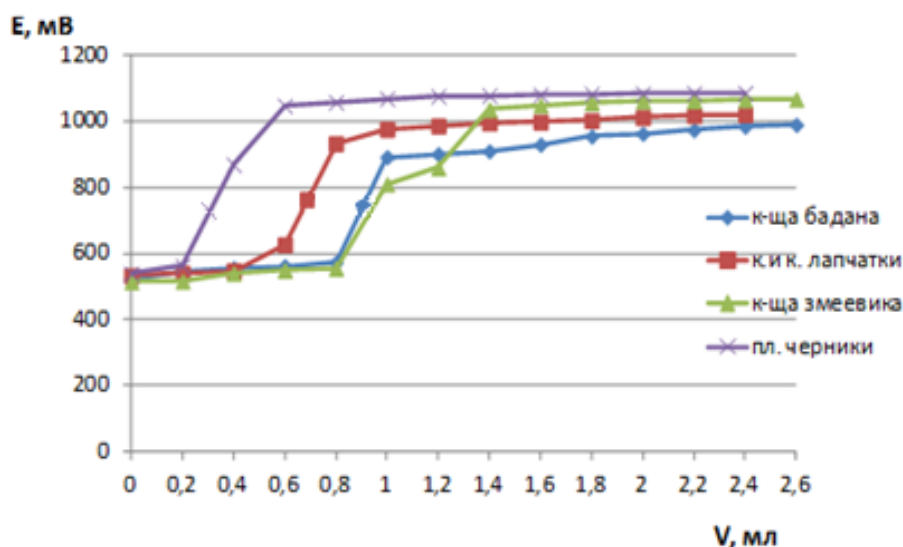


Рисунок 2. Интегральные кривые титрования извлечений из сырья раствором калия перманганата (0,02 М)

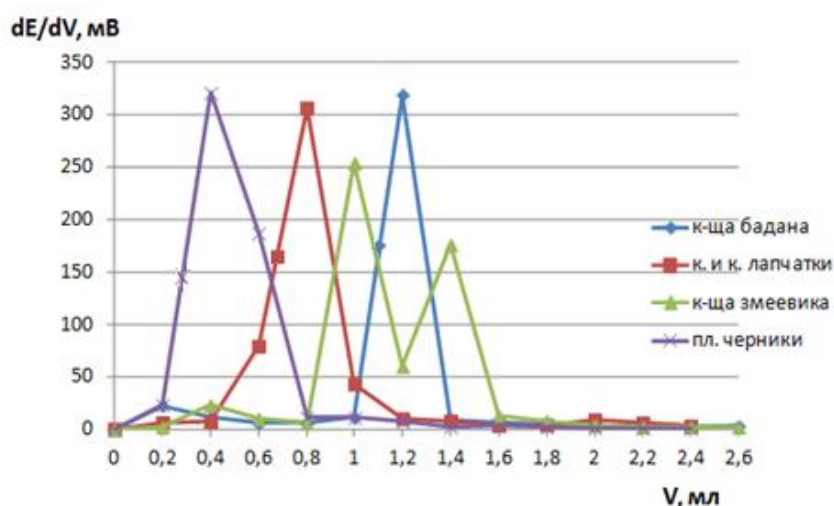


Рисунок 3. Дифференциальные кривые титрования извлечений из сырья раствором калия перманганата (0,02 М)

Таблица 1

Содержание суммы дубильных веществ в объектах исследования (n=5; p=0,95)

Объект исследования	Содержание дубильных веществ, %		Норма по НД, не менее, %
	Потенциометрия	Методика ГФ	
Корневища лапчатки	21,78±0,04	24,27±0,41	20
Кора дуба	9,078±0,005	9,080±0,010	8
Корневища змеевика	19,28±0,04 <i>Гидролиз. 16,66*</i> <i>Конденсир. 2,62**</i>	21,52±0,40	15
Плоды черники	3,63±0,02	5,44±0,32	–
Корневища бадана	32,67±0,05	33,25±0,24	20

Соплодия ольхи	20,95±0,04	21,02±0,22	20
Трава зверобоя	8,87±0,08	8,86±0,14	–
Трава мелиссы	4,46±0,04	4,58±0,12	–
Листья мяты перечной	5,82±0,05	6,01±0,08	–
Трава чабреца	4,03±0,03	4,14±0,15	–
Листья шалфея	5,56±0,07	5,71±0,21	–

*в пересчете на танин; **в пересчете на катехин; – не нормируется.

В рамках концепции «сквозной» стандартизации была изучена возможность использования потенциометрии в анализе препаратов: водных и водно-спиртовых извлечений и многокомпонентных лекарственных форм на пяти примерах (таблица 2, рисунок 4). Предложено выражать содержание БАС в препаратах из ЛРС в мг/мл, поскольку в этом случае можно легко оценить их количество независимо от способа получения экстракционного препарата. Кроме того, такие единицы измерения общеприняты для жидких лекарственных средств.

Таблица 2

Содержание дубильных веществ в лекарственных растительных препаратах
в пересчете на танин (n=5; p=0,95)

Препарат	Содержание дубильных веществ, мг/мл	
	Потенциометрия	Титрование с индикатором
«Тонзилгон Н»	39,91±0,06	40,56±0,11
«Стоматофит»	53,21±0,08	49,96±0,21
«Доппельгерц Нервотоник»	1,00±0,05	1,03±0,07
Настойка травы зверобоя	7,65±0,04	7,66±0,05
Настойка травы пустырника	4,99±0,03	5,06±0,02

Свободные органические кислоты являются первичными метаболитами и присутствуют практически во всех видах ЛРС. Действующая НД предлагает титриметрическую методику их количественного определения для плодов шиповника. Данная методика не универсальна, так как неосуществима в случае анализа более интенсивно окрашенных растворов извлечений, не образующих пены при взбалтывании. Кроме того, в ней предлагается проводить

приблизительное разбавление. Изучен вопрос универсализации методики определения содержания суммы органических кислот в ЛРС за счет использования потенциометрии при определении конечной точки титрования. Типичная кривая титрования на примере извлечения из плодов шиповника представлена на рисунке 5.

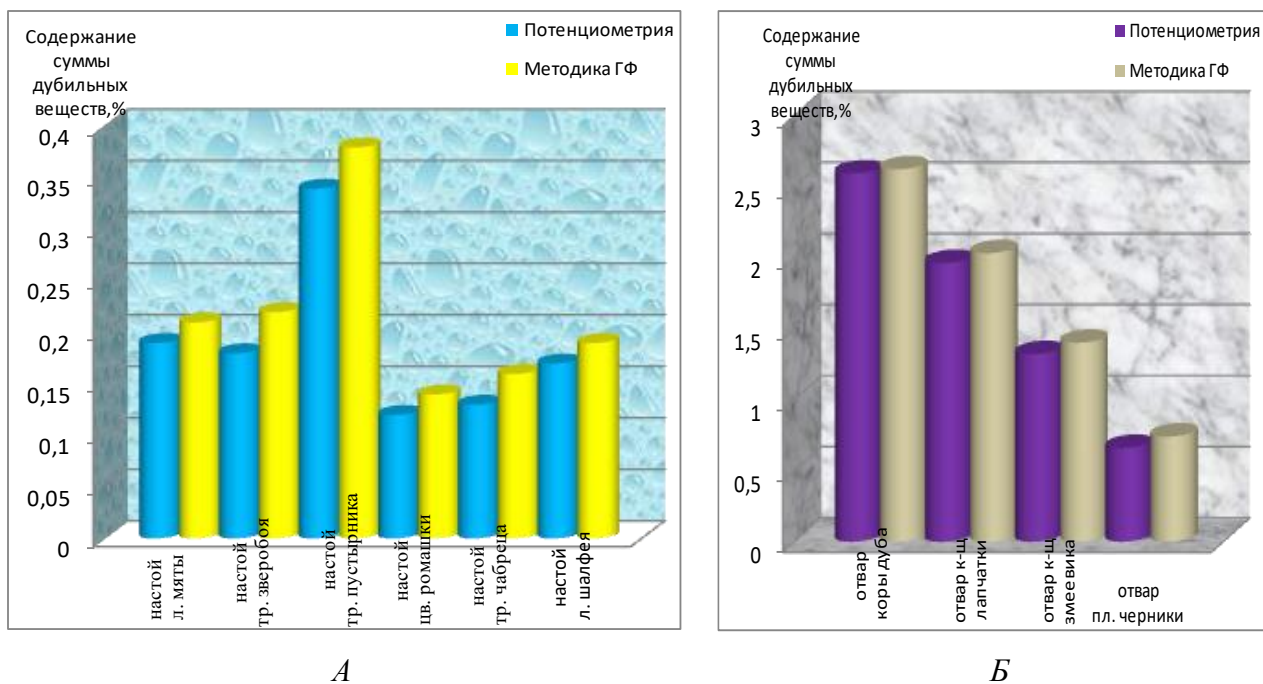


Рисунок 4. Диаграммы, отражающие содержание суммы дубильных веществ в настоях (А) и отварах (Б)

