

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

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант
доктор фармацевтических наук, профессор
А.А. Сорокина

Москва
2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И МЕТОДЫ ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ.....	18
1.1.1. Физические и химические свойства фенольных соединений.....	18
1.1.2. Спектрофотометрия в анализе отдельных классов природных фенольных соединений.....	26
1.1.2.1. Фотометрический анализ фенолкарбоновых кислот и флавоноидов.....	27
1.1.2.2. Фотометрический анализ антраценпроизводных.....	39
1.1.2.3. Фотометрический анализ дубильных веществ.....	41
1.1.3. Титриметрические методы анализа биологически активных соединений.....	42
1.1.4. Другие физико-химические методы, используемые в анализе фенольных соединений.....	46
1.2. МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	49
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 1.....	56
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	57
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
ГЛАВА 3. ТИТРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	61
3.1. Применение потенциометрии для количественного определения дубильных веществ.....	63
3.1.1. Потенциометрическое титрование в анализе лекарственного растительного сырья с высоким содержанием дубильных веществ....	63
3.1.2. Потенциометрическое титрование в анализе лекарственного растительного сырья с низким содержанием дубильных веществ.....	79
3.1.3. Потенциометрическое определение дубильных веществ в отварах из лекарственного растительного сырья.....	86
3.1.4. Потенциометрическое определение дубильных веществ в настоях из лекарственного растительного сырья.....	90
3.1.5. Потенциометрическое определение дубильных веществ в лекарственных растительных препаратах.....	94
3.1.6. Математическая модель окислительно-восстановительного титрования одним окислителем нескольких восстановителей в условиях термодинамического равновесия при $T, P = \text{Const}$	100

3.2 Применение потенциометрии для количественного определения органических кислот.....	105
3.2.1. Потенциометрическое определение органических кислот в лекарственном растительном сырье.....	107
3.2.2. Потенциометрическое определение органических кислот в настоях из лекарственного растительного сырья.....	116
3.2.3. Потенциометрическое определение органических кислот в витаминных сборах.....	120
3.2.4. Математическая модель по определению состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования.....	123
3.3. Использование титриметрии в анализе элементного состава лекарственного растительного сырья и растительных препаратов.....	129
3.3.1. Разработка методики титриметрического определения кальция и магния в лекарственном растительном сырье.....	129
3.3.2. Математическая модель «Определение растворимости оксалата кальция в растворах кислоты хлористоводородной и зависимость рН насыщенных растворов от аналитической концентрации кислоты хлористоводородной».....	143
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 3.....	147
Глава 4. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	149
4.1. Применение спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.....	149
4.1.1. Спектрофотометрические характеристики стандартных образцов некоторых флавоноидов.....	150
4.1.2. Определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника и настое.....	157
4.1.3. Определение суммы флавоноидов в траве пустырника и препаратах.....	164
4.1.4. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в траве чабреца и препаратах.....	172
4.1.5. Определение суммы флавоноидов в траве зверобоя и препаратах	181
4.1.6. Определение суммы флавоноидов в цветках ромашки аптечной..	187
4.1.7. Определение суммы флавоноидов в листьях крапивы и препаратах.....	190
4.1.8. Определение суммы флавоноидов в цветках ноготков и препаратах.....	197
4.2. Спектрофотометрия в анализе антраценпроизводных.....	203
4.2.1. Определение антраценпроизводных в коре крушины.....	206
4.2.2. Определение антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе.....	208
4.3. Методологические аспекты разработки методики	

спектрофотометрического определения биологически активных соединений в лекарственном растительном сырье и препаратах.....	211
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 4.....	219
ГЛАВА 5. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С УЧЕТОМ ЕГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И ПРИНЦИПА «СКВОЗНОЙ» СТАНДАРТИЗАЦИИ.....	220
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 5.....	229
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭКСТРАКЦИЮ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ	233
6.1. Изучение влияния ультразвука на эффективность экстракции флавоноидов.....	233
6.1.1. Изучение влияния УЗ на эффективность экстракции флавоноидов из цветков бессмертника при комнатной температуре....	233
6.1.2 Изучение влияния УЗ на эффективность экстракции флавоноидов из цветков бессмертника при температуре 0-4°С.....	237
6.2.Изучение влияния электрического поля на экстракцию флавоноидов и дубильных веществ.....	241
6.2.1.Изучение влияния электрического поля на экстракцию флавоноидов.....	241
6.2.2.Изучение влияния электрического поля на экстракцию дубильных веществ.....	248
6.2.3. Использование электрического поля для отдельной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья.....	251
6.3. Исследования по влиянию значения рН экстрагента на эффективность экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья.....	253
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 6.....	259
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	262
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	264
ЛИТЕРАТУРА.....	266
Список сокращений	304
ПРИЛОЖЕНИЕ. Акты внедрения результатов работы.....	305

ВВЕДЕНИЕ

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, учитывающие 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 мелиссы 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, гидролизуемых) 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 pH, 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.B. 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 потенциметрического титрования при определении дубильных веществ и органических кислот в сырье и жидких лекарственных формах.
2. Результаты использования титриметрии и прямой потенциметрии 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 потенциметрического титрования при определении дубильных веществ и органических кислот в сырье и жидких лекарственных формах.
6. Результаты использования титриметрии и прямой потенциметрии 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 г.; V Международной научной конференции SCIENCE4HEALTH, Москва, 2013; 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-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 потенциометрического 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 потенциометрического 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 потенциометрического 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 источника, 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И МЕТОДЫ ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

1.1.1. Физические и химические свойства фенольных соединений

Некоторые физические свойства фенольных соединений можно использовать для их выделения и обнаружения. Фенольные соединения, если они не представлены полностью простыми или сложными эфирами или гликозидами, обычно растворяются в полярных растворителях. Большинство из них растворимы в растворах натрия гидроксида или натрия карбоната, некоторые – в растворе натрия бикарбоната. Эти соединения хорошо растворимы в спирте бутиловом и спирте метиловом. Большинство гликозидов хорошо растворимы в воде, в то время как их агликаны, как правило, не растворимы. Фенолы с небольшим числом гидроксильных групп растворяются в бензоле, хлороформе, эфире и этилацетате [7,24,30,44,56].

Измерение поглощения в ультрафиолетовой области спектра является важным методом для качественной и, в некоторых случаях, количественной характеристики фенольных соединений. Спектры можно использовать для установления различий между отдельными группами фенолов, дифференциации внутри одной группы. Положение максимумов часто указывают на число фенольных гидроксиллов в молекуле. Этерификация или гликозидирование гидроксиллов приводит к изменению спектра поглощения [44, 251,298,301].

Фенолы являются слабыми кислотами, однако наблюдаются значительные отклонения от этого правила, связанные с индуктивным, мезомерным, а иногда с пространственным влиянием заместителей. Например, фенолы с одной карбонильной группой обычно растворяются в водном растворе натрия карбоната. При наличии двух карбонильных заместителей кислотность возрастает. Установлено, что в ряду флавонов

кислотность гидроксильных групп изменяется в следующем порядке:
 $7 > 4' > 3' > 3$ [251].

Различия в кислотности фенольных соединений положены в основу ряда методов разделения их смесей [251,278,294].

Все фенолы при отсутствии пространственных затруднений способны к образованию водородных связей по системе $O-H \cdots O$. При этом водородные связи могут быть как внутримолекулярными, так и межмолекулярными. Наличие водородных связей влияет на многие физические свойства, такие как температура кипения и плавления, растворимость, характер ультрафиолетового и инфракрасного спектров и др. Некоторые из этих свойств лежат в основе очистки или качественного анализа. Полифенольные флавоноидные и хиноидные соединения, например, плавятся при высокой температуре и не растворяются в обычных растворителях, что приводит к невозможности получения спектров их растворов [248]. Простые фенолы растворяются в воде, но их растворимость снижается с усложнением молекул, причем возрастание числа фенольных гидроксильных групп не компенсирует это явление, поскольку при максимальном числе водородных связей повышается тенденция к образованию структуры с прочной кристаллической решёткой [262].

При очистке фенолов наличие водородных связей оказывает отрицательное влияние вследствие их резко выраженной тенденции к образованию плоских гексагональных структур, состоящих из шести фенольных гидроксильных групп, связанных друг с другом водородными связями. Эти структуры в свою очередь могут служить дном больших полостей внутри кристалла, стенки которых образованы ароматическими кольцами и другими составляющими фенольной молекулы. Наличием таких молекулярных клеток объясняется тенденция фенолов к образованию соединений включения, среди которых наиболее известны клатраты гидрохинона [263,265].

Реакционная способность фенольных гидроксильных групп снижается при образовании внутримолекулярных водородных связей или полностью подавляется [298].

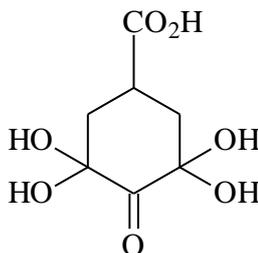
На прочность водородной связи влияет не только размер хелатного кольца, но и размер кольца, содержащего карбонильную группу. Локализация карбонильной группы в пятичленном кольце увеличивает расстояние O-H·····O по сравнению с таковой в шестичленном кольце. Следовательно, в первом случае энергия связи меньше, по сравнению со вторым. В периксикарбонильных соединениях, в которых карбонильная группа входит в семичленное кольцо, внутримолекулярная связь прочная [273].

Другим важным свойством фенольных соединений является тенденция к образованию сложных эфиров. Межмолекулярной конденсации подвержены галловая и орселлиновая кислоты, в то время как оксикоричные кислоты подвергаются внутримолекулярной конденсации [273,328].

Фенольные соединения легко вступают в реакции окисления, которые можно условно разделить на окисление одноэлектронными окисляющими агентами, а также дегидрирование и другие виды окисления с введением кислорода в молекулу окисляемого соединения [253,264]. Одноэлектронными окисляющими агентами могут выступать свинец ацетат, железа (III) хлорид, серебра нитрат, феррицианид, свободные радикалы и др. Этот вид окисления приводит к образованию феноксильных радикалов, которые могут димеризоваться или вступать в реакции с другими радикалами, образуя новые связи C-C, C-O или O-O [237,249]. По мере увеличения гидроксильных групп фенольные соединения становятся все более чувствительными к окислению и к реакциям с разрывом кольца [235].

Для фенольных соединений установлено явление таутомерии. Таутомерная форма галловой кислоты в водном растворе не встречается в связи с тем, что подобно другим 1,2,3-трионам она гидратирована, и связь с двумя молекулами воды стабилизирует кетоформу. Перевод обратно в

галловую кислоту может быть осуществлен добавлением натрия ацетата [256,262].



кетформа галловой кислоты

Многие фенольные соединения способны образовывать комплексы с солями металлов, что часто используется в качественном и количественном анализе. Натриевые соли фенолов растворяются в воде с образованием фенолят-ионов. Это превращение характеризуется батохромным сдвигом максимума поглощения в ультрафиолетовой области. Величина батохромного сдвига зависит от числа гидроксильных групп и степени сопряжения в молекуле фенола. Все флаваны сильно поглощают при длине волны около 280 нм. Флаваноны и изофлавоны имеют также полосу поглощения в длинноволновой области (свыше 300 нм), которая значительно менее интенсивна, чем полоса 260-280 нм. Более сопряженные флавоноиды (флавоны и флавонолы) имеют сильные полосы поглощения как при 250-270 нм, так и при 340-380 нм [322,323] (табл.1).

Таблица 1. Спектральные характеристики некоторых классов фенольных соединений [цит. 7, 24, 31, 40, 44, 81, 86, 159, 217, 241, 251, 257, 280, 301, 319]

Класс соединений	Интенсивные максимумы поглощения	Величина сдвига максимумов при добавлении реагента
Производные бензола, его гомологии др. ароматические соединения -производные моно-, ди-, триоксибензолов -производные нафтолов	270-280 нм 320-330 нм	щелочь; +10-15 нм
Фенолоспирты	270-285 нм 220-230 нм	щелочь; +10-15 нм
Сложные эфиры фенолокислот	312-314 нм 330-335 нм	щелочь; +50-65 нм
Кумарины	310-330 нм 220-230 нм	-
Хромоны	310-330 нм 250 нм	-
Эллаговые кислоты	366 нм 255 нм	натрия ацетат; -11 нм
Флавоны	320-350 нм 240-270 нм	алюминия хлорид; +35-50 нм
Флавонолы	340-380 нм 240-270 нм (3'4'-гидроксилированные имеют два максимума)	алюминия хлорид; +60 нм
Изофлавоны	250-275 нм	алюминия хлорид; +11-14 нм (при наличии свободного гидроксила в 5 положении)
Флаваноны	275-290 нм	алюминия хлорид; +20-30 нм
Халконы	340-390 нм	-
Ауроны	380-430 нм	-
Фенолкарбоновые кислоты -оксибензойные кислоты -пара-замещенные оксибензойные кислоты -оксикоричные кислоты	300-310 нм 255-295 нм 310-325 нм	- щелочь; +20-60 нм щелочь; +0-10 нм
Оксихиноны -производные бензохинона -нафтахиноны	260-280 нм 375-410 нм 2 полосы ниже 300 нм 330-340 нм	 щелочь; батохромный сдвиг

-антрахиноны	400 нм 215-300 нм (3 полосы) 330-340 нм 400 нм (оксиантрахиноны) 530 нм (гексаантрахиноны)	
--------------	--	--

Флавоноиды содержат в своих молекулах группы: $C=O$, $-OH$, $C=C$, а также α и γ - пироновый и хиноидный циклы. Присутствие в молекулах отмеченных групп, а также в некоторых случаях наличие остатков сахаров, обуславливает проявление этими соединениями общих физико-химических свойств таких как: слабо выраженных кислотных свойств, способности вступать в реакции комплексообразования, окисления, восстановления, присоединения, сочетания, замещения, люминесцировать и поглощать излучение при различных длинах волн [71,72,81].

Флавоноиды в растениях обычно представлены гликозидами, метиловыми эфирами, комплексами с солями металлов. Присутствие сахаров в молекуле несколько повышает их растворимость в клеточном соке. На растворимость часто влияет наличие ПАВ (например, сапонинов) в клеточном соке. Сахаристая часть молекулы чаще представлена гексозами (D-глюкозой, D-галактозой), реже — пентозами (L-рамнозой, L-арабинозой, D-ксилозой). Флавоновые гликозиды часто являются биозидами, димонозидами и триозидами или биозидо-монозидами. Иногда остатки сахаров находятся в разных положениях (например, у кампферол-3-рамно-4'-арабинозида) [234]. Кроме обычных флавоноидных O-гликозидов, обнаружены C-гликозиды (гликофлавоноиды), у которых углеводный компонент связан с агликоном углеродной связью (например, витексин, ориентин). Иногда в составе флавоновых гликозидов присутствуют ацилированные соединения. Сахаристая часть у флавонолов обычно присоединяется в положениях 3, 7 и/или 4'. Сахара обычно соединены с агликонами (β -, иногда α – связью) [45,71].

Все флавоноидные соединения в разной степени подвержены процессу окисления. Метод циклической вольтамперометрии широко используется для количественной характеристики этого процесса [14,289]. Он позволяет определить величину окислительно-восстановительного потенциала соединения (ОВП). Меньшее значение данной величины обуславливает более высокую склонность к окислению.

Вольтамперограммы флавоноидов чаще всего представляют собой сложные кривые, содержащие несколько пиков различного типа. Количество пиков на вольтамперограммах соответствует числу электроактивных центров в структуре соединения. Эти центры являются донорами или акцепторами электронов. У флавоноидов электроактивные центры представлены в первую очередь гидроксильными группами. Склонность флавоноида к окислению прямо пропорциональна числу свободных гидроксильных групп в составе соединения. Помимо этого, на ОВ свойства флавоноида существенное влияние оказывает присутствие карбонильной группы и ненасыщенных связей [37,58].

Степень ионизации гидроксильных группировок флавоноида является важным параметром, влияющим на окисление [236]. В щелочных средах, где флавоноиды находятся преимущественно в ионизированной форме, повышается их неустойчивость и подверженность окислению. Также необходимо отметить влияние и других факторов, изменяющих показатели констант диссоциации флавоноидов на их реакционную способность [236,241].

Электрохимические свойства флавоноидов существенно зависят от их структуры, что показано на примере изомерных соединений кверцетина и морины (3,5,7,2',4'-пентагидроксифлавоноид). Кверцетин и другие представители подкласса флавонолов, считаются наиболее склонными к окислению, что объясняется присутствием ненасыщенной двойной связи в С2-С3 положении. Окисление кверцетина протекает по каскадному механизму. Сначала происходит окисление катехольной группировки в кольце В (пик 1), затем

происходит окисление гидроксильной группы в кольце С (пик 2). Второй пик характеризуется небольшой амплитудой силы тока, что связано с образованием внутримолекулярных водородных связей с С4 карбонильной группой. По выраженности пиков можно судить о наибольшей склонности к окислению гидроксильных групп кольца В [251, 315,314].

Образование внутримолекулярной водородной связи между 4-карбонильной и 5-гидроксильной группами в молекуле флавоноида, снижает кислотность указанной гидроксильной группы и затрудняет отрыв электрона [14,236,241,298].

На примере таксифолина (3,3',4',5,7-пентагидроксифлаванон) показана зависимость окислительных свойств флавоноидов от значения величины рН. Вольтамперограмма данного флавоноида имеет два пика: один пик при + 0,2 В - обратимый и второй, пик при + 0,9 В - необратимый. Этот факт свидетельствует о наличие двух центров окисления в структуре флавоноида. При подщелачивании раствора происходит существенное увеличение высоты первого пика, в то время как высота второго пика меняется незначительно. Из этого можно заключить, что гидроксильные группы, расположенные в кольце В имеют более высокую склонность к ионизации и окислению [232, 235,236,241,292].

Катехины легко окисляются при нагревании и на свету. Окисление катехинов особенно быстро протекает в щелочной среде, а также при действии окислительных ферментов [246,247,254,265].