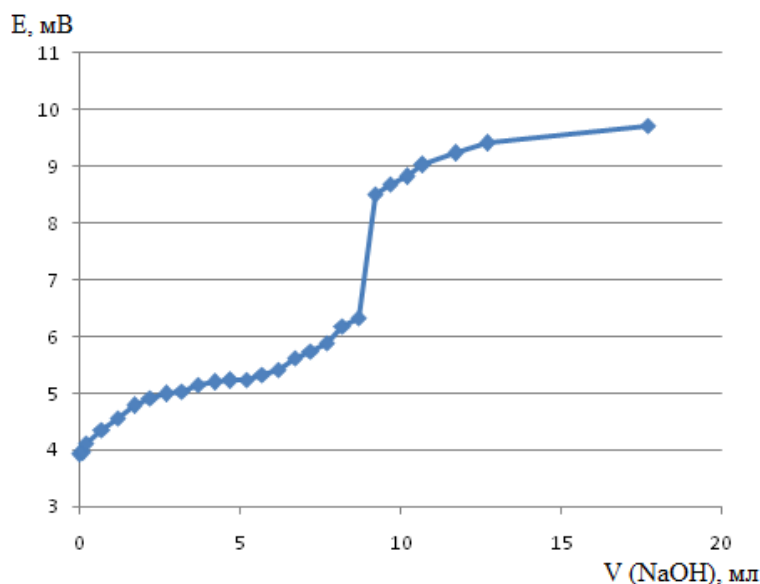


Рисунок 5. Кривая титрования органических кислот в извлечении плодов шиповника 0,1 М раствором натрия гидроксида

Была показана возможность применения потенциметрического титрования в количественном анализе органических кислот в ЛРС, сборе витаминном и настоях из ЛРС (таблица 3).

Таблица 3

Содержание суммы органических кислот в ЛРС, сборе и настоях из ЛРС (n=5; p=0,95).

Объект исследования	Содержание суммы органических кислот, %	
	Методика ГФ	Потенциометрия
Плоды рябины	3,78±0,22	3,68±0,04
Плоды шиповника	2,71± 0,06	2,65±0,03
Плоды калины	6,09±0,12	5,91±0,08
Плоды черной смородины	5,32±0,14	5,08±0,07
Настой плодов шиповника	0,21±0,03	0,21±0,03
Настой плодов рябины	0,39±0,02	0,37±0,02
Настой плодов калины	0,49± 0,05	0,46±0,03
Настой плодов смородины черной	0,28±0,04	0,27±0,03
Настой листьев мяты перечной	0,13 ±0,03	0,15 ±0,04
Настой травы мелиссы	0,16 ±0,02	0,18 ±0,03
Настой листьев шалфея	0,11 ±0,02	0,13 ±0,02
Настой травы чабреца	0,12 ±0,02	0,13 ±0,04
Настой листьев крапивы	0,068±0,003	Не определяется
Настой травы душицы	0,16 ±0,02	0,14±0,03
Настой цветков ромашки	0,14±0,03	0,11±0,02
Настой цветков бессмертника	0,19±0,02	0,17±0,02
Витаминный сбор № 2	3,18±0,05	3,06±0,02
Настой витаминного сбора № 1	0,37±0,04	0,41±0,03
Настой витаминного сбора № 2	0,30±0,03	0,26±0,02

Полученные экспериментальные данные и валидационные характеристики показали возможность использования методики потенциметрического титрования в анализе ЛРС, содержащего дубильные вещества и органические кислоты, в водных извлечениях и препаратах и целесообразность ее включения в соответствующие НД.

Потенциометрия применима не только для определения конечной точки титрования при кислотном и окислительно-восстановительном взаимодействии, но и для определения концентрации различных ионов в растворе. Разработана и валидирована методика потенциометрического определения кальция в листьях крапивы и ее настое, жидких экстрактах водяного перца, элеутерококка, левзеи и препарате «Ротокан» с использованием кальций-селективного электрода. Разработаны методики определения кальция и магния в ЛРС и лекарственных формах комплексонометрическим индикаторным титрованием. Для титрования кальция были использованы индикаторы эриохром, мурексид и хромогеновый темно-синий, наилучший результат показал эриохром (более чёткое определение конца титрования и сходимость результатов с потенциометрией и атомно-абсорбционным анализом).

Экстракцию ионов кальция из сырья проводили 8% раствором кислоты хлористоводородной при нагревании на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Эти условия экстракции способствуют переходу кальция из цистолитов и друз в извлечение. Для осаждения мешающих определению катионов магния к извлечению добавляли раствор натрия гидроксида концентрированный. Затем полученный осадок отфильтровывали, а фильтрат нейтрализовали концентрированной кислотой хлористоводородной до $\text{pH}=7-8$. Для потенциометрического определения кальция к полученному извлечению добавляли раствор натрия гидроксида концентрированного до $\text{pH}=5$. Содержание кальция определяли с помощью кальций-селективного электрода по калибровочному графику.

Для определения магния в солянокислом извлечении использовали индикатор – пирокатехиновый фиолетовый.

Результаты по содержанию кальция и магния в листьях крапивы представлены в таблице 4.

Таблица 4

Содержание кальция и магния в листьях крапивы двудомной (n=5; p=0,95)

	Методика определения				
	Са – титриметрически			Mg	Са
	Эриохром черный Т	Мурексид	Хромоген темно-синий	Пирока- техниновый фиолетовый	Потенцио- метри- ческий
Содержание, %	1,2746	1,0124	1,1775	0,8418	1,3023
Метрологические характеристики	S ² =0,0003	S ² =0,0002	S ² =0,0002	S ² =0,0017	S ² =0,0014
	S=0,0163	S=0,0148	S=0,0155	S=0,0415	S=0,0377
	±ΔX=0,0003	±ΔX=0,0002	±ΔX=0,0003	±ΔX=0,0008	±ΔX=0,0007
	E=0,02%	E=0,03%	E=0,03%	E=1,0%	E=0,05%

Методики определения кальция с индикаторами и потенциометрическим детектированием конечной точки титрования хорошо воспроизводимы и дают схожие результаты. Микроскопическое исследование показало, что разработанная методика экстракции обеспечивает полный переход кальция из друз и цистолитов в раствор. Полученный результат имеет схожее значение с данными атомно-адсорбционного анализа, согласно которым содержание кальция в листьях крапивы составило $1,3012 \pm 0,0003\%$. Методика потенциометрического определения кальция была валидирована в условиях аккредитованной испытательной лаборатории по контролю качества лекарственных средств.

Прямая потенциометрия была использована для определения кальция в жидких экстрактах левзеи, элеутерокка, горца перечного и препарата «Ротокан» (таблица 5).

Для упрощения расчетов титрования были составлены математические модели, по которым написаны соответствующие компьютерные программы: модель окислительно-восстановительного титрования одним окислителем нескольких восстановителей в условиях термодинамического равновесия при T, P=Const; модель по определению состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования; модель по определению растворимости оксалата кальция в растворах кислоты

хлористоводородной и зависимость рН насыщенных растворов от аналитической концентрации кислоты хлористоводородной.

Таблица 5

Содержание кальция в жидких экстрактах, определенное потенциометрическим методом
(n=10; f=0,95)

Экстракт	Горца перечного	Левзеи	Элеутерококка	Препарат «Ротокан»
Содержание кальция, %	0,064±0,003	0,040±0,004	0,010±0,003	0,016±0,002

Спектрофотометрия в анализе ЛРС

Спектрофотометрия широко используется для количественного определения флавоноидов, антраценпроизводных, сапонинов и других групп БАС в ЛРС и препаратах. Были проведены исследования по разработке новых и усовершенствованию методик ГФ XI изд. спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в ЛРС (трава пустырника, зверобоя, чабреца, листья крапивы, цветки бессмертника, ноготков, ромашки аптечной), настоев и экстрактов из него. При работе учитывалось, что экстракты из растительного сырья являются многокомпонентными системами, работа с ними имеет определенные особенности (влияние рН, выбор стандартного образца и др.).

При изучении влияния рН на положение максимума поглощения комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия был поставлен модельный опыт на примере рутина, растворенного в буферных растворах с кислым, щелочным и близким к нейтральному значениями рН. Установлено, что рН сильно влияет как на положение максимума поглощения, так и на оптическую плотность (рисунок 6).

Аналогичные опыты, но в более широком диапазоне рН, были проведены с ЛРС чабреца, мяты, душицы, Melissa и шалфея (рисунок 7). Общей закономерности зависимости эффективности экстракции от рН для всех видов ЛРС выявить не удалось, что свидетельствует о неоднозначности слабых кислотных свойств флавоноидов, что также подтверждается теоретическим расчетом с помощью программы ACD lab.

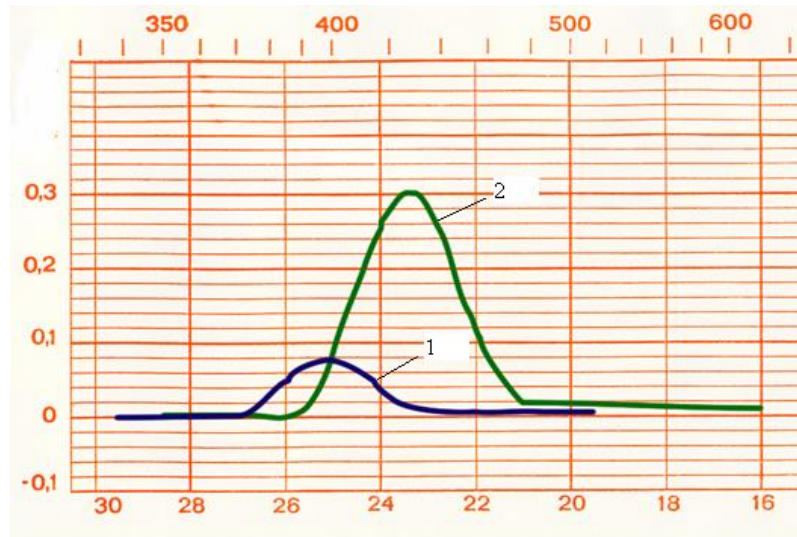


Рисунок 6. Спектры поглощения стандартного образца рутина при различных значениях pH:
1 – спектр раствора рутина в буфере с pH=6,86, 2 – спектр раствора рутина с pH=9,18

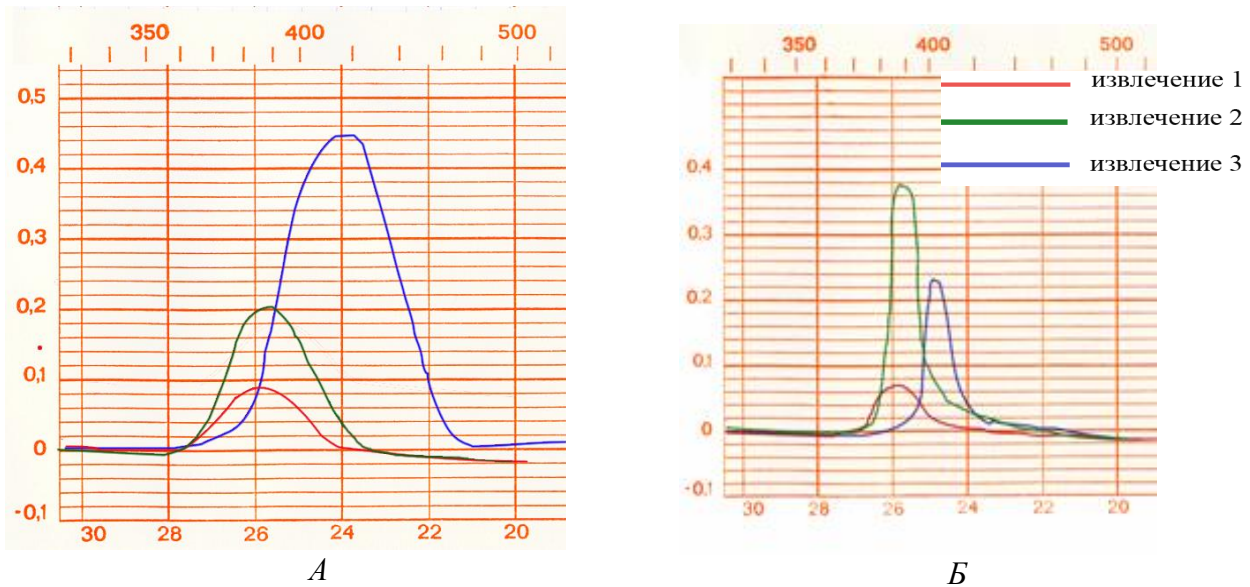


Рисунок 7. Спектры поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом на примере извлечений листьев мяты перечной (А) и травы душицы (Б) с разным значением pH экстрагента:

извлечение 1 – настой, приготовленный на буферном растворе с pH=1,68; *извлечение 2* – настой, приготовленный на буферном растворе с pH=6,86; *извлечение 3* – настой, приготовленный на буферном растворе с pH=9,18

В методиках ГФ XIII изд. при определении содержания флавоноидов в траве пустырника и траве зверобоя при образовании окрашенного комплекса с алюминия хлоридом в рабочий раствор не добавляют кислоту, но делают это при приготовлении раствора сравнения.

Тем самым не учитывается влияние рН среды на ионизацию молекул флавоноидов, что в конечном итоге может повлиять на их спектральные характеристики (рисунок 8).

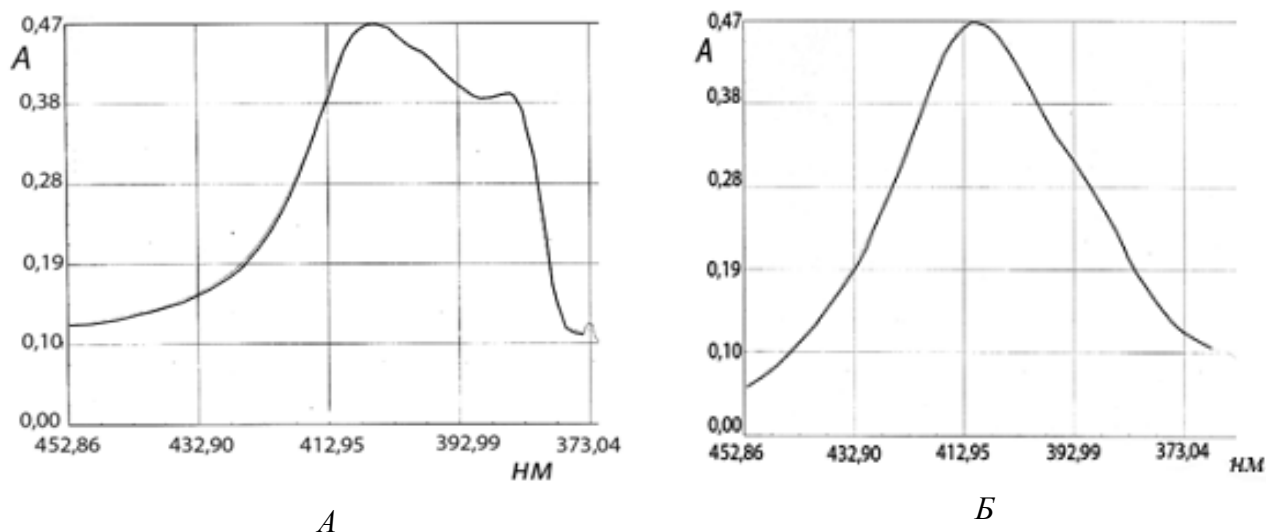


Рисунок 8. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов водно-спиртового извлечения травы пустырника с алюминия хлоридом в присутствии кислоты (Б) и без нее (А)