Гликозиды антраценпроизводных хорошо растворяются в воде, разбавленных спиртах и плохо или совсем не растворяются в органических растворителях [273]. Агликоны не растворяются в воде, но хорошо растворимы в эфире, хлороформе и других органических растворителях. Особенно легко они растворяются в щелочах, ледяной кислоте уксусной, как и их гликозиды [56].

Характерным свойством всех антраценпроизводных является устойчивость их ядер [45]. Различается отношение антраценпроизводных к

щелочам. Так, например, антрахиноны с гидроксо-группами в α -положении, реагируют только с гидроксидами щелочей, образуя феноляты. Эти соединения менее реакционно способны, чем содержащие гидроксигруппу в β -положении в виду образования α -гидроксилами внутримолекулярной водородной связи с карбонильной группой [262].

Фенольные гидроксилы обуславливают наличие у антраценпроизводных свойств, характерных для фенолов. Реакционная способность фенольных гидроксидов различается в зависимости от их положения в молекуле. Внутримолекулярная водородная связь между фенольными гидроксидами в 1 и 8 положениях с атомом кислорода оксо- ($>C=O$) группы делает их менее реакционно способными. Антраценпроизводные, имеющие $-OH$ группы только в 1 и 8 α -положениях образуют феноляты исключительно с растворами едких щелочей ($NaOH$, KOH). Антраценпроизводные, содержащие $-OH$ группу в 3,6,7 β -положении, образуют феноляты с растворами карбонатов щелочных металлов, аммиака, едких щелочей [46].

Образование солей с растворами едких щелочей, аммиака, карбонатов и гидрокарбонатов щелочных металлов характерно для антраценпроизводных, имеющих в своем составе карбоксильную группу [56].

1.1.2. Спектрофотометрия в анализе отдельных классов природных фенольных соединений

Обзор отечественных публикаций, посвященных применению абсорбционной оптической спектрофотометрии (АОС) в фармации за последние десять лет, показал, что этот метод находит широкое применение в фармацевтическом анализе. Используемые в фармации методы АОС условно можно разделить на три основных прикладных направления: 1) количественное определение и установление подлинности лекарственных препаратов, 2) стандартизация и оценка качества лекарственного сырья, 3) совершенствование способов обработки и представления спектрофотометрических данных для повышения

их информативности. Перспективно применение в фармации производной спектрофотометрии для повышения спектрального разрешения [54].

При анализе лекарственного растительного сырья чаще всего требуется определить не индивидуальные компоненты, а сумму веществ, оказывающих фармакологическое действие, так как большинство препаратов являются суммарными [171]. Проводят либо непосредственное фотометрирование суммы веществ после очистки, либо получают окрашенные комплексы с реактивами, обладающими определенной селективностью для БАС данного сырья (дифференциальный метод). Пересчет суммы веществ проводят по стандартному образцу. Вещество может выступать в качестве стандартного образца, если интервал между максимумом дифференциальной кривой и полосой поглощения стандартного образца в длинноволновой области не превышает полуширины полосы поглощения стандартного образца [38,149,156]. Чаще всего спектрофотометрический метод применяется в анализе природных фенольных соединений [18,31,33,34,35,40,46,54,63-65 и др.], что связано с их физическими и химическими свойствами.

1.1.2.1. Фотометрический анализ фенолкарбоновых кислот и флавоноидов

В анализе фенолкарбоновых кислот важное значение имеет состав ЛРС, доминирование этой группы соединений, степень окрашенности извлечения. Особую роль играет присутствие в сырье флавоноидов, как мешающих соединений при проведении прямого спектрофотометрического анализа [44,96,97]. Максимумы поглощения некоторых фенолкарбоновых кислот представлены в табл. 2.

Таблица 2. Спектральные характеристики некоторых фенолкарбоновых кислот [цит. 22, 24, 40, 72, 143, 262, 273]

Фенолкарбоновая кислота	Брутто-формула	Длины волн, соответствующие максимумам поглощения, нм
Ванилиновая	$C_8H_8O_4$	260,290пл
Протокатеховая	$C_7H_6O_4$	217, 258, 295пл
<i>n</i> -оксибензойная	$C_7H_6O_3$	255
Сиреневая	$C_9H_{11}O_4$	219,272
Феруловая	$C_{10}H_{10}O_4$	242, 300пл, 328
Кофейная	$C_9H_8O_4$	245,290пл, 330
Синаповая	$C_{11}H_{12}O_5$	235, 260, 300
Хлорогеновая	$C_{16}H_6O_3$	245, 300пл, 326
Коричная	$C_9H_8O_2$	275

Примечание: «пл» - «плечо» спектра

В анализе фенолкарбоновых кислот возникают те же проблемы, что и при анализе флавоноидов в тех видах ЛРС, где обе указанные группы БАС присутствуют совместно в значимых количествах. В этом случае целесообразным является переводение фенолкарбоновых кислот в гидрофобные соединения, которые значительно эффективнее экстрагируются и сорбируются из растворов. Кроме того, предварительное переводение фенолкарбоновых кислот в производные, интенсивно поглощающие свет, позволяет существенно повысить чувствительность их фотометрического определения [273].

Прямая спектрофотометрия в таких случаях дает завышенные результаты. Для получения более точных результатов возможно использование экстракционно-спектрофотометрической методики. Она заключается в подборе такого значения рН водного слоя, при котором экстракция становится селективной по отношению к флавоноидам или фенолкарбоновым кислотам. Это достигается за счет того, что одна группа соединений в данных условиях находится преимущественно в протонированной форме, лучше растворимой в органическом экстрагенте, а вторая – в виде солей, лучше растворимых в воде. В табл. 3 приведены константы кислотности и коэффициенты распределения некоторых

фенолкарбоновых кислот между органической и водной фазами, которые находятся в пределах от 1,1 до 2,4. Для соединений флавоноидной природы, таких как 5-гидроксифлавоон, 7-гидроксифлавоон, 3-гидроксифлавоон, 3-метоксифлавоон, 4'-гидроксифлавоон, 4'-метоксифлавоон, 5,4'- и 5,7-дигидроксифлавонов коэффициент распределения находится в диапазоне от 3,3 до 4,17, что позволяет разработать условия для отдельной экстракции флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Примером могут служить исследования василька шероховатого (М.С. Ларькина, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова, «Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого», 2008). В случае прямой спектрофотометрии оптическую плотность этанольного извлечения измеряют на спектрофотометре при длине волны 325 нм в сравнении со спиртом этиловым. Пересчет ведут на кислоту кофейную, имеющую максимум поглощения при той же длине волны.

Второй вариант – экстракционно-спектрофотометрическое определение, заключающееся в экстракции фенолкарбоновых кислот из спиртового извлечения этилацетатом при значении рН $2,0 \pm 0,1$. [139].

При экстракции 70% спиртом этиловым, содержание фенолкарбоновых кислот в пересчёте на кофейную кислоту в траве василька шероховатого составило $4,9 \pm 0,5\%$ с использованием прямой спектрофотометрии и $1,6 \pm 0,5\%$ – экстракционно-спектрофотометрическим методом [139].

Авторами работы установлено, что при значении рН $2,0 \pm 0,1$ практически вся кофейная кислота (94%) переходит в органический слой, а большая доля рутина остается в водном слое (85%). Отмечено, что при указанных условиях можно добиться достаточно селективной экстракции флавоноидов и фенолкарбоновых кислот [139].

В табл. 3 приведены некоторые свойства отдельных фенолкарбоновых кислот; в табл. 4 приведены константы кислотности и растворимость некоторых флавоноидов в среде этанол – вода 1:1.

Таблица 3. Некоторые характеристики фенолкарбоновых кислот бензойного и коричневого ряда [цит.22, 27, 30, 32, 40, 44, 72, 82]

Кислота	Мол.масса	lgP*		pK₂, (pK₃)
Салициловая (2-Гидроксибензойная)	138,13	2,1±0,3	3,0±0,1	13,7±0,1
Резорциловая (2,4- Дигидроксибензойная)	154,13	1,6±0,3	3,3±0,1	9,1±0,2 (14,4±0,1)
Протокатеховая (3,4- Дигидроксибензойная)	154,13	1,2±0,2	4,5±0,1	9,1±0,2 (12,9±0,1)
Ванилиновая (3-Метокси-4- гидроксибензойная)	168,12	1,3±0,3	4,5±0,1	9,3±0,2
Сиреневая (3,5-Диметокси-4- гидроксибензойная)	198,18	1,1±0,3	4,3±0,1	9,3±0,2
о-Кумаровая (2-Гидроксикоричная)	164,16	2,4±0,9	3,9±0,2	10,7±0,4
Кофейная (3,4-Дигидроксикоричная)	180,16	1,4±0,4	4,0±0,4	9,9±0,1 (12,8±0,3)
Феруловая (3-Метокси-4- гидроксикоричная)	286,25	1,6±0,4	4,0±0,4	10,2±0,3

*Значения параметров гидрофобности рассчитаны с помощью программы lgP (@ACD, Toronto, Canada)

Таблица 4. Константы кислотности и растворимость некоторых флавоноидов в среде этанол – вода 1:1.

	Флавоноид					
	Кверцетин	Морин	Фиситин	Кемпферол	Нарингенин*	Рутин
Значения рКа	7,10; 9,09; 11,12	5,2; 8,2; 9,9	7,27; 9,44	6,96; 8,78; 10,60	10,19; 8,31; 7,06	11,90; 8,80; 7,35
Ссылка на литературу	1	2	1	1	4	3

*В среде диметилсульфоксид - вода 1:1

Примечание: литературные источники данных табл.4:

1. Herrero-Martínez, José M.: Sanmartin, Meritxell; Rosés Martí; Bosch, Elisabeth; Ràfols, Clara Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. **2005**, 26, 1886-1895
2. Musialik, Malgorzat; Kuzmicz, Rafal; Pawlowski, Tomasz S.; Litwinienko, Grzegorz Acidity of Hydroxyl Groups: An Overlooked influence on Antiradical Properties of Flavonoids. *J.Org.Chem.* [Online] **2009**, 74,2699-2709 <http://pubs.acs.org> (accessed October 15th 2009).
3. Dyba M, Solinas S, Culeddu N, Ganadu M-L, Kozłowski H. Cu(II) complexes with rutin. *Polish J Chem* **1999**, 73: 873-878.
4. Karadag R, Erdogan G, Bayar M, Dolen E. *Rev Anal Chem* **2007**, 26: 169-186.

Для некоторых видов ЛРС применение экстракционно – спектрофотометрической методики необязательно. Например, для плодов, в которых флавоноидная фракция представлена антоцианами, поглощающими в длинноволновой области, мешающего влияния на анализ фенолкарбоновых кислот не проявляется. Этот факт наглядно иллюстрируется на примере плодов малины. Результаты, полученные прямой спектрофотометрией и экстракционно-фотометрическим методом (табл.5), различаются несущественно по содержанию суммы фенолкарбоновых кислот.

Таблица 5. Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на кислоту галловую в плодах малины

Метод	Прямая СФМ	Экстракционно-СФМ
λ_{max} , нм	280	278
Величина поглощения	0,695	0,766
	0,692	0,771
	0,688	0,759
Содержание суммы фенолкарбоновых кислот, %	2,67±0,03	2,59±0,02

На основании разницы в константах кислотности фенолкарбоновых кислот и флавоноидов возможно их разделение с помощью буферных растворов или, наоборот, совместное определение. Примером могут служить исследования по разработке количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на лютеолин в сиропе, содержащем экстракт цветков пижмы (Степанова Э.Ф., Якусевич Р.В., Дайронас Ж.В. «Разработка методики количественного определения флавоноидов в сиропе пижмы», 2012). [93, 96, 97].

В анализе флавоноидов ранее широко применялась спектрофотометрия по реакции диазотирования. Реакция обладает хорошей чувствительностью, но не селективна, так как в нее вступают флавоноиды, кумарины, антраценпроизводные и другие фенольные соединения [46]. Реакция с данным реактивом не дает возможности судить об истинном содержании флавоноидов ни в комплексных препаратах, ни в ЛРС [304].

Методики определения флавоноидов по цветным комплексам с алюминия хлоридом (385-460 нм), цирконила хлоридом (385-500 нм), галлия нитратом (400-455 нм) обладают большей специфичностью, хотя и имеют некоторые недостатки. Окрашенный комплекс, устойчивый в течение 30 минут можно получить добавляя стократный (для агликонов) или двух-трехкратный (для гликозидов), избыток реактивов. Наибольшей чувствительностью обладает методика с применением галлия нитрата (0,5 мкг/мл), затем с цирконила хлоридом (0,9-1,0 мкг/мл) и с алюминия хлоридом (1-2 мкг/мл). Истинное суммарное содержание флавоноидов, антрахинонов и кумаринов, определяется реакцией образования цветных комплексов с металлами, лишь в случае наличия у них одинакового количества комплексообразующих центров. Отсутствие комплексообразующих центров у ряда соединений приводит к отрицательной реакции с данными реактивами [44,45,56].

Наиболее чувствительным и селективным в анализе флавоноидов является боргидридный метод. Но, в связи с неустойчивостью окрашенного комплекса во времени, этот метод имеет ограниченное применение [56].

При определении общего количества флавоноидных соединений часто применяют реакцию комплексообразования с борной кислотой при длине волны 470 нм. Методика дает завышенные результаты и недостаточно селективна, но подходит для ориентировочных определений. Роль «мешающих» соединений при анализе флавоноидов в ЛРС могут иметь такие фенольные соединения, как кумарины, фенилпропаноиды, ксантоны, что следует учитывать при разработке методик количественного определения. Наиболее сложная ситуация, обнаруженная учеными [94,101,105,107] при исследовании растений, включенных в ГФ, - совместное присутствие флавоноидов и фенилпропаноидов, причем именно последние, как правило, обуславливают характер кривой поглощения электронных спектров, например, в цветках пижмы (табл. 6). Встречается также целый ряд флавоноидов в виде ацилгликозидов, часто содержащих в качестве ацильного остатка коричные кислоты (*n*-кумаровая, кофейная кислоты). Именно они вносят значительный вклад в спектр поглощения извлечений (например, в траве эрвы шерстистой - тилирозид и кумароилтилирозид). Из данных, приведенных в таблицах 2 и 6, следует, что именно фенилпропаноиды во многом обуславливают характер кривой поглощения: «плечо» в области около 290 нм и максимум поглощения в области около 330 нм. В табл. представлены данные по спектральным характеристикам извлечений некоторых лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды [93,94].

Таблица 6. Сравнительная характеристика УФ - спектров поглощения водно-спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего фенилпропаноиды [цит.А.В. Куркина «Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды», 2013]

Водно-спиртовое извлечение из лекарственного растительного сырья	Значение максимумов поглощения, нм		
	Обзорный спектр поглощения	+Алюминия хлорид	Дифференциальный спектр поглощения (длинноволновый максимум)
Цветков бессмертника	292 пл., 331	281, 334, 400 пл.	418
Цветков пижмы	291 пл., 332	291, 332, 400 пл.	400
Цветков ромашки аптечной	293, 322	298, 323	411
Цветков тысячелистника	291, 331	281, 334, 396 пл.	397
Травы эрвы шерстистой	268, 322, 360 пл.	268, 330 пл., 407	407
Травы репешка аптечного	267, 321	278, 334 пл., 397	403
Листьев мяты перечной	288, 327	290, 333	398
Травы полыни эстрагон	292 пл., 329	293 пл., 330 , 410 пл.	405
Плодов боярышника	381, 330 пл.	280, 332 пл., 406 пл.	410
Цветков боярышника	271, 289, 326	280, 330, 406	410

Примечание: пл. – «плечо» максимума поглощения.

Влияние сопутствующих соединений на спектральные характеристики наблюдается в ЛРС, в химическом составе которого доминируют флавоноиды (бессмертник песчаный), а также в сырье растений, содержащих эфирные масла (пижма обыкновенная) (табл.6). Использование дифференциальной спектрофотометрии в данных случаях более предпочтительно, т.к. способствует получению абсорбционного спектра, характеристики которого определяются особенностями химического строения флавоноидов [93,99,101]. На дифференциальных спектрах поглощения водно-спиртовых извлечений из цветков пижмы обыкновенной, обнаруживается максимум поглощения при длине волны 400 нм [96,97].

В присутствии натрия ацетата, кислота борная образует хелаты с ортогидроксильными группами во всех положениях, кроме С5 и С6 [97].

В настоящее время в фармакопейных методиках и при исследовании растительного сырья, наиболее часто применяют спектрофотометрию окрашенного комплекса с алюминия хлоридом в связи с широкой доступностью реактива и устойчивостью комплекса. При этом для подавления собственной диссоциации флавоноидов добавляют кислоту уксусную или хлористоводородную. Комплексы, образующиеся между небольшим избытком алюминия хлорида и ортогидроксильными группами А и В колец, разрушаются в присутствии кислоты. Комплексы с алюминия хлоридом, образующиеся между С4 кето- группой и 3- или 5- гидроксильной группой оказываются стабильны в присутствии кислоты [97].

Спектры поглощения флавоноидов достаточно информативны, выявленные для них закономерности широко используются для идентификации и установления строения новых соединений. Для этих целей хорошо подходит способ добавления шифт-реагентов, позволяющий выявить определенные специфические признаки в структуре исследуемого соединения. Рабочий интервал концентраций спиртовых, водноспиртовых растворов составляет от 5 до 20 мкг вещества в 1 мл раствора [98,114,116,119,127].

Для проведения реакции с шифт-реагентами обычно работают с раствором исследуемого флавоноидного соединения в спирте метиловом (при работе с антоцианами и антоцианидинами – в спирте метиловом с 0,01% раствором кислоты хлористоводородной). Добавление шифт-реагента приводит к сдвигу полос поглощения в исходном электромагнитном спектре, на основе характера которого делается вывод о наличии или отсутствии в исследуемом соединении определенных структурных фрагментов. Шифт-реагенты часто применяются для обнаружения в структуре соединений:

- гидроксильных групп с наиболее выраженными кислотными свойствами (7-ОН, 4'-ОН);
- хелатообразующего фрагмента, т. е. сочетания 4-оксогруппы с 3-ОН- и/или 5-ОН-группами [143].

В фармакогностическом анализе часто встречается реакция взаимодействия флавоноидов с алюминия хлоридом. [10, 18, 21, 24, 32, 61, 64, 65, 68, 80, 93, 114, 127, 186, 205, 268, 304].

В табл. 7. приведены длины волн, соответствующие максимумам поглощения комплексов некоторых индивидуальных флавоноидов с алюминия хлоридом и с алюминия хлоридом в присутствии кислоты хлористоводородной, а также с кислотой борной в присутствии натрия ацетата [268].

Таблица 7. Длины волн, соответствующие максимумам поглощения комплексов некоторых флавоноидов с алюминия хлоридом и кислотой борной в спиртовых растворах [цит. 324, 325, 326]

Флавоноид	λ_{\max} , нм с $AlCl_3$	λ_{\max} , нмс $AlCl_3 + HCl$	λ_{\max} , нмс $NaOAc/H_3BO_3$
Флавоны и флавонолы			
Флаванон	250, 293, 306	250, 293, 309	255, 294, 307
Байкалеин	247, 272, 284, 375	255, 282, 292, 346	262, 277, 333
Байкалин	249, 288, 343	248, 289, 338	283, 318
Апигенин	276, 301, 348, 384	276, 299, 340, 381	268, 302, 338
Апигенин-7-О- глюкозид	276, 300, 348, 386	277, 299, 341, 382	267, 340
Витексин	277, 305, 350, 386	278, 303, 343, 383	271, 329, 344
Лютеолин	274, 300, 328, 426	266, 275, 294, 355, 385	259, 301, 370, 430
Лютеолин-7-О – глюкозид	274, 298, 329, 432	273, 294, 358, 387	259, 372
Лютеолин-7-О – рутинозид	272, 296, 331, 432	272, 295, 359, 389	258, 370
Неваденсин	265, 290, 310, 356, 413	262, 289, 309, 351, 404	286, 322, 409
3-гидроксифлаванон	248, 264, 327, 393	248, 265, 325, 400	306, 345, 360, 407
Кемпферол	260, 268, 303, 350, 424	256, 269, 303, 348, 424	267, 297, 320, 372
Кверцетин	272, 304, 333, 458	265, 301, 359, 428	261, 303, 388
Керцетин-7-О- рамнозид	259, 273, 229, 458	268, 303, 365, 426	261, 289, 386
Керцетин-3-О- галактозид	275, 305, 331, 438	268, 299, 366, 405	262, 298, 377
Кверцитрин	276, 304, 333, 430	272, 303, 353, 401	260, 300, 367
Рутин	275, 303, 433	271, 300, 364, 402	262, 298, 387
Кверцетин – 3,7-О - диглюкозид	275, 298, 335, 440	270, 299, 363, 402	261, 380
Центауреин	271, 281, 297, 381	268, 281, 299, 368, 404	257, 271, 353
Изофлавоноиды, флаваноны, дигидрофлавонолы			
7-гидроксиизофлаванон	243, 299, 305	243, 299, 305	252, 301
Ликвиритигенин	276, 311	276, 311	278, 312
Нарингенин	312, 375	311, 371	290, 332
Сакураин	280, 312	280, 310	279, 313
Гесперидин	308, 383	306, 379	284, 326
Дигидрокемпферол	274, 316, 382	280, 312, 378	296, 336
Халконы и ауроны			
2- гидроксихалкон	238, 286, 348	239, 281, 347	281, 345
3,4 - дигидроксихалкон	263, 275, 332, 413	265, 365	272, 327, 401
4' - гидроксияурон	255, 343, 296, 405	255, 345, 396, 402	257, 344, 406
5,7 - дигидроксияурон	301, 359	282, 318	285, 314
6,7 - дигидроксияурон	261, 267, 318, 413	244, 261, 320, 374	364, 314, 401

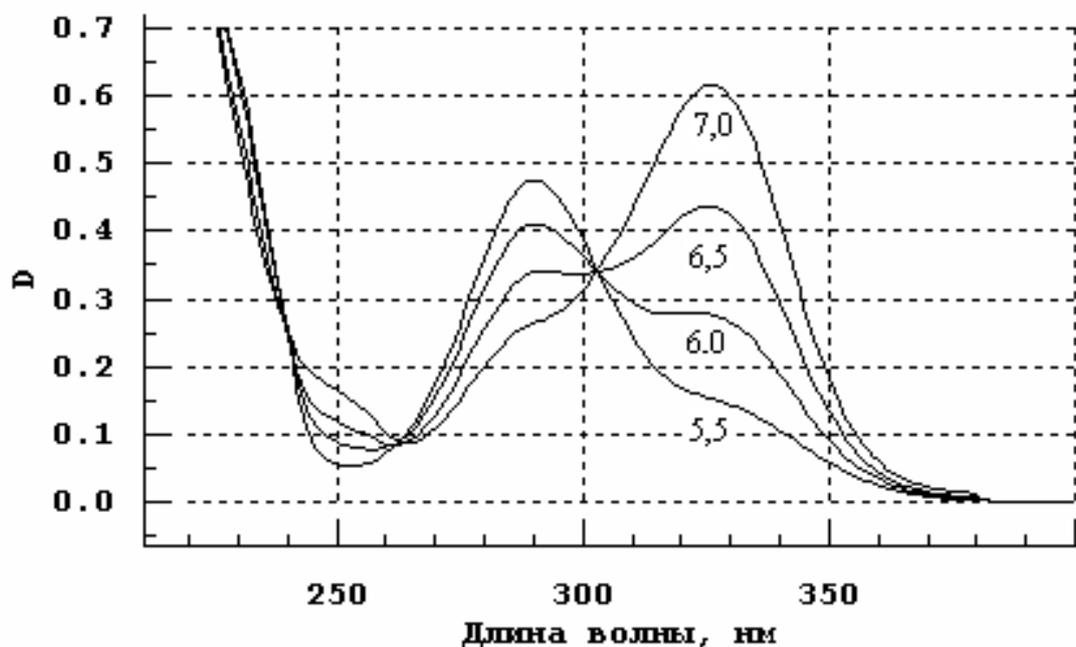


Рис. 1. Спектры дигидрокверцетина в фосфатных буферных растворах при рН 5,5-7.

В фармацевтическом анализе, согласно НД практически во всех случаях фотометрического анализа используется фотоэлектроколориметрия [52]. Это связано с тем, что большинство методик разрабатывалось до развития современной приборной базы. Однако применение светофильтров не дает точного представления о длине волны, соответствующей максимальному поглощению, количестве максимумов поглощения и характере абсорбционного спектра. Это следует учитывать при разработке методик, так как, зная характер абсорбционного спектра, можно не только обнаружить аналитическую длину волны, но и определить форму, в которой соединение находится в растворе. Например, в УФ-спектре раствора дигидрокверцетина обнаруживается две полосы – интенсивная ($\lambda_{\text{max}} = 290$ нм) и слабая ($\lambda_{\text{max}} = 320$ нм). Запись электромагнитных спектров при различных рН (в фосфатных буферных растворах) показала, что две полосы относятся к двум различным состояниям дигидрокверцетина, поскольку на

рис.1 четко обозначается изобестическая точка, координаты которой могут быть использованы для корректного количественного определения. Возникновение этой точки объясняется диссоциацией самой кислой ОН-группы в положении 5 [232].

1.1.2.2. Фотометрический анализ антраценпроизводных

Анализ антраценпроизводных, согласно методикам ГФ РФ состоит из нескольких этапов, которые включают в себя гидролиз гликозидов и экстракцию агликонов; окисление и доокисление (для увеличения интенсивности окраски); в некоторых случаях окисление димеров; очистки с применением щелочно-аммиачного раствора и фотометрического анализа [56,52].

Традиционные методики достаточно трудоемки и длительны в исполнении; требуют построения калибровочного графика. Их главным недостатком является то, что пересчет суммы антраценпроизводных в большинстве случаев проводится на истизин, опосредованным стандартом которого является гексагидрат кобальта (II) хлорида, растворы которого служат для построения калибровочного графика. Сам истизин реально не присутствует в химическом составе сырья, что приводит к ошибкам в определении аналитической длины волны. Кроме того, методики разрабатывались на фотоэлектрокалориметрах, что также не дает определенности в установлении длины волны, соответствующей максимальному поглощению [131,195].

В связи с этим, в литературе появляются работы, направленные на уточнение и упрощение методик анализа антраценпроизводных в ЛРС и растительных препаратах, подавляющее большинство которых опубликовано профессором В.А. Куркиным с соавторами [101,104].

Так, например, в коре крушины предложено определять сумму антраценпроизводных в пересчете на франгулин А с использованием 40%

спирта этилового в качестве экстрагента, спектрофотометрически при аналитической длине волны 524 нм [106].

Количественное содержание антраценпроизводных в сиропе коры крушины устанавливают методом прямой спектрофотометрии, измеряя оптическую плотность при длине волны 534 нм. Содержание суммы антраценпроизводных в сиропе крушины варьирует от $0,30 \pm 0,02$ до $0,37 \pm 0,02$ % [104].

В научных публикациях освещаются также вопросы анализа антраценпроизводных в сборах, например, в сборе «Лух», производства ООО НПФ «Золотая долина» (Новосибирская область) (2012 г., 2013 г.), и его компонентах, обуславливающий основное фармакологическое действие: листьях сенны и коре крушины ломкой [106].

Предложена методика количественного определения суммы антраценпроизводных в плодах жостера слабительного методом спектрофотометрии при длине волны 524 нм. Содержание суммы антраценпроизводных в плодах жостера слабительного колеблется от 2,54 до 5,40% (в пересчете на франгулин А) [106].

Коллективом авторов (В.А. Куркин, Шмыгарева А.А., Саньков А.Н.) разработаны новые подходы к стандартизации противогеморроидального сбора «Проктофитол». Авторы предлагают определять сумму антраценпроизводных методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 524 нм с использованием франгулина А в качестве стандартного образца. Данный выбор сделан на основании изучения спектров поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из «Проктофитола», извлечения из коры крушины ломкой и стандартного образца франгулина А. В наибольшей степени корреляция спектра поглощения щелочно-аммиачного раствора сбора наблюдается со щелочно-аммиачным раствором водно-спиртового извлечения из коры крушины ломкой. [101].

1.1.2.3. Фотометрический анализ дубильных веществ.

Европейская фармакопея для стандартизации ЛРС, содержащего дубильные вещества, приводит два показателя – общее количество полифенолов и количество полифенолов, не осаждаемых гольевым порошком, определяемых спектрофотометрически при 760 нм (реакция с фосфорномолибденовольфрамовым реактивом) [272]. Второй показатель значительно ниже по сравнению с показателем «содержания дубильных веществ в пересчете на танин» (по ГФ РФ XI изд.) [52, 132].

В литературе описан фотоэлектроколориметрический метод. Он основан на способности дубильных веществ образовывать окрашенные соединения с солями трехвалентного железа, реактивом Фолина-Дениса, фосфорно-вольфрамовой кислотой и другими веществами. Содержание дубильных веществ в процентах определяют с использованием калибровочного графика, который строят с использованием серии растворов танина известной концентрации [149].

Более точным методом является спектрофотометрия [136]. Предложена методика определения дубильных веществ в ЛРС с использованием реакции с аммония молибдатом. Оптическую плотность окрашенного продукта измеряют на спектрофотометре при длине волны 420 нм. Расчет суммы танина производят по одноименному стандартному образцу [168].

В литературе приведён метод прямой спектрофотометрии (патент RU 2439568 «Способ определения дубильных веществ в растительном сырье» авторов И.А. Самылиной, Е.Н. Гринько, Абоянц Р.К., 2010 г.) с использованием 1% раствора коллагена. Авторы предлагают измерять оптическую плотность при длине волны 277 нм. Методика позволяет селективно определить осаждаемые и не осаждаемые дубильные вещества в ЛРС.

1.1.3. Титриметрические методы анализа биологически активных соединений

Титриметрический метод анализа – один из самых распространенных и точных методов. Анализ выполняется быстро, его можно автоматизировать, а также использовать для определения достаточно малых содержаний аналита, применяя чувствительные инструментальные методы индикации точки завершения титриметрической реакции, например, посредством измерения рН. Для определения содержания титруемого аналита используют общие положения о законе эквивалентов [216, 227].

К титриметрическим реакциям предъявляется ряд требований [216].

1. Реакция должна быть стехиометричной.
2. Реакция должна быть быстрой.
3. Не должно быть никаких побочных реакций, а титриметрическая реакция должна быть специфичной. Если присутствуют какие-либо мешающие вещества, их следует удалить.
4. В момент завершения реакции в системе должно наблюдаться резкое изменение какого – либо свойства (окраски раствора, электрических или других физических параметров).
5. Объемы титранта в конечной точке титрования в точке эквивалентности должны совпадать в пределах требуемой точности результатов, а если они различаются, то это различие должно быть сопоставимым.

6. Реакция должна протекать количественно. Это условие необходимо для того, чтобы изменение свойств системы вблизи конечной точной было достаточно резким для обеспечения требуемой точности результатов.

В фармакогностическом анализе первое и третье требования не всегда соблюдаются вследствие многокомпонентности сырья. Поэтому делаются определенные допущения и приближения, например, пересчет на определенное вещество, являющиеся компонентом метаболома растения.

Так, количественный анализ дубильных веществ, проводимый окислительно–восстановительным титрованием калия перманганатом в присутствии индикатора индигосульфокислоты, согласно общей фармакопейной статье, предполагает существенное разбавление извлечения. Этот прием используется для снижения концентрации мешающих соединений, например фенологликозидов и флавоноидов. Затем, при расчетах, делают допущение, что все дубильные вещества представлены танином или кислотой галловой. Также проводят контрольный опыт, чтобы скомпенсировать изменение потенциала при окислении самого индикатора – индигосульфокислоты и веществ, присутствующих в воде, обладающих восстановительной активностью [52].

Аналогично поступают и при титровании суммы органических кислот в плодах шиповника. Так как содержание кислот в шиповнике велико, то вкладом фенольных соединений, титрующихся натрием гидроксидом, пренебрегают. Содержание органических кислот рассчитывают с использованием титра кислоты яблочной, то есть условно допускают, что все кислоты представлены кислотой яблочной [52].

Одним из недостатков фармакопейных методик является то, что рН водных извлечений для многих растений различается, а цвет индикатора зависит от рН среды. В связи с этим достоверно определить конечную точку титрования бывает затруднительно. Согласно методике ГФ XI изд., перешедшей также в ГФ XIII изд., титрование дубильных веществ проводится до момента появления золотисто-желтой окраски, а органических кислот – до лилово-красной окраски в пене. Индивидуальное цветоощущение каждого человека может приводить к существенной ошибке при использовании перечисленных методов. Особенно часто это происходит при анализе извлечений, не образующих пены при взбалтывании. Показано [116, 118, 120, 122, 123, 124, 125, 165], что использование потенциометрического титрования позволяет избежать перечисленных

трудностей. Определение антраценпроизводных, оксикумаринов, флавоноидов осуществимо потенциометрическим методом в среде неводных растворителей. Потенциометрический анализ не требует стандартов, что является преимуществом перед оптическими методами. Недостатком потенциометрического метода является невысокая селективность [54, 72], что не мешает использовать этот метод для стандартизации ЛРС по сумме БАС [120].

Флавоноиды с высокой селективностью можно определить обратным титрованием избытка свинца ацетата, не вступившего в реакцию осаждения. Анализу не мешают такие соединения, как кумарины, антраценпроизводные и ацетилсалициловая кислота [37].

К окислительно-восстановительной титриметрии относится метод окисления флавоноидов ферроцианидом калия. Недостатками является длительность и невысокая избирательность [37, 72].

К перспективным доступным физико-химическим анализа БАС в ЛРС можно отнести гальваностатическую кулонометрию, в которой основными контролируемыми параметрами являются время и сила тока. Удобство метода заключается в том, что, используя одну установку можно проводить кислотнo-основное и окислительно-восстановительное титрование, меняя состав фонового электролита в кулонометрической ячейке. Кулонометрический анализ отличается простотой проведения эксперимента, быстротой, не требует предварительной стандартизации титранта, применения стандартных образцов и построения калибровочных графиков. Показана актуальность метода для стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов по содержанию арбутина, дубильных веществ, органических кислот [1, 3, 4, 5].

Количественное определение содержания дубильных веществ в ЛРС в пересчете на танин методом кулонометрического титрования заключается в том, что извлечение из сырья вступает в реакцию с гипойодит-ионами (кулонометрический титрант), образующимися при диспропорционировании

электрогенерированного йода в щелочной среде. Электрогенерация гипоиодит-ионов осуществляется из 0,1 М раствора йодида калия в фосфатном буферном растворе (рН=9,8) на платиновом электроде при постоянной силе тока 5,0 мА [1, 200].

Для определения содержания органических кислот, гидроксид-ионы генерируют из воды на катоде, конечную точку титрования фиксируют рН-метрически. Электрогенерацию проводят при постоянной силе тока 5 мА, фоновым электролитом служит насыщенный раствор калия сульфата [1].

Несмотря на все преимущества кулонометрического титрования, объем аликвоты извлечения крайне мал (0,5-1 мл) [1, 3 4, 5], что может служить причиной недостоверности полученных результатов при низком содержании исследуемых БАС в пробе.