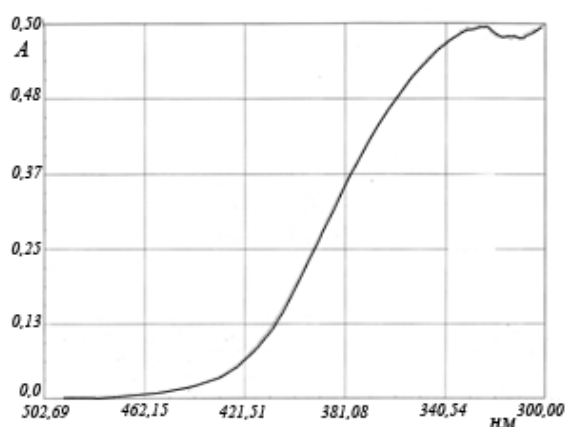
С учетом полученных результатов были подобраны условия для определения суммы флавоноидов в настое, настойке травы зверобоя и препарате «Доппельгерц Нервотоник», содержащем жидкий экстракт зверобоя (таблица 6).

В спектре поглощения извлечения из цветков бессмертника песчаного (рисунок 9), полученного по методике ФС ГФ XI изд., нет четкого максимума поглощения, что говорит о необходимости проведения очистки. Нами предложено использовать дифференциальную спектрофотометрию после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом и пересчет суммы флавоноидов проводить на рутин. Разработанная методика была использована для анализа нескольких серий цветков бессмертника различных производителей, который показал, что сумма флавоноидов в пересчете на рутин составляет не менее 3 %. Методика дифференциальной фотометрии применима и для анализа флавоноидов в настое цветков бессмертника (таблица 6).

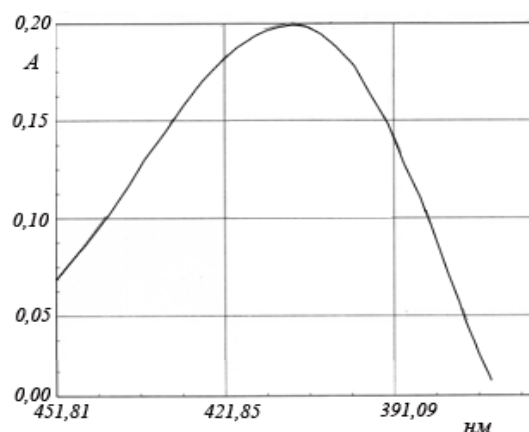
Таблица 6

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в объектах исследования
(n=5; p=0,95)

Объект исследования	Содержание суммы флавоноидов	Аналитическая длина волны	Стандартный образец
Цветки бессмертника	3,18±0,07%	409±2 нм	Рутин
Настой цветков бессмертника	28,9±1,2 мг/мл	396±2 нм	Апигенин
Трава пустырника	0,23±0,03%	411±2 нм	Рутин
Настойка пустырника	0,065±0,001 мг/мл	411±2 нм	Рутин
Трава чабреца	1,36±0,02%	405±2 нм	Рутин
Настой травы чабреца	1,80±0,04 мг/мл	419±2 нм	Рутин
Жидкий экстракт чабреца	11,21±0,05 мг/мл	415±2 нм	Рутин
Трава зверобоя	1,58±0,03%	415±2 нм	Рутин
Настой травы зверобоя	0,158±0,002 мг/мл	421±2 нм	Кверцетин
Настойка зверобоя	0,379±0,004 мг/мл	426±2 нм	Кверцетин
«Доппельгерц Нервотоник» (эликсир)	0,124±0,002 мг/мл	428±2 нм	Кверцетин
Цветки ромашки	1,76±0,02%	408±2 нм	Рутин
Листья крапивы	1,10±0,02 %	372±2 нм	Лютеолин
Настой листьев крапивы	0,049±0,002 мг/мл	354 нм	Лютеолин
Цветки ноготков	1,53±0,04%	412±2 нм	Рутин
Настойка календулы	0,20±0,01 мг/мл	408±2 нм	Рутин



А



Б

Рисунок 9. Спектр поглощения спиртового извлечения из цветков бессмертника (А) и абсорбционный спектр комплекса флавоноидов цветков бессмертника с алюминия хлоридом (Б)

Трава чабреца используется для получения жидкого экстракта и настоев. В обеих лекарственных формах присутствуют гидрофильные вещества, в том

числе флавоноиды. Разработана методика определения содержания суммы флавоноидов в траве чабреца и полученных из нее лекарственных формах. Отработка методики проводилась на промышленных образцах сырья (см. таблицу 6). Валидационные исследования показали специфичность, линейность, правильность, прецизионность методики.

Аналогичные исследования по содержанию флавоноидов были проведены в отношении цветков ромашки аптечной, которые используются в виде настоя, входят в состав лекарственных сборов, комплексных жидких экстрактов. В отличие от фармакопейной методики на основании анализа ряда промышленных серий сырья определять оптическую плотность рекомендуем при длине волны 409 ± 2 нм (см. таблицу 6).

Листья крапивы двудомной содержат существенное количество флавоноидов, которые потенцируют кровоостанавливающий эффект, способствуют лучшему усвоению кальция. Была разработана методика определения флавоноидов в листьях крапивы. В связи с тем что препараты крапивы обладают достаточной большой буферной емкостью, обусловленной, по-видимому, присутствием фенолкарбоновых кислот и их солей, для подавления диссоциации флавоноидов и гидролиза хлорида алюминия необходимо было создание ацетатного буфера. Разработанная методика была использована в анализе жидких лекарственных форм крапивы: настоя и жидкого экстракта (см. таблицу 6).

Флавоноиды являются второй группой БАС, обеспечивающих противовоспалительное действие сырья и препаратов ноготков. В ФС. 2.5. 0030.15 ГФ XIII «Ноготков цветки» включена методика фотометрического анализа флавоноидов, этап экстракции в которой длится 3 часа, что неэкономично при проведении серийного анализа. Проведенные исследования по усовершенствованию этой методики позволили сократить время экстракции в 3 раза (см. таблицу 6).

Фотометрический анализ находит также широкое применение в анализе антраценпроизводных. В большинстве видов сырья, содержащего эту группу

соединений, пересчет проводится на истизин – соединение, не присутствующее реально в сырье, а калибровку проводят по раствору шестиводного хлорида кобальта. Была проверена рациональность данной методики на примере коры крушины и предложено ввести показатель «содержание производных антрацена в пересчете на франгуларозид», что соответствует реальному максимуму поглощения солевых форм антрахинонов крушины (526 ± 2 нм). Данные по содержанию антраценпроизводных в коре крушины в пересчете на франгуларозид представлены в таблице 7.

Таблица 7

Содержание антраценпроизводных в коре крушины и противогеморроидальном сборе

($n=5$; $p=0,95$)

Объект исследования	Числовой показатель по действующим веществам и его значение по НД	Аналитическая длина волны образца, нм	Стандартный образец и его максимум поглощения	Полученный результат определения
Кора крушины	Производных антрацена в пересчете на истизин не менее 4,5%	526 ± 2	Франгулин А 524 нм	Производных антрацена в пересчете на франгулин А $8,41\pm 0,04\%$
Сбор противогеморроидальный	Производных антрацена в пересчете на истизин не менее 1,35%	516 ± 2	Глюкофрангулин А 515 нм	Производных антрацена в пересчете на глюкофрангулин А $1,94\pm 0,06\%$

Была рассмотрена возможность спектрофотометрического определения антраценпроизводных в многокомпонентных сборах на примере сбора противогеморроидального, в состав которого входят сенны листья и крушины кора. Анализ спектров окрашенных солей антраценпроизводных противогеморроидального сбора выявил наличие максимума поглощения при 516 ± 2 нм, что близко к максимуму поглощения глюкофрангулина А. При разработке методики определения антраценпроизводных в сборе за основу была взята методика количественного определения коры крушины. Содержание

антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе в пересчете на глюкофрангулин А представлено в таблице 7.

Алгоритм разработки методики спектрофотометрического определения БАС в ЛРС и препаратах

Анализ нормативной документации и научной литературы, а также собственные исследования позволили сформулировать ряд правил, соблюдение которых необходимо при разработке рациональной спектрофотометрической методики с хорошей воспроизводимостью и точностью. Алгоритм разработки спектрофотометрической методики количественного определения фенольных соединений в ЛРС представлен на рисунке 10.

При выборе условий экстракции следует руководствоваться, в первую очередь, химическими свойствами анализируемых соединений. Если в сырье агликоны и гликозиды присутствуют в равных количествах, то для анализа общего содержания БАС рационально проведение химических модификаций на этапе экстракции, например, проведение гидролиза, что реализуется в методиках анализа флавоноидов, антоцианов, антраценпроизводных при проведении фор-экстракции.

Если максимум поглощения анализируемых соединений находится в неспецифической области спектра и сливается с поглощением других соединений, следует применять метод дифференциальной спектрофотометрии, а в кювете сравнения должны присутствовать все соединения, что и в рабочей, за исключением окрашенного комплекса.

В качестве стандартного образца следует выбирать такое соединение, чтобы интервал между максимумом дифференциальной кривой и длинноволновой полосой стандартного образца не превышал полуширины полосы поглощения стандартного образца. Для того чтобы правильно определить стандартный образец и аналитическую длину волны, необходимо анализировать спектр поглощения исследуемых веществ в широком диапазоне длин волн и использовать образцы ЛРС различного происхождения.

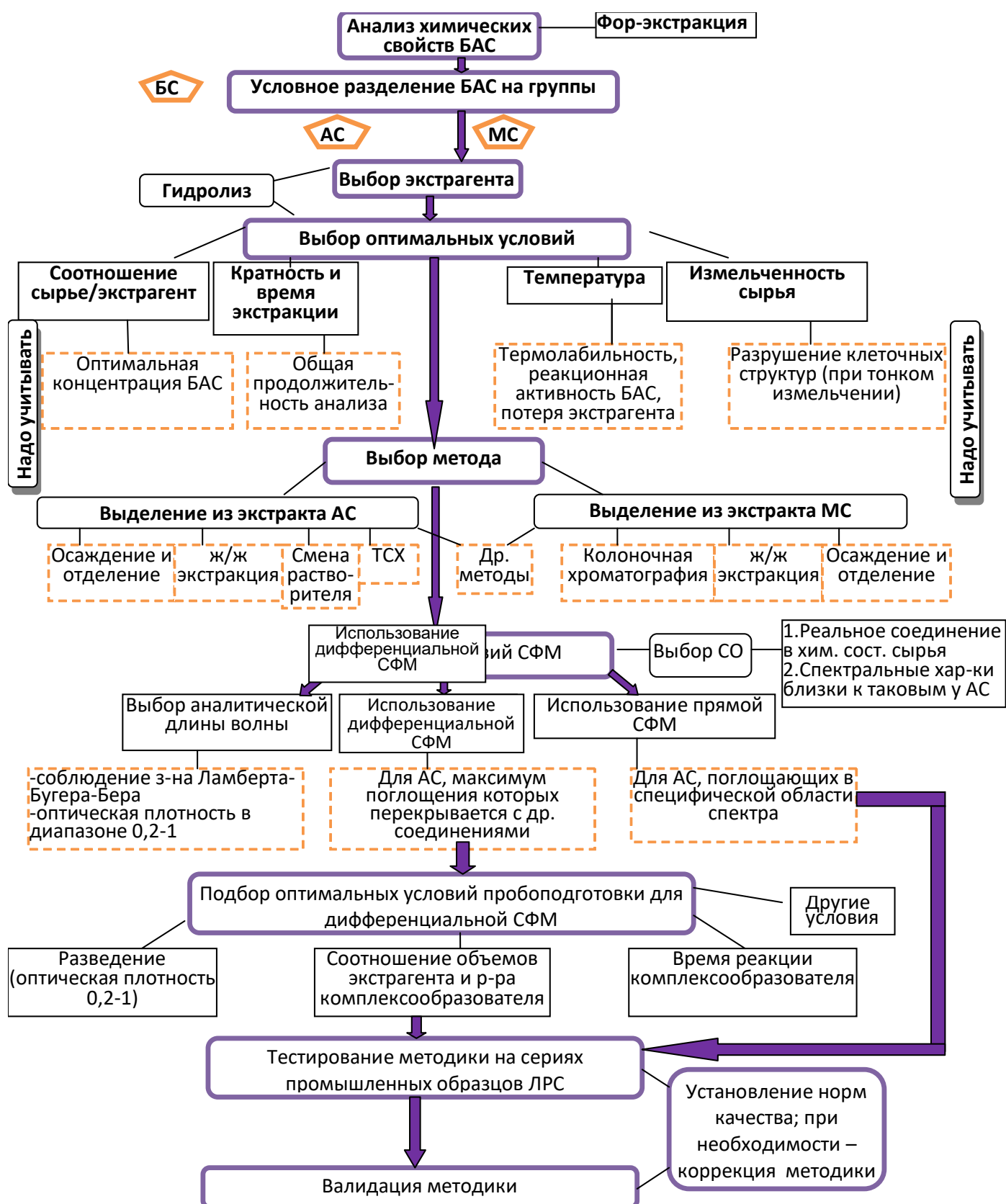


Рисунок 10. Схема алгоритма разработки методики спектрофотометрического определения БАС в ЛРС и растительных препаратах (сокращения: БС – балластные соединения, МС – мешающие соединения, АС – анализируемые соединения, ж/ж – жидкость-жидкостная, ТСХ – тонкослойная хроматография)

Обязательным условием является линейная зависимость между концентрацией стандартного образца и значением оптической плотности (соблюдение закона Бугера–Ламберта–Бера).

При подборе условий пробоподготовки необходимо учитывать факторы, влияющие на переход БАС из ЛРС в экстрагент и на общее время проведения анализа.

Тестирование разработанной методики необходимо проводить на ЛРС и препаратах различных производителей и разных сериях. Заключительным и немаловажным этапом является валидация разработанной методики.

Исследования по влиянию физических факторов на эффективность экстракции фенольных соединений

Любая методика количественного анализа БАС ЛРС подразумевает сначала проведение экстракции. От этого этапа зависит как оптимальность методики, так и ее селективность в отношении аналита. Неправильный подбор условий извлечения БАС может стать причиной заниженного результата ввиду неполной экстракции или разрушения соединений, а недостаточная селективность экстрагента – проблемы с присутствием в экстракте нежелательных «мешающих» соединений. В связи с этим актуальным является поиск новых методов экстракции, обладающих достаточной селективностью и позволяющих выделять БАС в нативном виде.