Наиболее оптимальным методом кислотно-основного и окислительно-восстановительного титрования является потенциометрия. Этот метод не требует дорогостоящего оборудования, дает возможность осуществлять окислительно-восстановительное и кислотно-основное титрование с использованием одного и того же прибора, путем смены лишь рабочего электрода и титранта. Потенциометрический метод позволяет работать без разбавления с окрашенными извлечениями, может быть автоматизирован, не требует стандартов и использования индикаторов [123-125, 165, 176, 288]. Использование ион-селективных электродов расширяет возможности потенциометрии в количественном анализе ионов металлов и неметаллов [195]. Следует отметить, что потенциометрическое определение содержания ионов металлов не требует специальной пробоподготовки, оборудования и отличается существенной дешевизной по сравнению с атомно-абсорбционной спектроскопией. Потенциометрически можно определять содержание таких БАС как антраценпроизводные, оксикумарины, флавоноиды в среде неводных растворителей. В качестве неводных растворителей при потенциометрическом определении флавоноидов используют диметилсульфоксид, ацетон, диметилформамид; в качестве

титрантов применяют растворы натрия гидроксида или тетраэтиламмония. Достаточной селективности методики можно достигнуть, используя предварительное разделение БАС. К недостаткам можно отнести также малую чувствительность метода (для анализа требуется 0.0005 – 0.001 г вещества) [134, 56].

1.1.4. Другие физико-химические методы, используемые в анализе фенольных соединений

В количественном анализе флавоноидов может быть использован полярографический метод [44].

Метод отличается высокой чувствительностью и позволяет определять флавоноиды восстановлением на ртутном капельном электроде. Полярографически возможно установить суммарное содержание флавоноидов, сделав пересчет на какое-либо индивидуальное соединение. По сравнению со спектрофотометрическим анализом окрашенных комплексов, полярографический метод дает более близкие результаты к истинному суммарному содержанию флавоноидов [44]. Условия для определения флавоноидов: потенциал полувольты 1,5 В на фоне 0,4 М раствора аммония хлорида. Полярографически возможно осуществлять идентификацию БАС по величине потенциала полувольты; устанавливать наличие внутримолекулярных связей и оценивать реакционную способность отдельных групп в молекуле. Однако в фармацевтическом анализе и, в особенности, в условиях испытательных лабораторий полярографический анализ в настоящее время практически не применяется, так как требует соблюдения строгих условий техники безопасности [44,56]. Близкие величины потенциалов полувольт обуславливают малую избирательность метода, что приводит к необходимости предварительного разделения веществ.

В современной науке для обнаружения и количественного определения флавоноидов в растительном сырье также используется метод капиллярного электрофореза [310, 315].

Обеспечение постоянства электроосмотического потока в течение всех проводимых определений, повышает воспроизводимость капиллярного электрофореза, что требует значительных усилий по подготовке до и после работы. Электроосмотический поток в кварцевых капиллярах обратно пропорционален концентрации электролита и органических растворителей, и прямо пропорционален значению рН, а также зависит от вязкости раствора в капилляре и температуры. При добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра, возможна адсорбция положительного заряда, что приводит к смене направления электроосмотического потока и переносу разделительного буферного раствора в направлении анода [310,315].

Эффективность разделения в капиллярном электрофорезе прямо пропорциональна напряжению, тогда как время анализа находится в обратной зависимости от напряжения, приложенного к электродам. Преимуществами капиллярного электрофореза являются: малый расход реактивов, высокая эффективность разделения и быстрота [315].

Наиболее совершенными и точными методами хроматографического анализа является газожидкостная хроматография (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Качественный ГЖХ анализ проводят, сравнивая величины относительного времени удерживания, приняв за стандарт одно из хроматографируемых веществ [156]. Для ряда веществ, относящихся к оксикумаринам, антраценпроизводным и флавоноидам метод ГЖХ не осуществим в связи с термолабильностью соединений и невозможностью дериватизации, что тем не менее, позволило проанализировать этим методом 22 флавоноидов [128, 278, 310].

Метод ВЭЖХ широко применяется в качественном и количественном анализе БАС. Обращеннофазовая ВЭЖХ является основным методом анализа фенолкарбновых кислот и флавоноидов. При анализе фенольных соединений хорошие результаты получают с использованием в составе подвижной фазы водных растворов кислот: муравьиной, уксусной, ортофосфорной, а также ацетонитрила или спирта метилового. На время удерживания фенолов в колонке влияют значения рН и ионной силы подвижной фазы, т.к. от них зависит степень протонирования молекулы [156,291]. Наличие максимумов поглощения фенольных соединений в УФ - области обуславливает применение ВЭЖХ с УФ –детектором для их анализа. Универсальной длины волны для определения всех классов фенольных соединений не существует, хотя многие из них имеют близкие или идентичные максимумы поглощения в УФ -области [291].

Для оксикоричных кислот характерны два максимума поглощения при 225-235 нм, и при 290-330 нм. Производные коричной кислоты (максимум поглощения 320 нм) можно отличить от бензойной кислоты, поглощающей при 254 нм. Длина волны 280 нм характерна для определения обоих классов этих фенольных соединений [245]. Флавоноловые агликоны можно определить в области длин волн 350-370 нм, флаван-3-олы и гликозиды флавонолов - при 280 нм [291, 310].

Несмотря на высокую точность, метод ВЭЖХ не является универсальным для анализа многокомпонентного ЛРС и требует тщательного подбора условий, таких как состав подвижной фазы, тип колонки, температура, скорость потока. Во избежание быстрого износа сорбента на колонке необходимо проводить пробоподготовку; кроме того, это необходимо в случае анализа водных извлечений с целью концентрирования искомым веществ [101,146].

Порой, для получения хороших результатов ВЭЖХ-анализа флавоноидов необходимо вначале проводить спектральный скрининг извлечений и стандартных образцов доминирующих соединений [101,103].

Роль спектрофотометрии в разработке методик высокоэффективной жидкостной хроматографии показана в исследованиях В.А. Куркина и В.Б. Браславского. При анализе почек тополей черного и бальзамического установлено, что в сырье преобладают такие соединения флавоноидной природы, как пиностробин и пиноцембрин [101,103]. При обосновании аналитической длины волны при ВЭЖХ-анализе флавоноидов в ЛРС и препаратах на растительной основе авторы предлагают исследовать спектры поглощения стандартных образцов доминирующих флавоноидов в среде, идентичной подвижной фазе [103]. Если используются элюентные смеси, с добавлением кислоты уксусной, то необходимо ориентироваться на максимумы поглощения со значениями более 250 нм [103].

Многие высокоточные методы анализа требуют высокой чистоты стандартов и реактивов, что не всегда доступно [146]. Их применение лимитируется высокой стоимостью аналитического оборудования и необходимостью разработки пробоподготовки для отделения балластных веществ [307].

В связи с тем, что в большинстве лекарственных растительных препаратов фармакологический эффект обусловлен комплексом БАС, а не индивидуальным веществом, перечисленные выше методы находят применение в большей степени для установления химического состава новых видов ЛРС, нежели для стандартизации.

1.2. МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ БАС ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Процесс экстракции (от лат. *extrahere* - извлекаю, вытягиваю) представляет собой способ выделения БАС из растительного или животного сырья с помощью жидкого растворителя (воды, спирта, масла и т.д.), обладающего определенной селективностью. Экстрагирование соединений из растительного сырья протекает через ряд стадий и представляет собой сочетание целого ряда процессов [135]. Вопросам теории выделения БАС из

ЛРС посвящено большое количество работ [135, 140, В.Д. Понамарев «Экстрагирование растительного сырья», 1976 и др.].

Традиционные методы выделения БАС из лекарственного сырья известны издавна. Новые технологии нашего времени привели к их усовершенствованию: интенсификации, ускорению, повышению эффективности и т.д.

К традиционным методам экстракции относятся водно-паровая экстракция, экстракция различными растворителями, мацерация и перколяция [90]. К разновидностям современной экстракции можно отметить сверхкритическую, ультразвуковую и другие виды [135,140, 223].

Способов экстракции известно множество; все они могут быть классифицированы на статические - сырье периодически заливают экстрагентом и настаивают определенное время; и динамические - предполагают постоянную смену либо экстрагента, либо экстрагента и сырья [70, 90, 140, 141, 164].

В настоящее время усовершенствование процесса экстракции нацелено в основном на устранение диффузионных порогов с помощью различных механических или физических воздействий. Этот подход нашел применение в электроимпульсной обработке сырья, вихревой экстракции (турбоэкстракции), центробежной экстракции, экстракции с акустическими воздействиями, дробной мацерации и др. [225].

Турбо-экстракция часто осуществляется с использованием роторно-пульсационной аппаратуры [225], где колебания (вибрация) частиц сырья наиболее выражены [90].

Примеры, приведенные в литературе, показывают возможность сокращения процесса извлечения БАС корней горечавки, коры хинного дерева, листьев красавки, аира болотного, до 5-10 мин [225] с применением указанного метода. Используя экстракцию в турбулентном потоке экстрагента с одновременным повышением дисперсности ЛРС, можно эффективно получать извлечения из свежих растений.

Размол сырья в среде экстрагента с помощью шаровых мельниц способствует повышению эффективности экстракции и относится к кинематическим способам, в основе которых лежат колебания частицы сырья в движущейся жидкости. Экстракция в шаровых мельницах - достаточно продолжительный процесс, приводящий к адсорбции основных действующих веществ большой поверхностью измельченностью сырья, что снижает производительность данного метода [223].

Методы пульсационной обработки растительного сырья успешно применяются для интенсификации процессов гомогенизации и перемешивания, растворения труднорастворимых веществ, ускорения стадии экстрагирования БАС [16]. В современных пульсационных пневматических установках частота пульсаций находится в пределах 20—300 колебаний в минуту [90, 223].

Движущей силой интенсификации процесса при пульсации потока жидкости, протекающей через слой сырья, является турбулизация пограничного слоя, разрушение застойных зон в точке соприкосновения частиц, уменьшение толщины диффузионного слоя [225].

Весьма перспективным в технологии экстракции БАС из лекарственного сырья оказался метод с применением электроимпульсных разрядов [247], позволяющий интенсифицировать процесс экстрагирования, сохраняя целостность молекулы. Положительным аспектом является также то, что извлечения, полученные с использованием электроимпульсного удара, продолжительное время не поддаются микробиологической контаминации [135].

Другими современными методами повышения эффективности выделения БАС из ЛРС являются высокочастотная и сверхвысокочастотная обработка. Такой подход увеличивает выход готовой продукции, повышает ее качество, значительно сокращает использование производственных площадей, соблюдения необходимых санитарно-гигиенических условий обработки лекарственного сырья. При электромагнитной обработке

происходит одновременный нагрев всей массы обрабатываемого материала как в макро-, так и микрообъемах [90, 140].

Подготовка оборудования к проведению высокочастотной и сверхвысокочастотной экстракции, как правило, достигается быстро, в течение 30—50 с, что приводит к сокращению энергозатрат и повышению экономической выгоды производства [90, 140, 225].

Экстракции под действием электромагнитного поля присущи некоторые недостатки. Она эффективна лишь на глубине проникновения электромагнитных волн 45—50 мм в экстракционный материал. При дальнейшем повышении толщины слоя ЛРС, эффективность обработки снижается [164].

К электрическим способам обработки растительного сырья относят электроплазмолиз и электродиализ. Электроплазмолиз чаще всего используется для получения соков из растительного сырья при прессовом способе извлечения. Присутствие в химическом составе растительных тканей коллоидно-белковых веществ и ионов обуславливают возможность применения при экстракции внешнего воздействия, в том числе электрического тока, способного заряжать молекулы и ионы [90, 144]. Обработка ЛРС электрическим током способствует быстрому разрушению протоплазмы и переходу БАС в раствор. Выход пектиновых соединений при таком способе экстрагирования незначителен, т.к. ток не вызывает разрушения клеточных стенок в отличие от температурного плазмолиза [90, 140].

Электродиализ основан на диффузии молекул электролитов через полупроницаемую пористую клеточную стенку под действием электрического тока. В процессе электродиализа происходит изменение солевого состава жидкостей, содержащих БАС. Фазовых превращений системы и изменения агрегатного состояния при этом не наблюдается, а вещества, входящие в обрабатываемые жидкости, сохраняют свою

нативную структуру. Недостатком является продолжительность процесса [140, 151].

Практическое применение в фармации нашел ультразвук, используемый при растворении, получении суспензий, эмульсий, изготовлении микрогранул, производстве ампул, стерилизации и фонофорезе [90, 137, 151]. При указанных способах ультразвук непосредственно воздействует на молекулу БАС через жидкую фазу.

Несмотря на использование в производстве, ультразвуковое воздействие подходит не для всех БАС. Известны случаи нарушения конформационной структуры озвучиваемой молекулы, ее пространственной ориентации, разложения полимерных молекул на мономеры, а, следовательно, изменения свойств соединения. В этом отношении звукохимические эффекты, связанные с превращением энергии упругих колебаний ультразвука, являются одним из видов механохимических реакций [90,137].

Протекание указанных процессов, по-разному влияет на получаемые препараты, некоторые из которых становятся терапевтически более активными, другие - остаются нейтральными или теряют свои свойства. В получаемом извлечении могут протекать такие явления как химическая деполимеризация, образование новых макрорадикалов, гомогенизация обрывков и т.д. [208]. Повышение времени ультразвукового воздействия и увеличение мощности усиливает степень деструкции соединений. Одним из выходов может быть добавление консервантов, стабилизаторов, антиоксидантов, приостанавливающих или замедляющих процессы разрушения [137].

Перспективным способом выделения БАС может по праву считаться экстракция сжиженными газами, часто применяющаяся для эфиромасличного растительного сырья и позволяющая извлекать отдельные компоненты. Возможность легкой отгонки экстрагента делает экстракционный процесс сжиженными газами весьма удобным и экономичным [90,145].

Сжиженные газы отличаются физико-химическими и термодинамическими свойствами, обладают различной гидрофильностью и олеофильностью. Подбирая газы с определенными характеристиками и различной полярностью, можно селективно экстрагировать отдельные химические соединения из ЛРС [90, 145].

Наиболее часто для экстракции БАС из ЛРС используют сжиженный углекислый газ. Его популярность обусловлена пожаро- и взрывобезопасностью, химической инертностью по отношению к выделяемым веществам, перерабатываемому сырью и конструкционным материалам аппаратуры. Отсутствие перечисленных свойств у целого ряда сжиженных газов ограничивает их применение [133, 135, 140].

При экстракции сжиженными газами количественный выход действующих веществ весьма существенен и может достигать 88-98 %, что, зачастую, выше, чем у других способов извлечения - мацерации, перколяции, отгонки паром и т.д. Для экстрактов, полученных с использованием сжиженного углекислого газа, отмечены антибактериальные свойства. Извлечения, полученные CO_2 - экстракцией, по внешним, физическим и химическим характеристикам, как правило, отличны от традиционных: имеют другую окраску, часто более темных тонов с тенденцией к коричневому, меньшие плотность и показатель преломления, большее кислотное число. Наиболее выражены отличия у экстрактов из корней и корневищ, листьев и стеблей растений, что может быть связано с энзиматическими процессами, протекающими в сырье. Более высокие значения эфирного числа экстрактов таких извлечений обусловлены преобладанием в их составе сложных эфиров и эфиров неглицеридного характера [90, 135].

Достаточно низкая температура во время экстрагирования БАС из ЛРС с применением сжиженных газов на основных технологических стадиях - экстракции и дистилляции - практически исключает окислительные процессы. Тем не менее, полученные экстракты, за редким исключением,

сильно отличаются по составу от густых или жидких экстрактов, широко используемых в практике химико-фармацевтического и аптечного производства, и не могут их заменить [90, 140].

Экстракция с помощью сжиженных газов дает возможность производить достаточно концентрированные препараты с относительно небольшой стоимостью, поэтому выгодна экономически [135, 145].

Обобщенно приемы и методы воздействия, используемые при различных методах экстракции, представлены в табл.8.

Таблица 8. Факторы, ускоряющие экстракцию

Метод Экстракции	Смывание диффузного слоя	Измельчение	Увеличение разницы концентраций БАС экстрагента и сырья	Нагрев	Другие воздействия
Мацерация					
Перколяция	+		+		
Противоточная периодическая экстракция	+		+		принцип противотока
Циркуляционная экстракция	+		+	+	
Противоточная непрерывная экстракция	+		+		принцип противотока
Виброэкстракция	+				
Вихревая экстракция	+	+		+	
РПА-экстракция	+	+		+	
УЗ-экстракция	+	+		+	уменьшение сольватной оболочки
ВЧ/СВЧ экстракция				+	уменьшение сольватной оболочки
Электроимпульсное и магнитоимпульсное воздействие	+	+		+	увеличение проницаемости клеточных стенок
Экстракция сжиженными газами	+		+		пониженная вязкость экстрагента

Несмотря на большое разнообразие научных трудов, посвященных способам повышения эффективности экстракции, а также внедрение в практику новых технологий, направленных на оптимизацию процессов извлечения БАС из ЛРС, вопрос дальнейших изысканий в этой области остается открытым. Например, публикации, посвященные проблеме увеличения перехода БАС в воду, в литературе представлены незначительно, несмотря на то, что большое количество видов ЛРС применяются в форме настоев и отваров.

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 1.

1. Для анализа фенольных соединений в ЛРС наиболее часто применяются фотометрические методы как наиболее простые, точные и быстрые в исполнении. Наиболее достоверным является спектрофотометрический метод.
2. Перспективным методом в определении содержания отдельных групп БАС в ЛРС является потенциометрическое титрование. Этот метод не требует дорогостоящего оборудования, позволяет анализировать окрашенные извлечения, может быть автоматизирован, не требует стандартов и использования индикаторов. Кроме того, использование ион-селективных электродов позволяет определять ионный и элементный состав (присутствие ионов металлов и неметаллов).
3. Одной из лимитирующих и важных стадий количественного определения БАС в ЛРС является экстракция. От выбора условий экстракции во многом зависит селективность анализа. В виду отсутствия системных исследований влияния ряда физических и химических факторов на процесс экстрагирования БАС из ЛРС, возрастает актуальность этого вопроса.
4. Проведенный анализ выявил необходимость систематизации, обобщения литературных данных и разработки алгоритма выбора метода количественного определения отдельных групп БАС при стандартизации ЛРС с учетом влияния соединений метаболома растения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили 23 вида ЛРС различных морфологических групп, ЛРП (пачки, фильтр-пакеты), отвечающие требованиям действующей нормативной документации фирм-производителей ОАО «Красногорсклексредства» и ЗАО «Здоровье», а также сырье из 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, Чистотела трава, Зверобоя трава, Пустырника трава, Шалфея листья, Бессмертника цветки, Диоскореи ниппонской корневища, Ольхи соплодия и 3 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».