В настоящее время для этих целей широко используются различные физические факторы. Нами было рассмотрено влияние ультразвука и низковольтного электрического напряжения на экстракцию флавоноидов и дубильных веществ. В качестве экстрагента была выбрана дистиллированная вода, как универсальный растворитель, в качестве объекта исследования – цветки бессмертника. Для изучения влияния ультразвука (УЗ) на эффективность экстракции флавоноидов из цветков бессмертника были поставлены опыты при комнатной температуре (23 °С) с постоянным мониторингом изменения температуры в ходе экстракции и при 0 °С для

анализа влияния термического фактора при экстракции. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в извлечениях из цветков бессмертника, полученных в различных условиях (n=5; p=0,95)

Условия экстракции	Содержание флавоноидов, %	λ_{\max} , нм
с УЗ при комн. t	0,47±0,02	409
без УЗ при комн. T (контроль)	0,33±0,03	409
УЗ при t = 0-4 °С	0,28±0,01	407
без УЗ при t = 0-4 °С (контроль)	0,078±0,003	408

Обнаружено, что термическая составляющая оказывает существенное влияние на переход флавоноидов в экстрагент (извлечение флавоноидов без УЗ при комнатной температуре больше, чем при температуре 0–4 °С: 0,330 % и 0,078 % соответственно). Однако и вклад ультразвуковой составляющей экстракции немало значим, особенно при принудительном охлаждении системы.

При сравнении обзорных спектров УЗ-извлечения при температуре 30 °С и 0–4 °С были отмечены экстремумы при идентичных длинах волн, что свидетельствует об одинаковом качественном составе извлечений. Длины волн, при которых наблюдается максимум поглощения на дифференциальных спектрах, укладываются в интервал 409 ± 2 нм для спектров всех извлечений, что говорит о том, что экстрагируются одни и те же соединения, а претерпеваемые изменения (если таковые вообще имеются) минимальны.

В литературе присутствуют данные об экстракции БАС из растительного сырья под действием высоковольтного напряжения и с применением электрической дуги. Однако эти методы сопряжены с сильным разогревом системы, а их влияние на сохранение нативности БАС не исследовано. Одним из вариантов экстракции без существенного повышения температуры может быть экстракция под действием низковольтного электрического напряжения с применением в качестве экстрагента воды дистиллированной, что обеспечивает минимальное образование тока в экстракционной системе.

Для этого метода было сконструировано экстракционное устройство. Установка состоит из экстракционного сосуда, представляющего собой стеклянный или выполненный из нержавеющей стали цилиндрический сосуд, оснащенный патрубками для подачи и слива экстрагента, в который помещаются сетчатые пластинчатые электроды из нержавеющей стали, имеющие четыре пластиковых зажима для скрепления между собой. Электроды по ширине практически равны диаметру экстракционного сосуда. Соотношение между отверстиями в электроде и его площадью составляет 1:500. Между двумя электродами зажимается навеска измельченного ЛРС, распределенного тонким слоем (1–10 см), помещенная в проницаемую бумажно-волоконистую мембрану, равную по размерам площади электродов.

В экстракционный сосуд заливают дистиллированную воду, полностью покрывая электроды. К внешним контактам электродов подводят напряжение от генератора или стабилизатора, подключенного к сети.

Реакционная система перемешивается мешалкой с целью облегчения процесса диффузии БАС в раствор. Процесс экстракции не сопровождался разогревом раствора. Движущей силой экстракции является «раскачивание» молекул БАС, содержащихся в ЛРС и энергия вращения диполей воды.

Анализ извлечений на содержание дубильных веществ проводился перманганатометрически, а на содержание флавоноидов – методом дифференциальной спектрофотометрии. Полученные данные позволили выявить условия, при которых возможна отдельная экстракция флавоноидов и дубильных веществ из ЛРС. Обнаружено, что флавоноиды и дубильные вещества возможно разделить при воздействии на сырье сначала постоянного напряжения, равного 9 В, а затем переменного напряжения амплитудой 4 В и частотой $3,16 \cdot 10^{-2}$ Гц, предварительно обновив порцию экстрагента. На примере цветков ромашки аптечной и цветков бессмертника песчаного показана возможность отдельной экстракции дубильных веществ и флавоноидов из ЛРС под действием постоянного и переменного напряжения (таблица 9).

Таблица 9

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и дубильных веществ в пересчете на танин в извлечениях, полученных под действием постоянного и переменного напряжения (n=5; p=0,95)

Объект исследования	Содержание БАС, %	Получение экстракта при напряжении		
		постоянном	переменном	без напряж.
Цветки бессмертника	дубильных веществ	1,87±0,03	-	0,25±0,01
	флавоноидов	0,12±0,02	0,82±0,03	0,22±0,01
Цветки ромашки аптечной	дубильных веществ	1,18±0,02	-	0,22±0,01
	флавоноидов	0,03±0,001	0,23±0,02	0,06±0,002

«-» – не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований теоретически обоснована и экспериментально подтверждена эффективность систематического подхода к сквозной стандартизации. Литературные данные и результаты собственных исследований обобщены в виде алгоритма разработки аналитических методик для стандартизации ЛРС, учитывающего состав метаболома растения.

Выводы

1. Проведенные информационно-аналитические исследования выявили ряд существенных недостатков в методиках определения фенольных соединений и органических кислот в лекарственном растительном сырье и растительных препаратах, связанных с тем, что не учитывается влияние сопутствующих соединений. Недостаточно внимания уделяется гармонизации методик анализа в цепочке «лекарственное растительное сырье – препарат». Решением данной проблемы может стать общий алгоритм выбора методики определения биологически активных соединений с учетом влияния состава метаболома растения и принципов «сквозной» стандартизации.

2. Разработаны и валидированы методики потенциометрического определения дубильных веществ в корневищах бадана, корневищах и корнях кровохлебки, плодах черники, соплодиях ольхи, коре дуба, корневищах

лапчатки, корневищах диоскореи ниппонской, траве душицы, траве пустырника, цветках ромашки аптечной, траве мелиссы лекарственной, листьях мяты перечной, листьях шалфея, траве зверобоя, настоях и отварах из этих видов лекарственного растительного сырья и препаратах «Тонзилгон Н», «Стоматофит», «Доппельгерц Нервотоник», настойка пустырника, настойка зверобоя. Показана возможность применения потенциметрического титрования в анализе сырья, содержащем как большие, так и малые количества дубильных веществ. Методики потенциметрического определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье включена в проект ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» для ГФ РФ XIII изд.

3. Разработаны и валидированы методики потенциметрического определения органических кислот в плодах шиповника, плодах рябины, плодах калины, плодах черной смородины, траве душицы, траве мелиссы лекарственной, листьях мяты перечной, листьях шалфея, цветках ромашки аптечной, траве чабреца, цветках бессмертника, витаминных сборах № 1, 2 и настоях из перечисленных видов лекарственного растительного сырья и сборов. Показана возможность применения потенциметрического титрования в анализе сырья, содержащем как большие, так и малые количества органических кислот. Модифицирована методика количественного определения суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в плодах шиповника. Показана возможность ее использования для стандартизации других плодов. Методики потенциметрического определения органических кислот включены в проект ФС «Шиповника плоды» для ГФ РФ XIII изд.

4. Изучена возможность использования титриметрии для количественного определения кальция и магния в лекарственном растительном сырье и жидких лекарственных формах. Разработаны и валидированы методики титриметрического определения кальция и магния в сырье и препаратах

крапивы – жидком экстракте и настое листьев крапивы, жидких экстрактах – левзеи, водяного перца, элеутерококка, препарате «Ротокан».

5. Проведена унификация разработанных методик и составлены компьютерные программы, облегчающие проведение расчетов и прогнозирования результата аналитических методик при рутинном анализе по определению растворимости оксалата кальция в растворах кислоты хлористоводородной и зависимость рН насыщенных растворов от аналитической концентрации кислоты хлористоводородной; по определению состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования; по окислительно-восстановительному титрованию одним окислителем нескольких восстановителей в условиях термодинамического равновесия при $T, P = \text{Const}$.

6. Составлен алгоритм проведения спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в лекарственном растительном сырье, позволяющий избежать ошибок в выборе длины волны и стандартного образца.

7. С использованием предложенного алгоритма и принципа «сквозной» стандартизации разработаны методики определения суммы флавоноидов в цветках и настойке календулы, траве пустырника, настое и настойке пустырника, настое травы чабреца, настойке и жидком экстракте чабреца, цветках и настойке календулы, цветках ромашки, листьях крапивы, настое, настойке гомеопатической матричной крапивы, антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе. Методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в цветках ромашки и антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе включены в нормативную документацию ЗАО «Здоровье».

8. Разработан алгоритм выбора метода анализа и соответствующего параметра стандартизации лекарственного растительного сырья с учетом соединений метаболома растения.

9. Изучено влияние ультразвука, постоянного и переменного напряжения, рН экстрагента на экстракцию дубильных веществ и флавоноидов

из растительного сырья. Выявлено существенное влияние ультразвуковой и термической составляющих на переход флавоноидов из сырья в водное извлечение. Установлены оптимальные частоты для экстракции флавоноидов и дубильных веществ. Показана принципиальная возможность отдельной экстракции флавоноидов и дубильных веществ под действием электрического напряжения. Подобраны параметры, обеспечивающие возможность отдельной экстракции перечисленных групп БАС.

Рекомендации. Показан приоритет использования потенциометрического детектирования конечной точки титрования, и разработанные методики потенциометрического титрования вошли в проекты ФС для включения в ГФ XIII изд. Предложенные алгоритмы могут быть использованы при разработке методик для количественного определения органических кислот (алифатических и фенолкарбоновых), дубильных веществ и флавоноидов при стандартизации ЛРС по этим группам БАС.

Подобранные условия отдельного выделения флавоноидов и дубильных веществ под действием электрического напряжения могут быть рекомендованы для применения на стадии экстракции или очистки в методиках качественного и количественного анализа БАС в ЛРС и в методиках стандартизации ЛРС по содержанию действующих веществ.

Математические модели и разработанные на их основе компьютерные программы рекомендуются для предварительного прогнозирования оптимальных условий проведения количественного определения органических кислот, дубильных веществ и кальция в ЛРС, а также для упрощения расчетов.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Предложенные методологические подходы к разработке методик стандартизации лекарственного растительного сырья с учетом его химического состава и принципа «сквозной» стандартизации могут быть дополнены включением новых методик и расширены данными о влиянии других сопутствующих соединений при установлении количества анализируемых соединений.

Экстракция БАС под действием электрического напряжения и ультразвука может быть изучена в более широком диапазоне частот и, возможно, применена для оптимизации выделения других соединений, например компонентов эфирного масла, антраценпроизводных и др.

Список публикаций

1. Марахова, А.И. Определение флавоноидов травы мелиссы лекарственной / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина // **Фармация.** – 2007. – № 3. – С. 10–11.

2. Федоровский, Н.Н. Потенциметрическое титрование в анализе водных извлечений / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, О.В. Ольшанская // **Фармация.** – 2008. – № 2. – С. 15–16.

3. Марахова, А.И. Физико-химический анализ фенольных соединений лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова // **Фармация.** – 2009. – № 3. – С. 52–55.

4. Коницев, А.С. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки / А.С. Коницев, Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, П.В. Баурин, М.И. Черникова // **Вестник Московского областного университета.** – 2011. – № 3. – С. 49–54.

5. Марахова, А.И. Разработка методик потенциметрического титрования суммы органических кислот и дубильных (окисляемых) веществ в извлечениях из лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, П.В. Баурин, А.А. Сорокина // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2011. – 3/1(35). – С. 69–71.

6. Методологические подходы к использованию спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья [Электронный ресурс] / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, Т.А. Скалозубова [и др.] // **Медицина и образование в Сибири: электронный научный журнал.** – 2011. – № 5. – Режим доступа (http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=526).

7. Морохина, С.Л. Флавоноиды седативного сбора «Мевал» / С.Л. Морохина, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // **Фармация**. – 2011. – № 3. – С. 25–27.
8. Федоровский, Н.Н. Изучение методов повышения эффективности экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья / Н.Н. Федоровский, П.В. Баурин, А.И. Марахова // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2011. – 3/1(35). – С. 75–76.
9. Скалозубова Т.А. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // **Фармация**. – 2012. – № 2. – С. 5–7.
10. Сорокина, А.А. Использование спектрофотометрии в анализе промышленных образцов лекарственного растительного сырья / А.А. Сорокина, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, Т.А. Белоус // **Фармация**. – 2012. – № 4. – С. 43–44.
11. Спектрофотометрия в анализе сборов [Электронный ресурс] / А.И. Марахова, А.С. Аврач, А.А. Сорокина [и др.] // **Медицина и образование в Сибири: электронный научный журнал**. – 2012. – № 2. – Режим доступа: (http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=706).
12. Марахова, А.И. Определение флавоноидов в траве и лекарственных формах тимьяна ползучего / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина, М.Н. Галько // **Фармация**. – 2013. – № 5. – С. 14–17.
13. Марахова, А.И. Потенциометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / А.И. Марахова // **Фармация**. – 2013. – № 3. – С. 53–55.
14. Марахова, А.И. Разработка методики потенциометрического определения суммы органических кислот в плодах шиповника / А.И. Марахова, О.А. Супакова, Н.Н. Федоровский, Е. В. Сергунова, А.А. Сорокина // **Фармация**. – 2013. – № 1. – С. 24–27.
15. Сергунова, Е.В. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях /

Е.В. Сергунова, А.И. Марахова, А.С. Аврач // **Фармация.** – 2013. – № 4. – С. 8–11.

16. Сорокина, А.А. Определение кальция и магния в листьях и настое крапивы двудомной / А.А. Сорокина, Т.А. Скалзубова, А.И. Марахова // **Фармация.** – 2013. – № 2. – С. 5–8.

17. Марахова, А.И. Преимущества потенциометрического анализа лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский, Е.В. Сергунова // **Известия Академии наук. Серия химическая.** – 2014. – № 5. – С. 1251–1254.

18. Сорокина, А.А. Потенциометрия как метод контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества, и препаратов на его основе / А.А. Сорокина, А.И. Марахова // **Фармация.** – 2014. – № 2. – С. 49–53.

19. Сорокина, А.А. Содержание дубильных веществ в двух видах диоскореи / А.А. Сорокина, Бу Вэй, А.И. Марахова // **Фармация.** – 2014. – № 1. – С. 14–16.

20. Федоровский, Н.Н. Новый метод отдельной холодной водной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // **Известия Академии наук. Серия химическая.** – 2014. – № 5. – С. 1235–1237.

21. Марахова, А.И. Методологические аспекты разработки методик количественного анализа при стандартизации лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова // **Успехи современного естествознания.** – 2015. – № 11. – С. 58–61.

22. Марахова, А.И. Теоретические и экспериментальные подходы к разработке спектрофотометрических методик анализа фенольных соединений в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе / А.И. Марахова // **Известия Академии наук. Серия химическая.** – 2015. – № 6. – С. 1267–1272.

23. Жилкина, В.Ю. Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в сборе витаминном / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016. – № 1 (14). – С. 156–159.

24. Марахова, А.И. Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в сборе витаминном / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Я.М. Станишевский // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016. – № 1 (14). – С. 156–159.

25. Лисовская, С. Б. Изучение флавоноидного состава водного извлечения травы мелиссы лекарственной методом ВЭЖХ / С.Б. Лисовская, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина // «Современные вопросы теории и практики лекарствоведения»: тез. докл. – Ярославль, 2007. – С. 191–193.

26. Марахова, А.И. Изучение флавоноидного состава травы мелиссы лекарственной и ее водных извлечений / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский, В.М. Печенников // Тезисы итоговой студенческой конференции с международным участием «Татьянин день». – М., 2008. – С. 37–38.

27. Федоровский, Н.Н. Разработка методики определения содержания в водном извлечении сырья мелиссы лекарственной соединений, содержащих фенольные гидроксилы / Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина, С.Б. Лисовская, О.В. Ольшанская, А.И. Марахова // Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск, 2008. – Вып. 63. – С. 351–353.

28. Марахова, А.И. Исследование по определению содержания суммы органических кислот в настоях лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова, А.В. Кузнецов, Н.Н. Федоровский // Тезисы докладов межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых «Фармация в 21 веке: эстафета поколений». – СПб., 2009. – С. 33.

29. Баурин, П.В. Изучение процесса извлечения биологически активных веществ из растений семейства яснотковых / П.В. Баурин, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский // Сборник материалов II Международной научно – практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии». – М., 2010. – С. 60–61.