Таблица 9. Объекты исследования

Морфологическая группа/ лекарственный препарат	Наименование ЛРС/препарата	Производитель, количество серий / образцов
Корневища/ корневища и корни	Бадана корневища	«Здоровье» (3), СФК (1)
	Лапчатки корневища	«Здоровье» (3), СФК (1)
	Диоскореи ниппонской корневища	СФК (1)
	Кровохлебки корневища и корни	«Здоровье» (3), СФК (1)
Плоды	Шиповника плоды	СФК (1), «КРЛС» (3), «Здоровье» (1),
	Рябины плоды	СФК (1)
	Смородины черной плоды	СФК (1)
	Черники обыкновенной плоды	СФК (2)

	Ольхи соплодия	СФК (1)
Кора	Дуба кора	«Здоровье» (3),
	Крушины кора	«Здоровье» (3),
Цветки	Ноготков цветки	«КРЛС» (3)
	Бессмертника цветки	«Здоровье» (3), «КРЛС» (2)
	Ромашки цветки	«Здоровье» (3)
Трава	Мелиссы лекарственной трава	«Здоровье» (1)
	Душицы трава	«Здоровье» (1)
	Чабреца трава	«Здоровье» (2)
	Зверобоя трава	«Здоровье» (3)
	Донника трава	«Здоровье» (3)
	Пустырника трава	«КРЛС» (2)
Листья	Шалфея листья	«КРЛС» (2)
	Мяты перечной листья	«Здоровье» (2)
	Крапивы листья	СФК (3), «КРЛС» (1)
Сборы	Сбор витаминный №1	СФК
	Сбор витаминный №2	СФК
	Сбор противогеморроидальный	СФК
Жидкие экстракты	Жидкий экстракт Левзеи	«Тульская ФФ» (2)
	Жидкий экстракт Элеутерококка	«Тульская ФФ» (2)
	Жидкий экстракт водяного перца	«Тульская ФФ» (2)
	Жидкий экстракт чабреца	Лабораторный образец (1)
	«Ротокан»	«Редкинский ОЗ» (2)
Комплексные препараты	«Тонзилгон»	«Редкинский ОЗ» (2)
	«Стоматофит»	«Тульская ФФ» (2)
Элексир	«Доппельгерц Нервотоник»	Queisser Pharma GmbH & Co. KG (Германия) (1)
Настойки	Настойка пустырника	«Тульская ФФ» (1)
	Настойка чабреца	Лабораторный образец (1)
	Настойка крапивы гомеопатическая матричная	Лабораторный образец (1)
	Настойка зверобоя	Лабораторный образец (1)
	Настойка календулы	«Тульская ФФ» (1)
Настои и отвары	Водные извлечения из перечисленных видов ЛРС	Лабораторные образцы

Примечание: СФК - сырьевой фонд кафедры; «Редкинский ОЗ» - ОАО Редкинский опытный завод; «Тульская ФФ» - ООО Тульская фармацевтическая фабрика, «Здоровье» - ЗАО фирма «Здоровье», «КРЛС» - ОАО «Красногорсклексредства»

Спектры поглощения извлечений из сырья и сборов снимали на спектрофотометрах Specord M 20, Specord M 40, (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 кислоту яблочную 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 осуществляли с использованием ультразвуковой ванны с рабочей частотой 35 кГц; влияния электрического напряжения - с помощью оригинального устройства (патент № 142485)

В качестве стандартных образцов (СО) при разработке методик были использованы: галловой кислоты, 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, стр.285 «Определение влажности лекарственного растительного сырья».

Плотность извлечений определяли по методике ГФ XI изд., в.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, стр.199, объем выборки составлял 5 образцов. Метрологические характеристики методик анализа:

X – среднее значение из числа повторностей $X = \frac{\sum_i^n x_i}{n}$;

P – доверительная вероятность $P = 95 \%$;

$t(P, f)$ – критерий Стьюдента;

S – стандартное отклонение $S = \sqrt{\frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})]^2}{F}}$;

$S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение среднего результата $S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$;

Δx – доверительный интервал $x \pm \Delta x = x + \frac{f(t, p) \cdot S}{\sqrt{n}}$

F – число степеней свободы;

E – относительная ошибка определения $E = \frac{\Delta x}{\bar{x}} \cdot 100$.

ГЛАВА 3. ТИТРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для количественного определения многих групп БАС в ЛРС и растительных препаратах используется титриметрия, чаще всего с применением индикаторов. Титриметрический метод анализа – один из самых распространенных и точных методов. Он отличается быстротой, возможностью автоматизации. Титриметрию можно использовать для определения достаточно малых содержаний аналита, применяя чувствительные инструментальные методы индикации точки завершения титриметрической реакции, например, посредством измерения рН. Ручное титрование сейчас используется главным образом тогда, когда требуется высокая точность, а число проб невелико. При анализе большого числа проб рациональнее автоматическое титрование. Для автоматизации титрования можно применять, в частности, измерение интенсивности окраски или рН раствора в сочетании с управляющей системой, которая в необходимый момент останавливает подачу титранта. Для определения содержания титруемого аналита используют общие положения о законе эквивалентов.

В титриметрическом анализе к протекающим реакциям предъявляется ряд требований (с. 42), в том числе уравнение протекаемой реакции должно быть известно и не должно протекать никаких побочных реакций (титриметрическая реакция должна быть специфичной).

Вследствие того, что в фармакогностическом анализе перечисленные требования далеко не всегда соблюдаются вследствие многокомпонентности сырья, делаются определенные допущения и приближения, например, пересчет на определенное вещество, являющиеся, чаще всего, доминирующим компонентом состава. Так, при титровании дубильных веществ, согласно общей фармакопейной статье, проводят существенное разбавление экстракта, чтобы снизить концентрацию мешающих соединений – флавоноидов, антраценпроизводных и других окисляемых соединений.

Затем, при расчетах, делают допущение, что все дубильные вещества представлены танином или кислотой галловой.

Аналогично поступают и при титровании суммы органических кислот в плодах шиповника. Так как содержание кислот в плодах шиповника велико, то содержанием фенольных соединений, титрующихся натрием гидроксидом, пренебрегают. Содержание органических кислот рассчитывают с использованием титра кислоты яблочной, то есть условно допускают, что все кислоты представлены кислотой яблочной.

Крайне редко в фармакогностическом анализе применяется потенциометрия, имеющая ряд преимуществ. Потенциометрическое титрование позволяет проводить анализ интенсивно окрашенных извлечений из ЛРС и лекарственных растительных препаратов, что повышает точность анализа в виду отсутствия необходимости существенного разведения.

Изменчивость количественного содержания различных групп БАС в ЛРС, обусловленная условиями произрастания растения, может вызвать изменение физических и химических характеристик извлечений, например, цвета, значения рН, появления опалесценции или осадка и т.д. [3,4]. Эти факторы могут повлиять на точность титриметрического анализа с использованием индикаторов из-за ошибки, связанной с чувствительностью человеческого глаза и несоответствия цвета анализируемого экстракта в конечной точке титрования, указанному в нормативной документации. Подобных проблем можно избежать при потенциометрическом установлении эквивалентного объема. Кроме того, потенциометрическая методика предусматривает возможность автоматизации процесса титрования (использование автоматических титраторов с потенциометрическим детектором конечной точки титрования).

3.1. Применение потенциометрии для количественного определения дубильных веществ

Большой группой БАС, присутствующих практически во всех видах ЛРС и обуславливающие фармакологическую активность, являются дубильные вещества. Они оказывают вяжущее, противовоспалительное, антимикробное действие. Для количественного определения дубильных веществ в ЛРС ГФ РФ предусматривает титрование перманганатом калия в присутствии индикатора индигосульфокислоты после разведения экстракта в 20 раз до появления золотисто-желтого цвета. Изменение окраски в процессе титрования происходит плавно от интенсивно синей через сине-зеленую, изумрудную, зеленую, болотно-зеленую, желто-зеленую, грязно-желтую до золотисто-желтой и при дальнейшем добавлении титранта не изменяется. В связи со схожестью цветовой гаммы оттенков желтого цвета и неизменности окраски извлечения при перетитровании, установление конечной точки титрования часто бывает затруднительным.

3.1.1 Потенциометрическое титрование в анализе лекарственного растительного сырья с высоким содержанием дубильных веществ

Государственная фармакопея предлагает стандартизацию по содержанию суммы дубильных веществ в пересчете на танин в следующих видах лекарственного растительного сырья: корневищах змеевика, корневищах и корнях кровохлебки, коре дуба, корневищах лапчатки, листья сумаха и др. Для анализа возможности применения потенциометрического детектирования конечной точки титрования, были выбраны некоторые из них. Под высоким содержанием дубильных веществ в данном случае условно принято количество не менее 8% от массы сухого сырья, т.к. это минимальное нормируемое по ГФ содержание этой группы БАС в ЛРС.

Потенциометрическое определение дубильных веществ в коре дуба.

В основу разрабатываемой потенциометрической методики была положена фармакопейная методика определения содержания суммы

дубильных веществ в ЛРС: около 2 г (точная навеска) сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 500 мл, наливали 250 мл нагретой до кипения воды и кипятили с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждали до комнатной температуры и фильтровали около 100 мл в коническую колбу вместимостью 200-250 мл через ватный фильтр.

Далее по методике ГФ необходимо отобрать 25 мл полученного извлечения в другую коническую колбу вместимостью 750 мл и прибавить 500 мл воды, 25 мл индигосульфокислоты и титровать при постоянном перемешивании раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания. Для большей точности анализа нами предложено проводить разбавление извлечения в мерной колбе вместимостью 500 мл. Это способствует получению более точных результатов в связи с проведением эксперимента в одинаковых условиях при серийном анализе.

Параллельно необходимо провести контрольный опыт. Для этого берут 25 мл индигосульфокислоты, прибавляют 500 мл воды и титруют калия перманганатом (0,02 М) до золотисто-желтого окрашивания.

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в процентах (X) в абсолютно сухом сырье, определяемое по фармакопейной методике, вычисляется по формуле:

$$X(\%) = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

Где V - объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, мл; V₁ - объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), пошедшего на титрование в контрольном опыте, мл; 0,004157 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) (в пересчете на танин), г; m - масса навески сырья, г; W- потеря в массе при высушивании сырья, %; 250 - общий объем извлечения, мл; 25 - объем извлечения, отобранного для титрования, мл.

Нами предложено устанавливать точку эквивалентности потенциометрически. Для этого в химический стакан с помощью пипетки отмеряли 50 мл полученного раствора, опускали стеклянный и хлорсеребряный электроды, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере и титровали 0,02 М раствором калия перманганата. После установления равновесия фиксировали значения ЭДС, по полученным результатам строили интегральные и дифференциальные кривые титрования (рис. 2,3), по которым устанавливали объем раствора калия перманганата, израсходованного на титрование извлечения.

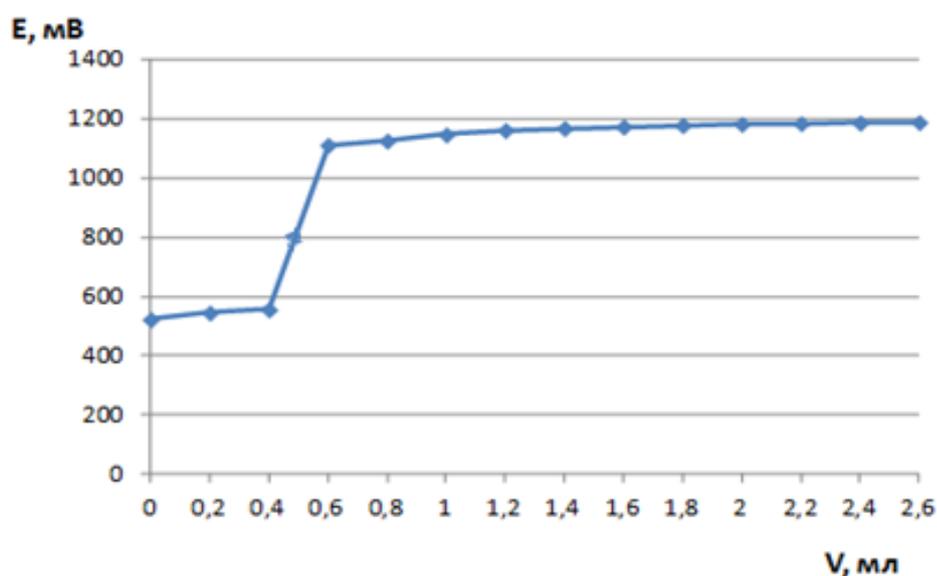


Рис.2. Интегральная кривая титрования извлечения из коры дуба раствором калия перманганата (0,02 М).

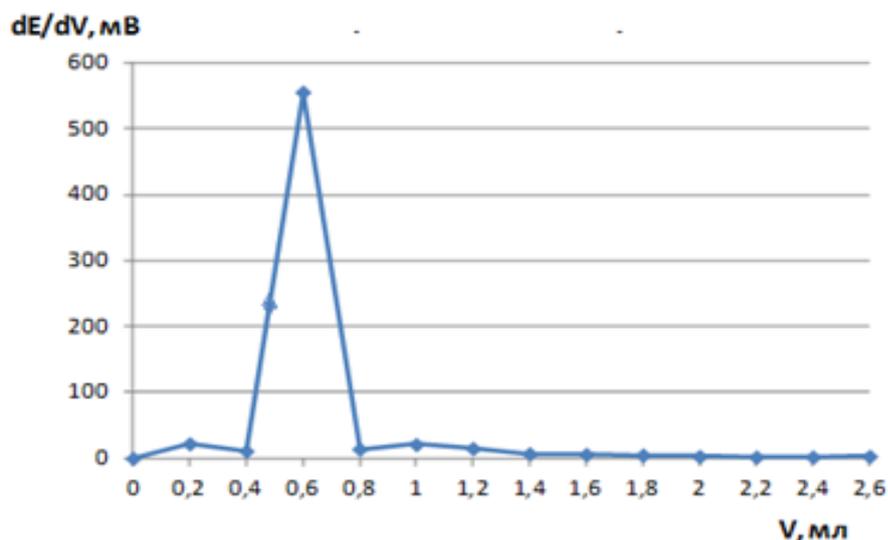


Рис.3. Дифференциальная кривая титрования извлечения из коры дуба раствором калия перманганата (0,02 М).

Методика потенциометрического определения дубильных веществ в ЛРС: точную навеску сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, массой около 2 г, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 500 мл, приливают 250 мл воды очищенной, нагретой до кипения, и кипятят 30 минут с обратным холодильником. Затем извлечение охлаждают, фильтруют около 100 мл через ватный фильтр в другую коническую колбу вместимостью 200-250 мл. Отбирают 25 мл полученного извлечения в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляют 25 мл 5% раствора кислоты серной, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А).

В химический стакан с помощью пипетки отмеряют 50 мл раствора А, погружают рабочий электрод - стеклянный и электрод сравнения - хлорсеребряный, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Титруют 0,02 М раствором калия перманганата с помощью микробюретки, перемешивая реакционную смесь магнитной мешалкой. После установления равновесия фиксируют значения ЭДС, по полученным результатам строят кривые титрования в координатах $E=f(V)$. Для более точного определения

точки эквивалентности титрования строят дифференциальные кривые $dE/dV=f(V)$.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин и абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,004157 \cdot K \cdot 250 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

Где V - объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), пошедшего на титрование извлечения, мл; 0,004157 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) (в пересчете на танин), г; K - поправка на титр (по щавелевой кислоте); m - масса сырья, г; 20-разбавление; W - потеря в массе при высушивании сырья, %; 250 - общий объем извлечения, мл; 25 - объем извлечения, отобранного для титрования, мл.

Данные, полученные титрованием с использованием индикатора и потенциометрическим методом, на примере содержания дубильных веществ в коре дуба, представлены в табл. 10 .

Таблица 10. Содержание суммы дубильных веществ в коре дуба ($n=5, p=0,95$)

Объект исследования	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %	
	Потенциометрическое титрование	Методика ГФ
Кора дуба	9,078 ± 0,005	9,080 ± 0,010

Для доказательства правомерности использования потенциометрического титрования в анализе дубильных веществ в лекарственном растительном сырье была проведена валидация предложенной методики.

**Валидация методики потенциометрического титрования суммы
дубильных веществ в коре дуба**

1) Специфичность.

Аналитическая методика может считаться специфичной, если доказано, что результат анализа не искажается влиянием: растворителя, используемого при пробоподготовке, реактивов, компонентов плацебо (смесь всех ингредиентов лекарственного препарата без фармацевтической субстанции) [1].

При валидации методик анализа ЛРС имеются некоторые особенности, связанные с многокомпонентностью состава. Все общепринятые методики, используемые при стандартизации ЛРС по сумме БАС, не обладают абсолютной специфичностью из-за присутствия одинаковых функциональных групп у определяемых и сопутствующих соединений. В связи с преобладанием анализируемых соединений и малым, по сравнению с ними, количеством «мешающих» веществ, этим фактом можно пренебречь. Другой проблемой является невозможность получения плацебо в большинстве случаев, так как извлекается сумма БАС и удалить какую-либо одну группу соединений из извлечения нельзя. Поэтому в качестве плацебо можно использовать лишь экстрагент.

Специфичность методики доказывали, сравнивая объемы израсходованного титранта при титровании:

- плацебо (экстрагента – воды) (рис. 4);
- действующего вещества (танина) (рис. 5);
- извлечения коры дуба (рис.6).