30. Лисовская, С.Б. Определение соединений, содержащих свободные фенольные гидроксилы в лекарственном растительном сырье и БАД на растительной основе / С.Б. Лисовская, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский // Человек и лекарство: материалы конференции «Стратегия развития российской фармации» в рамках XVII Российского национального конгресса. – М., 2010. – С. 666.

31. Скалозубова, Т.А. Титриметрический метод определения биологически активных веществ листьев и настоя крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Прикладная аналитическая химия. – 2010. – № 1 (1). – Т. 1. – С. 35–37.

32. Марахова, А.И. Изучение зависимости эффективности экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья от pH / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина, П.В. Баурин // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты». – Самара, 2011. – С. 135–136.

33. Марахова, А.И. Количественное определение суммы флавоноидов в успокоительном сборе и его компонентах / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Сборник научных трудов научно-методической конференции «Гаммермановские чтения – 2011». – СПб., 2011. – С. 42–44.

34. Марахова, А.И. Теоретические и экспериментальные подходы к разработке методики пробоподготовки для ВЭЖХ – определения флавоноидов в настоях / А.И. Марахова, С.Б. Лисовская, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Развитие гомеопатического метода в современной медицине: тезисы докладов XXI Московской международной гомеопатической конференции. – М., 2011. – С. 176–178.

35. Скалозубова, Т.А. Изучение фенольных соединений листьев крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Прикладная аналитическая химия. – 2011. – Т. 2. – № 3 (5). – С.20–23.

36. Скалозубова, Т.А. Количественное определение кальция и магния в листьях и настоях крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Вып. 66. – Пятигорск, 2011. – С. 178–179.

37. Скалозубова, Т.А. Содержание суммы флавоноидов в настое и листьях крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Развитие гомеопатического метода в современной медицине: тезисы докладов XXI Московской международной гомеопатической конференции. – М., 2011. – С. 196–198.

38. Федоровский, Н.Н. Разработка методик количественного и качественного определения простых фенолов в листьях толокнянки обыкновенной / Н.Н. Федоровский, Т.Ю. Ковалева, А.И. Марахова [и др.] // Фармацевтические технологии: сборник трудов научной конференции Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2011. – С. 388–393.

39. Федоровский, Н.Н. Теоретическая и экспериментальная разработка методик определения органических кислот в растворах и настоях из лекарственного растительного сырья / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Прикладная аналитическая химия. – 2011. – Т. 2. – № 4 (6). – С. 10–15.

40. Федоровский, Н.Н. Изучение влияния ультразвукового воздействия на эффективность экстракции флавоноидов бессмертника / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.С. Коничев, П.В. Баурин, А.А. Сорокина // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы науки фармацевтических ВУЗов: от разработки до коммерциализации». – Пермь, 2011. – С. 250–253.

41. Коничев, А.С. Разработка методики определения содержания флавоноидов в цветках бессмертника / А.С. Коничев, П.В. Баурин, Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, Л.М. Якубович // Сборник материалов конгресса «Человек и лекарство»: тез. докл. – М., 2012. – С. 390–391.

42. Скалозубова, Т.А. Проблемы спектрофотометрического анализа флавоноидов в водных извлечениях / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, С.Л. Морохина // Гомеопатический ежегодник. – М., 2012 – С. 229–231.

43. Сорокина, А.А. Спектрофотометрическое определение содержания суммы флавоноидов в пересчете нарутин в настое цветков бессмертника / А.А. Сорокина, А.И. Марахова, А.С. Коничев, П.В. Баурин, Н.Н. Федоровский // Сборник материалов конгресса «Человек и лекарство»: тез. докл. – М., 2012. – С. 424–425.

44. Баурин, П.В. Разработка метода холодной водной экстракции дубильных веществ и других БАВ из лекарственного растительного сырья / П.В. Баурин, А.А. Коничев, Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова // Первая Российская конференция по медицинской химии с международным участием: тез. докл. – М., 2013. – С. 201.

45. Галько М.Н. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца / М.Н. Галько, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Сеченовский вестник. – 2013. – № 1 (11). – С. 71–72.

46. Марахова, А.И. Фракционное выделение фенольных соединений из лекарственного растительного сырья под действием электрического напряжения / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.С. Коничев, П.В. Баурин, А.А. Сорокина // Материалы науч. конференции «Фармобразование-2013». – Воронеж, 2013. – С. 404–407.

47. Скалозубова, Т.А. Изучение гомеопатических лекарственных форм крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина //

Материалы науч. конференции «Фармообразование-2013». – Воронеж, 2013. – С. 504–506.

48. Marakhova, A.I. Extraction of biologically active compounds from medicinal vegetative raw material under action of electric voltage / A.I. Marakhova, N.N. Fedorovsky, A.A. Sorokina // Materials of the V International conference “Science4health”. – Moscow-Budapest. – 2013. – P. 153.

49. Марахова, А.И. Инновационный способ экстракции природных биологически активных соединений / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, И.А. Самылина, Я.М. Станишевский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 4 (9). – С. 54–57.

50. Марахова, А.И. Разработка и валидация методики потенциометрического определения суммы дубильных веществ в траве зверобоя / А.И. Марахова, Я.М. Станишевский, В. И. Потапов, А.А. Сорокина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 3 (8). – С. 138–141.

51. Марахова, А.И. Инновационный способ получения стандартных образцов растительных биологически активных веществ / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, И.А. Самылина, Н.Н. Федоровский // Сеченовский вестник. – 2014. – № 1 (15). – С. 107–108.

52. Марахова, А.И. Потенциметрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: **монография** / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, А.В. Кузнецов, Я.М. Станишевский. – М.: РУДН, 2015. – 132 с.

53. Марахова, А.И. Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в цветках ноготков и настойке календулы / А.И. Марахова, Я.М. Станишевский, А.А. Сорокина, Д.Б. Швитко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 2 (11). – С. 172–175.

54. Сорокина, А.А. Фотометрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: **монография** / А.А. Сорокина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский, Т.Ю. Ковалева. – М.: РУДН, 2015. – 155 с.

55. Marakhova, A.I. Theoretical and experimental approaches to the development of spectrophotometric methods of analysis of phenolic compounds in herbal raw material and preparations based on it / A.I. Marakhova, E.V. Sergunova, A.A. Sorokina // International journal of applied and fundamental research: электронный научный журнал. – 2015. – № 1. – URL: <http://www.science-sd.com/460-24763>.

Патенты

1. Патент РФ № 2466387 на изобретение «Способ количественного определения кальция и магния в лекарственном растительном сырье» / Марахова А.И., Скалозубова Т.А., Самылина И.А., Сорокина А.А., Федоровский Н.Н. – *G01N31/16*. Бюл. № 31 от 10.11.2011. – 6 с.

2. Патент РФ № 142485 на полезную модель «Установка для холодной водной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья» / Марахова А.И., Федоровский Н.Н., Сорокина А.А., Самылина И.А. – *B01D11/00*. – Бюл. № 18 от 27.06.2014. – 2 с.

3. Патент РФ № 2522227 на изобретение «Способ отдельного выделения дубильных веществ и флавоноидов из лекарственного растительного сырья» / Марахова А.И., Федоровский Н.Н., Самылина И.А., Сорокина А.А., Баурин П. В. – *A61K36/00; B01D11/02*. – Бюл. № 19 от 10.07.2014. – 5 с.

4. Патент РФ № 2466387 на изобретение «Способ количественного определения кальция в жидких экстрактах из лекарственного растительного сырья» / Марахова А.И., Скалозубова Т.А., Самылина И.А., Сорокина А.А., Федоровский Н.Н. – *G01N33/15*. – Бюл. № 31 от 27.08.2013. – 6 с.

5. Патент РФ № 2453322 на изобретение «Способ холодной водной экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья» / Федоровский Н.Н., Марахова А.И., Сорокина А.А. – *A61K36/00; B01D11/02*. Бюл. № 17 от 20.06.2012. – 5 с.