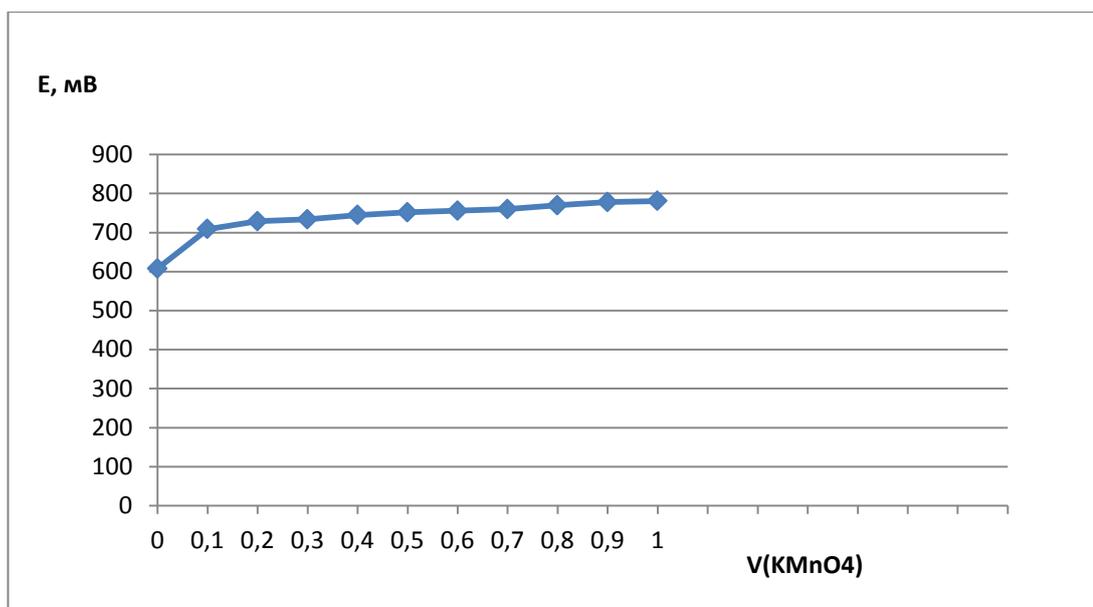


Рис.4. Кривая титрования экстрагента – воды, используемой при пробоподготовке, включая использованные реактивы (кислоту серную) раствором калия перманганата (0,02 М).

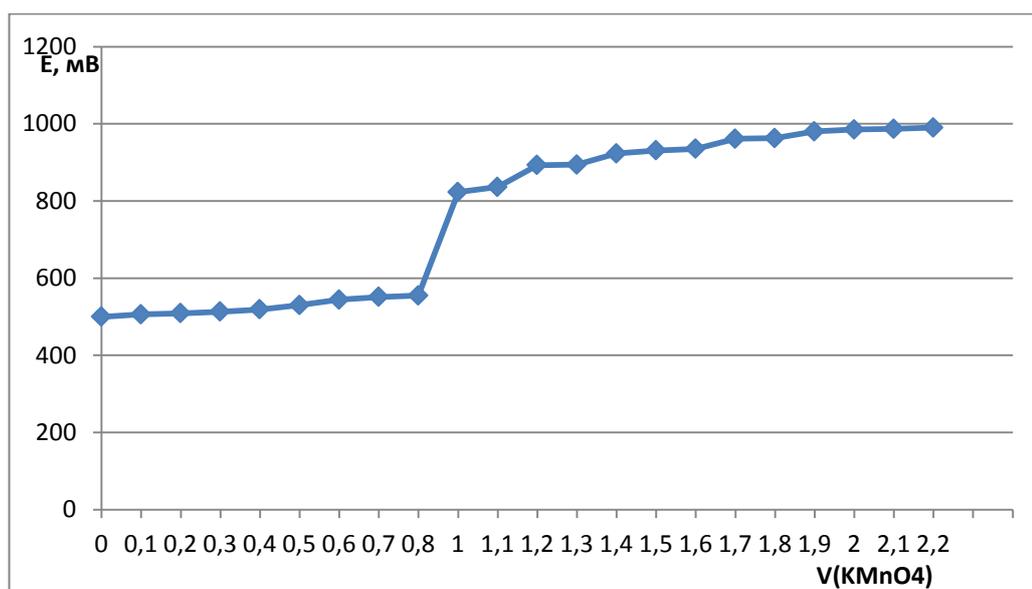


Рис.5. Кривая титрования раствора танина раствором калия перманганата (0,02 М).

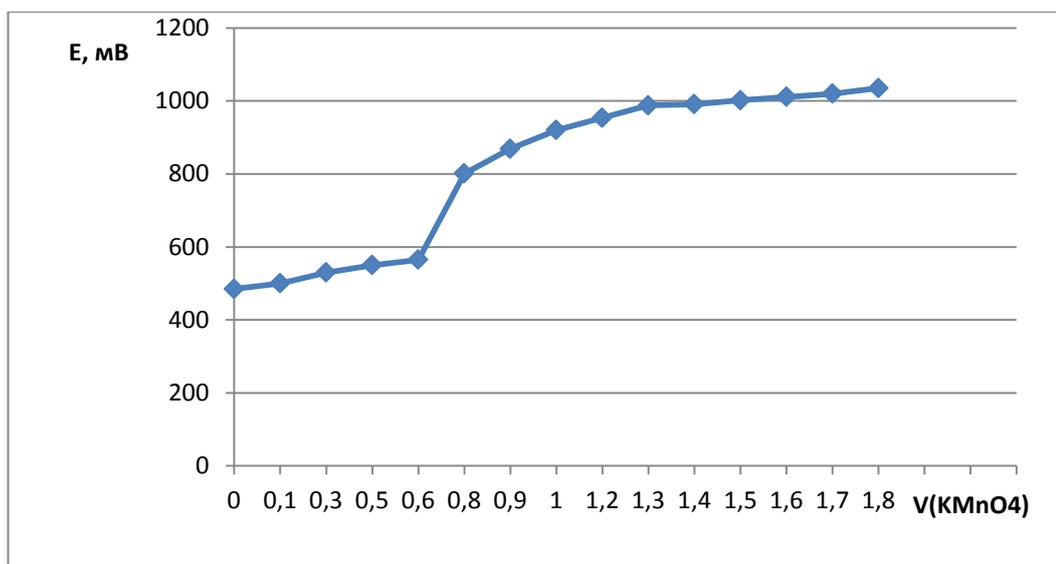


Рис.6. Кривая титрования извлечения из коры дуба раствором калия перманганата с концентрацией 0,02 М.

2) *Линейность.*

Линейность возможно доказать анализируя исследуемый раствор с пятью различными концентрациями с содержанием анализируемого вещества в растворе в диапазоне концентраций 80-120%. Линейность оценивается при помощи уравнения регрессии методом наименьших квадратов.

Проводилось 7 определений величины объема титранта, пошедшего на титрование испытуемого раствора. Измерения по вышеприведенной методике осуществляли для 7 вариантов навесок в пределах разброса значений массы навески одной серии коры дуба $\pm 25\%$. Полученные данные представлены в табл. 11.

Таблица 11. Зависимость расхода титранта (раствора калия перманганата 0,02М) от массы навески коры дуба

Масса навески коры дуба, г	1,1587	1,5503	1,7605	2,0828	2,2613	2,5505	2,7837
Объем титранта, мл	0,30	0,45	0,50	0,60	0,65	0,70	0,80

Полученные данные показывают линейную зависимость, описываемую уравнением регрессии первой степени. Рассчитанный коэффициент корреляции равен 0,99. Критерий приемлемости соблюден.

3) *Диапазон применения*

Диапазон применения включает в себя доказательство линейности, правильности и прецизионности. В случае, когда данные валидационные характеристики подтверждены, дальнейшие исследования в рамках диапазона применения не требуются.

4) *Правильность*

Для доказательства правильности методики использовали метод добавок, отклик определялся путем добавления действующего вещества – танина к исследуемому образцу (извлечению) с известной концентрацией танина. Так как отклик пропорционален добавленному количеству танина, то это однозначно доказывает, что определяется именно танин (сумма дубильных веществ в пересчете на танин).

Извлечение коры дуба, полученное по методике 1 (раствор Б) содержит 70% выбранной концентрации в пробе (10,38%); затем добавками содержание танина доводили до 80,100,120%. Для определения правильности проводили 9 испытаний с 3 концентрациями в выбранном диапазоне применения методики. Оценка проводилась путем расчета процента определения известного добавленного количества действующего вещества, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($p=0,95$). Полученные результаты и метрологические характеристики представлены в табл. 12 и 13.

Таблица 12. Правильность методики потенциометрического определения содержания дубильных веществ в коре дуба

<i>Уровень содержания, %</i>	<i>Масса танина, мг</i>	<i>Расход титранта, мл</i>	<i>Определенное содержание танина, %</i>	<i>Заданное значение, %</i>	<i>Отклик, %</i>
80	2,8	0,65	2,7	2,8	103,7
80	2,9	0,70	2,9	2,9	100,0
80	2,9	0,70	2,9	2,9	100,0
100	3,3	0,85	3,5	3,3	94,3
100	3,2	0,75	3,1	3,2	103,2
100	3,3	0,80	3,3	3,3	100,0
120	3,5	0,85	3,5	3,5	100,0
120	3,7	0,95	3,9	3,7	94,8
120	3,6	0,90	3,7	3,6	97,3

Таблица 13. Статистические характеристики методики потенциометрического определения содержания дубильных веществ в коре дуба

Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение	100,1
Значение стандартного отклонения	0,54
Значение коэффициента вариации	0,54
Доверительный интервал - нижняя граница (P=95%)	99,2
Доверительный интервал - верхняя граница (P=95%)	100,8

5) *Прецизионность*

а) *сходимость (повторяемость)*

Повторяемость аналитической методики доказывалась на 6 пробах с концентрацией исследуемого вещества в анализируемом растворе, равной 100%. Оценку и расчет результатов проводили путем вычисления среднего значения, коэффициента вариации и доверительного интервала. Полученные данные представлены в табл. 14, метрологические характеристики – в табл.15.

Таблица 14. Повторяемость потенциометрического титрования извлечения из коры дуба раствором калия перманганата (0,02 М)

Масса навески, г	2,0128	2,0322	2,0443	2,0718	2,0794	2,0828	2,1000	2,1023	2,1046
Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %	8,5	8,6	8,6	8,7	8,8	8,8	8,8	8,9	8,9

Таблица 15. Метрологические характеристики проверки повторяемости

Среднее арифметическое X_{cp}	Стандартное отклонение S	Доверительная вероятность P	Критерий Стьюдента (P, f)	Доверительный интервал Δx	Относительная погрешность ϵ %	Коэффициент вариабельности, RSD
8,7	0,14	95	2,36	0,09	1,06	1,62

Относительная погрешность полученных результатов меньше 2,5% ($\epsilon=1,06\%$), следовательно, критерий приемлемости соблюден.

б) Промежуточная прецизионность.

Проверка этой валидационной характеристики была проведена в аналитической лаборатории фирмы – производителя ЛРС и лекарственных растительных препаратов. При этом учитывалась типичная ситуация для лаборатории - смена сотрудников. Результаты представлены в табл.16.

Таблица 16. Результаты определения содержания суммы дубильных веществ в коре дуба при смене провизоров – аналитиков

Масса навески, %	2,0128	2,0343	2,0718	2,0778	2,0894	2,1000	2,1012	2,1036	2,1046
Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %	8,5	8,6	8,7	8,7	8,7	8,8	8,8	8,9	8,9

Метрологические характеристики методики потенциометрического определения содержания дубильных веществ в процентах (X) в сырье в пересчете на танин и абсолютно сухое в одной серии коры дуба для изучения внутрилабораторной точности приведены в табл. 17.

Таблица 17. Метрологические характеристики методики потенциометрического определения содержания дубильных веществ в коре дуба при смене провизоров – аналитиков

Среднее арифметическое X_{cp}	Стандартное отклонение S	Доверительная вероятность P	Критерий Стьюдента $t(P, f)$	Доверительный интервал Δx	Относительная погрешность $\varepsilon \%$	Коэффициент варибельности, RSD
8,7	0,13	95	2,36	0,09	1,0	1,5

Так как коэффициент варибельности RSD равен 1,5 (меньше 5%), то критерий приемлемости соблюден.

Разработанная методика потенциометрического определения суммы дубильных веществ в пересчете на танин была использована для анализа следующих видов ЛРС, содержащего дубильные вещества как доминирующую группу: корневища и корни лапчатки, корневища змеевика, плоды черники, корневища бадана, соплодия ольхи.

В процессе обработки данных эксперимента строили интегральные (рис.7) и дифференциальные (рис.8) кривые титрования.

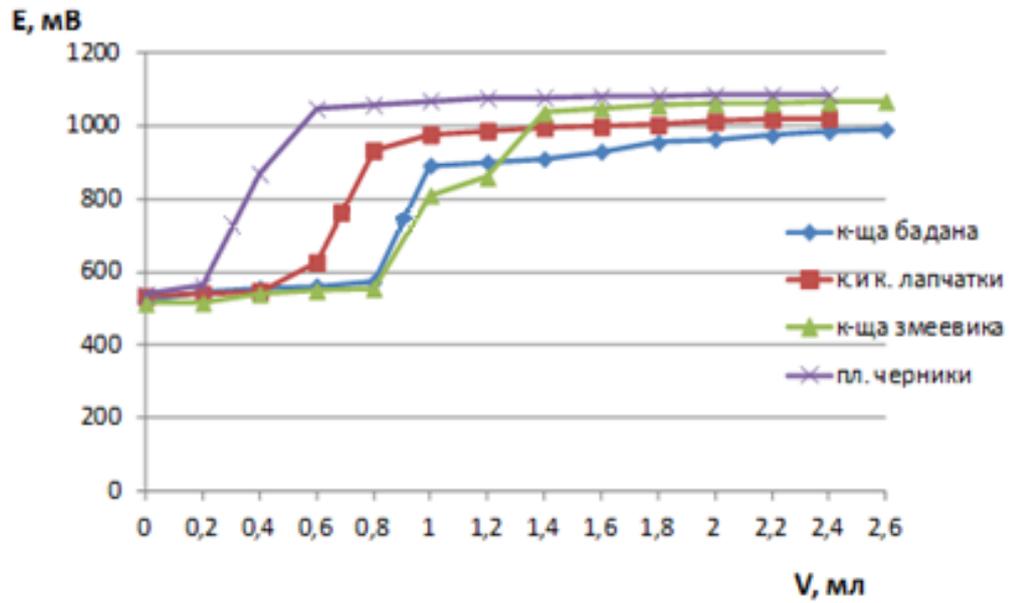


Рис.7. Интегральные кривые потенциметрического титрования дубильных веществ в ЛРС.

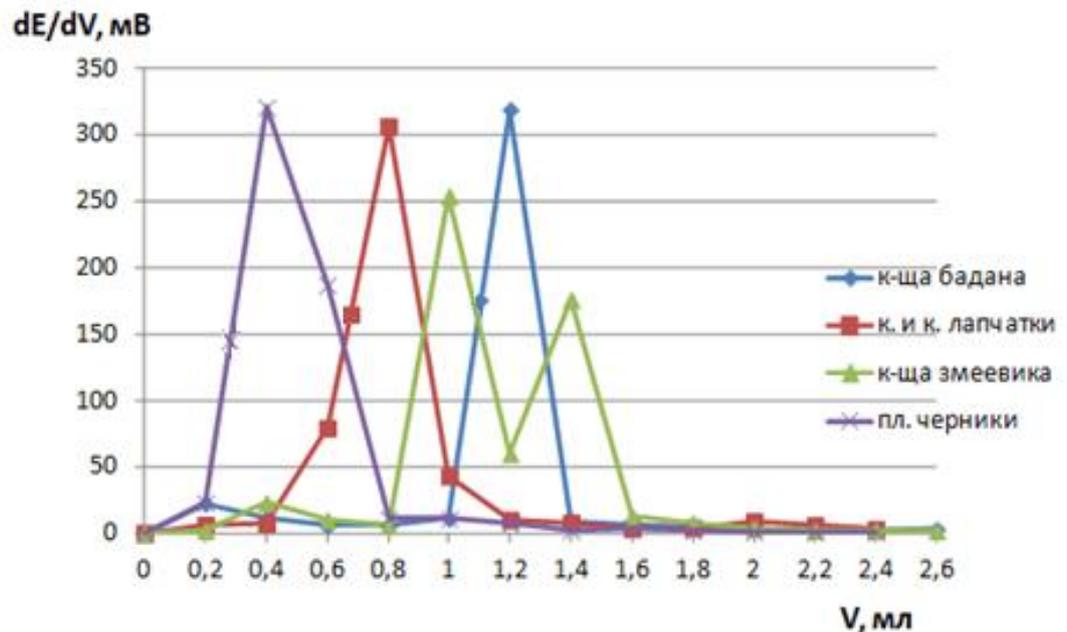


Рис.8. Дифференциальные кривые потенциметрического титрования дубильных веществ в ЛРС.

Анализ полученных кривых титрования показал возможность использования потенциметрического титрования в анализе объектов исследования. Построение дифференциальных кривых титрования позволило четко определить эквивалентный объем.

На дифференциальной кривой титрования извлечения из корневищ змеевика присутствуют два скачка, что, возможно, соответствует изменению потенциала при титровании гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ. Первый скачок на дифференциальной кривой титрования происходит при значении, близком к значению скачков потенциалов на дифференциальных кривых титрования извлечения коры дуба и корневищ и корней лапчатки, в которых согласно качественным реакциям и литературным данным преимущественно преобладают гидролизуемые дубильные вещества. Кроме того, сравнивая стандартные окислительно-восстановительные потенциалы глюкозы и галловой кислоты (составляющих танина) и катехина, можно отметить, что первым будет окисляться танин, а затем катехин [65]. Последний, обладая структурой сопряженных колец окисляется, образуя хиноидные структуры.

Принимая во внимание вышеизложенные доводы, пересчет содержания суммы гидролизуемых дубильных веществ возможно проводить на танин, а суммы конденсированных - на катехин. Для этого теоретически был установлен титр катехина по калию перманганату (0,02 М). Таким образом, расчетная формула будет следующая:

$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,0004677 \cdot K \cdot 250 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

Где V - объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; 0,0004677 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на катехин), г; W- потеря в массе при высушивании сырья, %; K- поправка на титр (по щавелевой кислоте); m - масса сырья, г; 20 - разбавление; 25 - объем извлечения, взятого для титрования, мл; 250 - общий объем извлечения, мл.

Таким образом, в отличие от методики ГФ, потенциометрическое титрование дает возможность судить о накоплении различных групп

дубильных веществ при их совместном присутствии в значимых количествах.

Результаты, полученные потенциометрическим титрованием в сравнении с данными, полученными по методике ГФ, представлены в табл. 18.

Таблица 18. Результаты количественного определения дубильных веществ потенциометрическим титрованием и по методике ГФ ($n=5$, $p=0,95$)

Объект исследования	Содержание дубильных веществ, %		Норма по НД, %
	Потенциометрическое титрование	Методика ГФ	
Корневища лапчатки	$21,78 \pm 0,04$	$24,27 \pm 0,41$	Не менее 20
Корневища змеевика	$19,28 \pm 0,04$ <i>Гидролиз. 16,66</i> <i>Конденсир. – 2,62</i>	$21,52 \pm 0,40$	Не менее 15
Плоды черники	$3,63 \pm 0,02$	$5,44 \pm 0,32$	---
Корневища бадана	$32,67 \pm 0,05$	$33,25 \pm 0,24$	Не менее 20
Соплодия ольхи	$20,95 \pm 0,04$	$21,02 \pm 0,22$	Не менее 20

Выявленная возможность определения в ЛРС содержания двух групп дубильных веществ с помощью потенциометрического титрования потребовала внесения коррективы в методику.

Методика потенциометрического титрования дубильных веществ в ЛРС будет следующая. Около 2 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, приливают 250 мл воды очищенной и кипятят 30 минут с обратным холодильником. Затем охлаждают, процеживают через ватный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Отбирают 25 мл полученного извлечения в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляют 25 мл 5% кислоты серной, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А).

В химический стакан с помощью пипетки отмеряют 50 мл раствора А, опускают рабочий - стеклянный электрод и электрод сравнения -

хлорсеребряный, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Титруют 0,02 М раствором калия перманганата с помощью микробюретки при постоянном перемешивании магнитной мешалкой, добавляя по 0,2 мл титранта. После установления равновесия фиксируют значения ЭДС, по полученным результатам строят дифференциальные кривые титрования в координатах $dE/dV = f(V)$.

Содержание суммы дубильных веществ гидролизуемой группы (первый скачок на кривой титрования) в пересчете на танин и абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,004157 \cdot K \cdot 250 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

Содержание суммы дубильных веществ конденсированной группы (второй скачок на кривой титрования) в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,0004677 \cdot K \cdot 250 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 50 \cdot (100 - W)}$$

Где V– объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), пошедшего на титрование, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; 0,0004677 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на катехин), г; 250 – общий объем извлечения, мл; K- поправка на титр (по кислоте щавелевой); 20 - разведение; m–масса сырья, г; 25 – объем извлечения, отобранного для титрования, мл; W- потеря в массе при высушивании сырья, %.

3.1.2. Потенциометрическое титрование в анализе лекарственного растительного сырья с низким содержанием дубильных веществ

Для анализа было выбрано сырье лекарственных растений: мяты перечной, Melissa лекарственной, шалфея лекарственного, чабреца, зверобоя продырявленного, донника лекарственного, которое используется для приготовления настоев, а стандартизуется, согласно ГФ XI изд. по соединениям, не входящим в состав гидрофильной фракции, за исключением травы зверобоя (табл.19).

Таблица 19. Стандартизация ЛРС по ГФ XI изд.

ЛРС	Числовой показатель	Норма
Листья мяты перечной	Эфирного масла	не менее 1%
Трава чабреца	Экстрактивных веществ, извлекаемых 30% спиртом	не менее 18%
Листья шалфея	Эфирного масла	не менее 0,8%
Трава Melissa	Экстрактивных веществ, извлекаемых 24% спиртом	не менее 12%

Согласно литературным данным представители семейства яснотковых (мята перечная, шалфей лекарственный, чабрец и Melissa лекарственная) содержат дубильные вещества [24,56,69] в количествах, меньше 8%. Поэтому условно эти виды ЛРС были отнесены к сырью с низким содержанием дубильных веществ. В траве зверобоя дубильные вещества являются второй группой БАС, обуславливающей вяжущие свойства препаратов.

Определение суммы дубильных веществ в сырье мяты, Melissa, чабреца, зверобоя и шалфея проводили по методике ГФ и потенциометрически. Вследствие более низких концентраций дубильных веществ в анализируемых объектах по сравнению с ЛРС, стандартизирующимся по сумме дубильных веществ, аликвоты для потенциометрического титрования, составили по 100 мл. Интегральные и дифференциальные кривые титрования на примере листьев мяты перечной и травы Melissa представлены на рис. 9 и 10 соответственно. Для листьев шалфея и травы чабреца кривые титрования аналогичны.

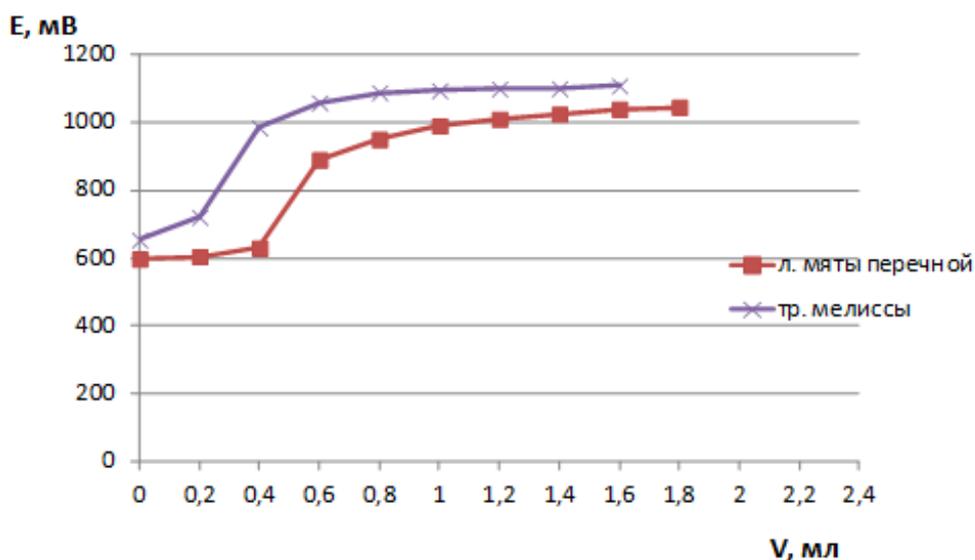


Рис.9. Интегральные кривые потенциметрического титрования дубильных веществ в ЛРС.

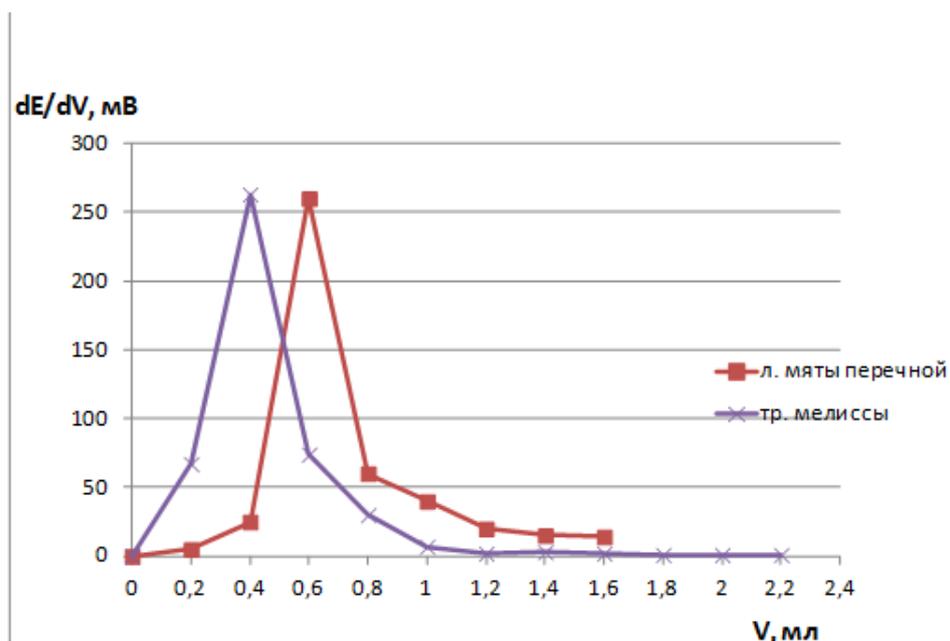


Рис.10. Дифференциальные кривые потенциметрического титрования дубильных веществ в ЛРС.

Вид кривых титрования указывает на то, что в анализируемых объектах содержание дубильных веществ невелико по сравнению с ЛРС, рассмотренным выше (сырье дуба, змеевика и т.д.), ввиду менее резкого скачка титрования и большим значением начальной ЭДС.

Кривые титрования травы зверобоя представлены на рис. 11.

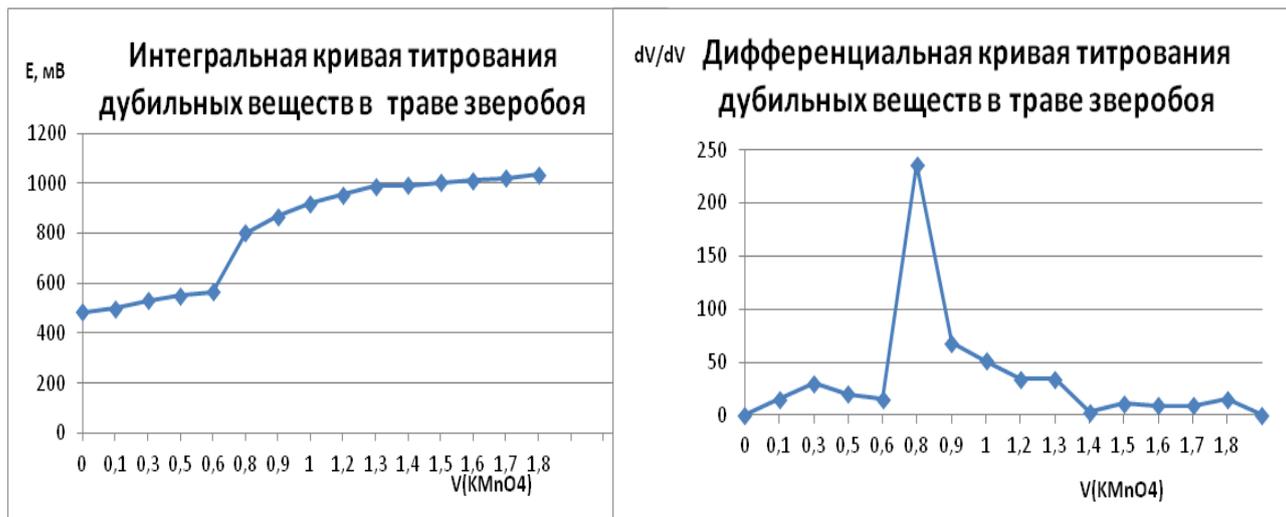


Рис.11. Кривые потенциметрического титрования дубильных веществ в траве зверобоя.

Результаты потенциметрического титрования дубильных веществ в ЛРС представлены в табл. 20.

Таблица 20. Содержание суммы дубильных веществ в ЛРС ($n=5, p=0,95$)

ЛРС	Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин и абсолютно сухое сырье, %	
	Потенциметрическое титрование	Методика ГФ
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
Трава зверобоя	8,87±0,08	8,86±0,14
Трава донника	нет скачка титрования	0,061±0,005

В результате исследования установлено, что трава зверобоя содержит большое количество дубильных веществ; результаты их определения хорошо воспроизводятся и имеют существенное сходство с данными, полученными

титрованием с использованием индикатора. Данная методика может быть рекомендована для включения в НД, поэтому на следующем этапе была проведена валидация потенциометрического титрования дубильных веществ в траве зверобоя.

В траве донника лекарственного скачка титрования не было (начальный потенциал составил 820 мВ). Результаты анализа по методике ГФ содержат большую ошибку, что свидетельствует о крайне низком содержании дубильных веществ в сырье.

Валидация методики потенциометрического определения дубильных веществ в траве зверобоя

1. Специфичность

Для доказательства специфичности проводили титрование растворителя – воды очищенной, которая в данном случае является плацебо (рис. 12), модельной смеси (рис. 13) и действующего вещества (танина) (рис.14).

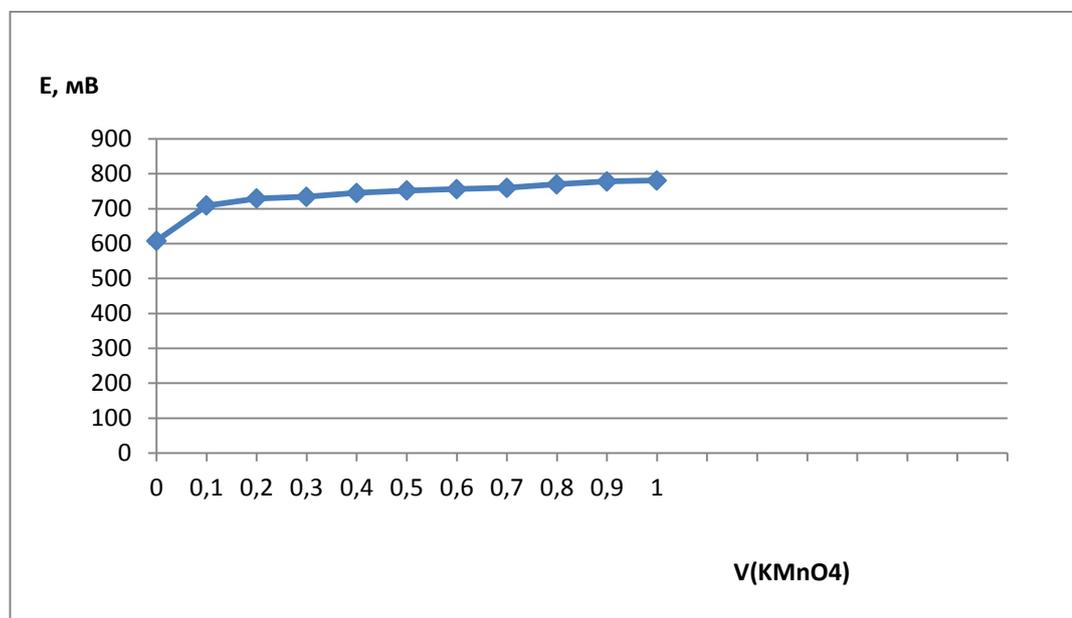


Рис.12. Кривая титрования воды 0,02 М раствором калия перманганата.

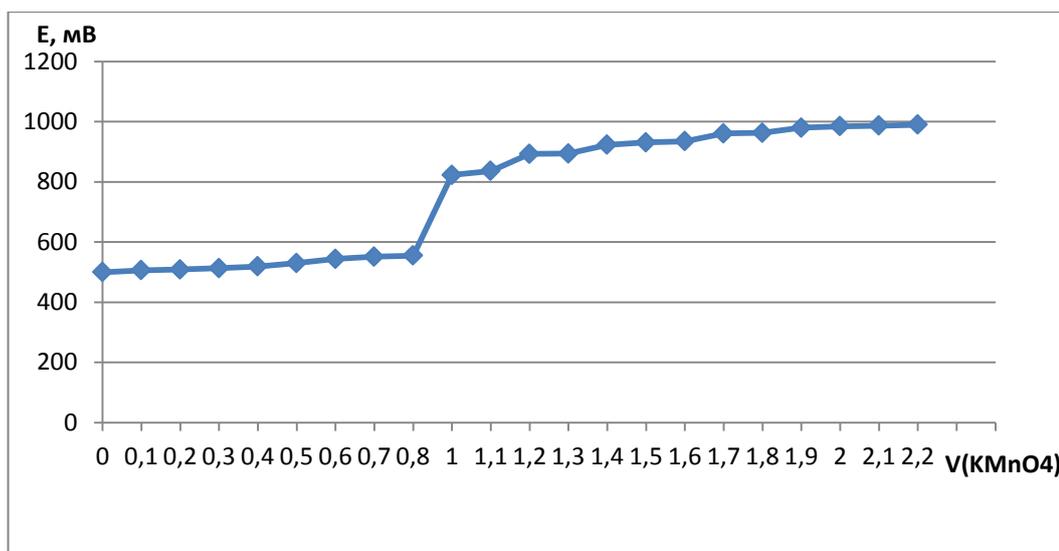


Рис.13. Кривая титрования раствора танина (модельный опыт) 0,02 М раствором калия перманганата.

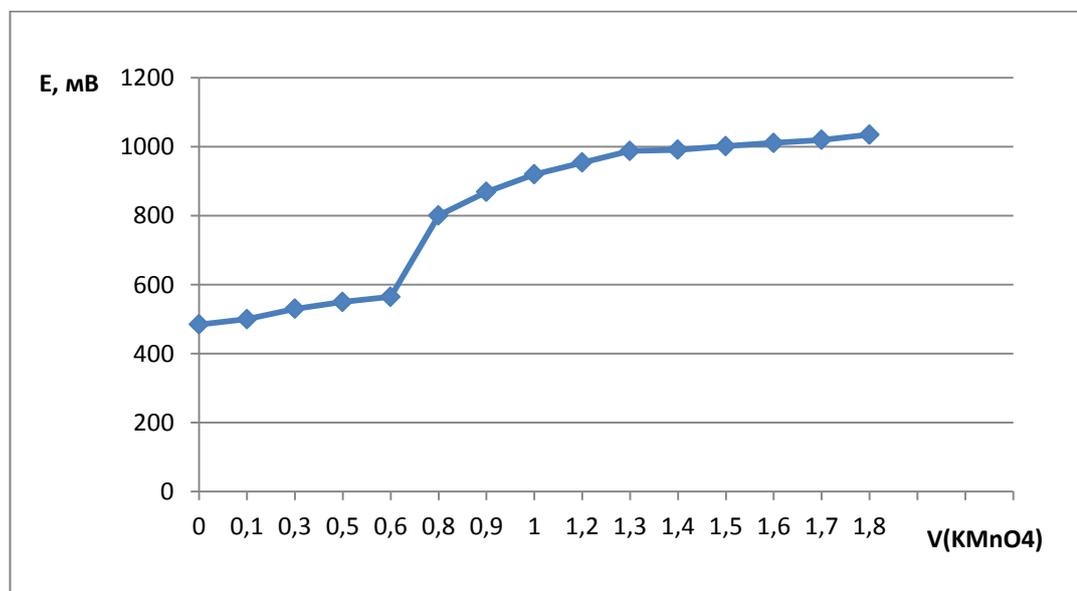


Рис.14. Кривая титрования дубильных веществ в траве зверобоя 0,02 М раствором калия перманганата.

2. Диапазон применения

Внутри заданного диапазона применения аналитической методики должны быть показаны правильность, линейность и прецизионность.

3. Линейность

Линейность доказывалась на 5 разных разведениях модельной смеси: 0,295 г/л, 0,146 г/л, 0,097 г/л, 0,073 г/л, 0,058 г/л.

Таблица 21. Линейность потенциометрического титрования суммы дубильных веществ

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y = 0,04515 + 11,463X$
Наклон a	0,04515
Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал	11,463
Коэффициент корреляции r	0,9999

4. Правильность

Правильность была показана путём определения отклика по методу с добавками. Результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22. Правильность потенциометрического титрования дубильных веществ

Уровень концентрации	m танина, г	V_{KMnO_4} , мл	% теор.	% практ.	Отклик
80%	$4,33 \cdot 10^{-3}$	0,9	$4,33 \cdot 10^{-3}$	$3,74 \cdot 10^{-3}$	86,4%
80%	$4,33 \cdot 10^{-3}$	1	$4,33 \cdot 10^{-3}$	$4,33 \cdot 10^{-3}$	100%
80%	$4,33 \cdot 10^{-3}$	1,1	$4,33 \cdot 10^{-3}$	$4,57 \cdot 10^{-3}$	105,5%
90%	$6,33 \cdot 10^{-3}$	1,4	$6,33 \cdot 10^{-3}$	$5,82 \cdot 10^{-3}$	92%
90%	$6,33 \cdot 10^{-3}$	1,6	$6,33 \cdot 10^{-3}$	$6,65 \cdot 10^{-3}$	105%
90%	$6,33 \cdot 10^{-3}$	1,6	$6,33 \cdot 10^{-3}$	$6,65 \cdot 10^{-3}$	105%
100%	$8,33 \cdot 10^{-3}$	2,4	$8,33 \cdot 10^{-3}$	$9,98 \cdot 10^{-3}$	119,8%
100%	$8,33 \cdot 10^{-3}$	2,2	$8,33 \cdot 10^{-3}$	$9,15 \cdot 10^{-3}$	109,8%
100%	$8,33 \cdot 10^{-3}$	2,1	$8,33 \cdot 10^{-3}$	$8,73 \cdot 10^{-3}$	104,8%

Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($p=95\%$) (табл. 23).

Таблица 23. Правильность потенциометрического титрования дубильных веществ, статистические характеристики

Статистические характеристики, %	Результат
Среднее значение	103,1
Стандартное отклонение	10,35
Коэффициент вариации (КВ)	10,04
Доверительный интервал - нижняя граница ($p=0,95$)	94,82
Доверительный интервал - верхняя граница ($p=0,95$)	111,38

5. Сходимость (повторяемость)

Сходимость была доказана при помощи испытаний 6 проб действующего вещества (табл. 24).

Таблица 24. Повторяемость потенциометрического титрования дубильных веществ

Проба	Расход 0,02 KMnO ₄ , мл	Содержание дубильных веществ, %
1	0,8	8,87
2	0,8	8,87
3	0,7	7,76
4	0,8	8,87
5	0,8	8,87
6	0,9	9,97

Оценка проводилась путем расчета процента содержания, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($p=95\%$) (табл. 25).

Таблица 25. Повторяемость потенциометрического титрования дубильных веществ, статистические характеристики

Статистические характеристики, %	Результаты
Наименьшее значение	7,76
Наибольшее значение	9,97
Среднее значение	8,868
Значение стандартного отклонения	0,7
Значение коэффициента вариации	7,89
Доверительный интервал	7,76-9,97

В результате проведения валидации были доказаны специфичность, линейность, диапазон применения, правильность и прецизионность методики потенциометрического титрования суммы дубильных веществ в траве зверобоя.

Необходимо отметить, что интегральные кривые титрования извлечения травы зверобоя и раствора чистого танина близки, что говорит о минимальном участии сопутствующих веществ в окислительно-восстановительной реакции.

3.1.3. Потенциометрическое определение дубильных веществ в отварах из лекарственного растительного сырья

Отвары готовили по методике, описанной на упаковке измельченного ЛРС, поскольку именно такую лекарственную форму получает пациент. Для приготовления отваров использовали измельченное ЛРС, просеянное сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм. Точные навески сырья массами около 20 г (коры дуба), 15 г (корневищ лапчатки), 10 г (корневищ змеевика и плодов черники) помещали в колбы вместимостью 500 мл, добавляли 200 мл воды и настаивали на кипящей водяной бане 15 мин (для корневищ лапчатки), 30 мин (для коры дуба, для корневищ змеевика и плодов черники). Извлечения охлаждали, фильтровали, объем растворов доводили до 200 мл в мерных колбах. Аликвоту отвара, равную 2,5 мл, переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 25 мл индигосульфокислоты и доводили водой до метки. Затем раствор переносили в коническую колбу вместимостью 750 мл и титровали 0,02 М раствором калия перманганата до появления золотисто-желтого окрашивания.

Расчет содержания дубильных веществ в отваре из лекарственного растительного сырья проводили по формуле:

$$X(\%) = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot V_2 \cdot 100}{2,5 \cdot m}$$

Где V – объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; V₁ – объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование в контрольном опыте, мл; 2,5 – объем отвара, взятого для титрования, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с

концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; V_2 — общий объем извлечения, мл; m – масса отвара, г, определенная пикнометрически.

Методика потенциометрического титрования дубильных веществ в отварах. Аликвоту отвара, полученного по методике, описанной на упаковке ЛРС, равную 2,5 мл переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 5 мл 5% кислоты серной, доводили водой до метки, перемешивали (раствор А). В мерный стакан с помощью пипетки отмеряли 25 мл раствора А, опускали рабочий - стеклянный электрод и электрод сравнения - хлорсеребряный, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Титровали 0,02 М раствором калия перманганата из микробюретки при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Фиксировали показания ЭДС, полученные результаты обрабатывали, строя кривые титрования в координатах $E = f(V)$ для определения точки эквивалентности. Интегральная и дифференциальная кривые титрования дубильных веществ на примере отвара коры дуба представлены на рис. 16 и 16 соответственно.

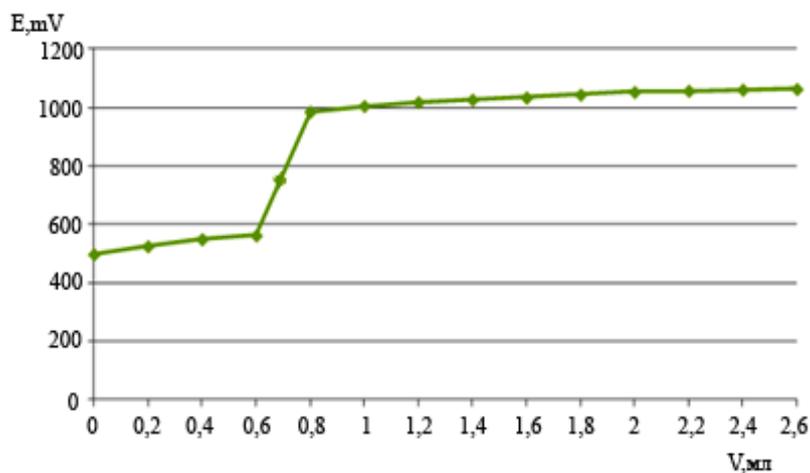


Рис. 15. Интегральная кривая титрования дубильных веществ в отваре коры дуба.

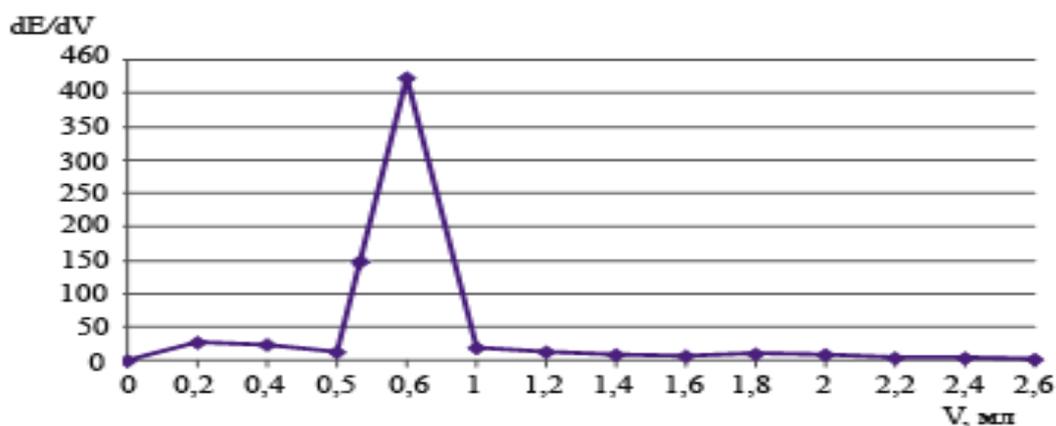


Рис. 16. Дифференциальная кривая титрования дубильных веществ в отваре коры дуба.

Содержание суммы дубильных веществ в отварах в пересчете на танин (в %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot 500 \cdot K \cdot V_2 \cdot 100}{a \cdot 2,5 \cdot m}$$

Где V_1 – объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; V_2 – общий объем извлечения, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; a – аликвота, мл; K - поправка на титр (по щавелевой кислоте); 2,5 – объем отвара, взятого для титрования, мл; m – масса отвара, определенная пикнометрически, г.

Данные по содержанию дубильных веществ в отварах представлены в табл.26.

Таблица 26. Содержание дубильных веществ в отварах из ЛРС ($n=5, p=0,95$)

Препарат	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %	
	Потенциометрия	Методика ГФ
Отвар коры дуба	2,59 ± 0,02	2,62 ± 0,04
Отвар корневищ лапчатки	1,96 ± 0,02	2,03 ± 0,03
Отвар корневищ змеевика	1,32 ± 0,02	1,40 ± 0,03
Отвар плодов черники	0,66 ± 0,01	0,74 ± 0,02

В связи с тем, что отвары разных видов ЛРС рекомендовано готовить с различным соотношением массы сырья и объема экстрагента, то для объективного сравнения содержания дубильных веществ в пересчете на танин в отваре, мы предлагаем выражать результаты в граммах, расчет проводить по формуле (для потенциометрического титрования):

$$X = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot K \cdot 500 \cdot V_2}{a \cdot 2,5}$$

Где V_1 – объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; 2,5 – объем отвара, взятого для титрования, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; V_2 – общий объем отвара, мл; K- поправка на титр (по щавелевой кислоте); а– аликвота.

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, в отваре в граммах представлено в табл. 27.

Таблица 27. Содержание дубильных веществ в отварах из ЛРС ($n=5, p=0,95$)

Препарат	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, г
Отвар коры дуба	5,32 ± 0,03
Отвар корневищ лапчатки	3,99 ± 0,02
Отвар корневищ змеевика	2,66 ± 0,02
Отвар плодов черники	1,33 ± 0,02

Полученные результаты показали, что потенциометрия дает более точные результаты с меньшей величиной ошибки и может применяться для анализа содержания дубильных веществ в отварах. Более удобным способом обработки результатов по содержанию БАС в водных извлечениях является

расчет их содержания в граммах, что позволяет сравнивать данные независимо от способа приготовления извлечения, а также определять разовые и суточные дозы действующих веществ при приеме лекарственной формы внутрь.

3.1.4. Потенциометрическое определение дубильных веществ в настоях из лекарственного растительного сырья

Анализ возможности использования потенциометрического титрования при определении содержания суммы дубильных веществ в настоях проводили для следующих видов ЛРС: трава зверобоя, цветки бессмертника, цветки ромашки аптечной, листья шалфея, трава пустырника, листья мяты перечной, трава мелиссы, трава чабреца. Настои готовили в соответствии с инструкциями по применению ЛРС, указанными на пачке. Условия приготовления настоев представлены в табл. 28.

Таблица 28. Условия приготовления настоев

ЛРС	Количество сырья и экстрагента	Соотношение сырья и экстрагента
Листья мяты перечной	5 г сырья (одна столовая ложка) на 200 мл экстрагента	1:40
Трава зверобоя	5 г сырья (одна столовая ложка) на 200 мл экстрагента	1:40
Трава пустырника	15 г сырья (три столовых ложки) на 200 мл экстрагента	3:40
Цветки ромашки аптечной	10 г сырья (две столовые ложки) на 200 мл	1:20
Трава чабреца	10 г сырья (две столовые ложки) на 200 мл экстрагента	1:20
Цветки бессмертника	10 г сырья (две столовые ложки) на 100 мл экстрагента	1:10
Трава мелиссы лекарственной	2-3 г сырья (одна столовая ложка) на 200 мл экстрагента	1:100/1:67
Листья шалфея лекарственного	10 г сырья на 200 мл экстрагента	1:20

Определение содержания дубильных веществ в настоях перманганатометрическим титрованием с применением индикатора

проводили по следующей методике: аликвоту настоя, равную 25 мл, переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 25 мл индигосульфокислоты, доводили водой до метки и перемешивали. Полученный раствор переливали в коническую колбу вместимостью 750 мл и титровали раствором калия перманганата с концентрацией 0,02 М при постоянном перемешивании до появления золотисто-желтого окрашивания.

Содержание суммы дубильных веществ в настоях в пересчете на танин (в %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot 500 \cdot K \cdot V_2 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot m}$$

Где V_1 – объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; 25 – объем настоя, взятого для титрования, мл; a – аликвота, мл; V_2 – общий объем извлечения, мл; K – поправка на титр (по щавелевой кислоте); m – масса настоя, определенная пикнометрически, г.

Потенциометрическое определение дубильных веществ в отварах осуществляли по следующей методике: 25 мл настоя переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 5 мл 5% раствора кислоты серной, доводили водой до метки, перемешивали (раствор А). В мерный стакан с помощью пипетки отмеряли 50 мл раствора А, погружали в раствор рабочий электрод – стеклянный и электрод сравнения – хлорсеребряный, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Титровали раствором калия перманганата концентрацией 0,02 М из микробюретки при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. После установления равновесия снимали показания ЭДС, по которым строили графики в координатах $E = f(V)$ для определения эквивалентного объема.

Интегральная и дифференциальная кривые титрования дубильных веществ в настое травы зверобоя представлены на рис.17 и 18 соответственно.

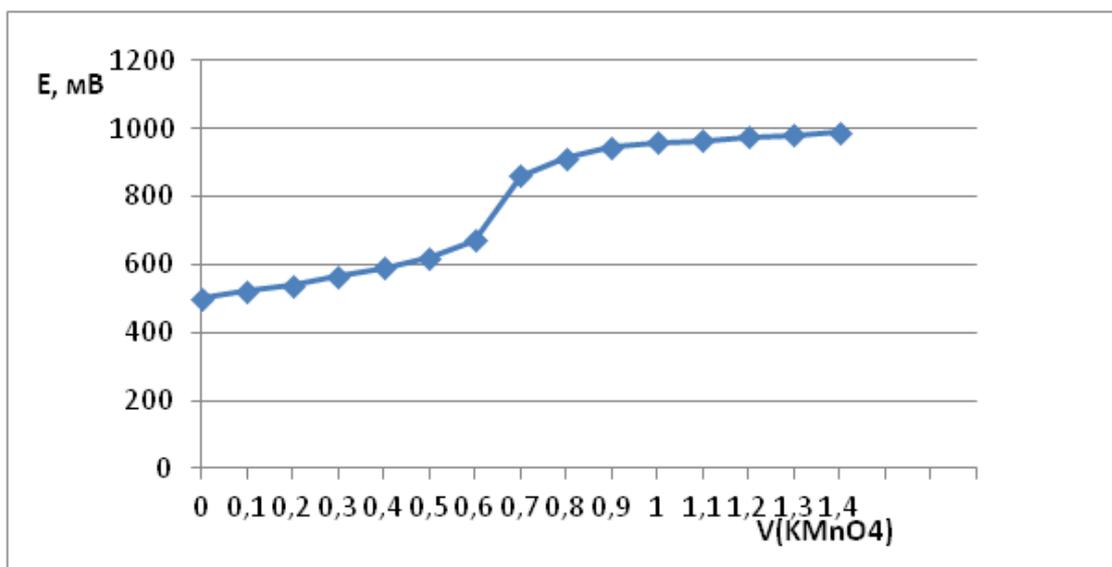


Рис. 17. Интегральная кривая титрования дубильных веществ в настое травы зверобоя раствором калия перманганата с концентрацией 0,02 М.

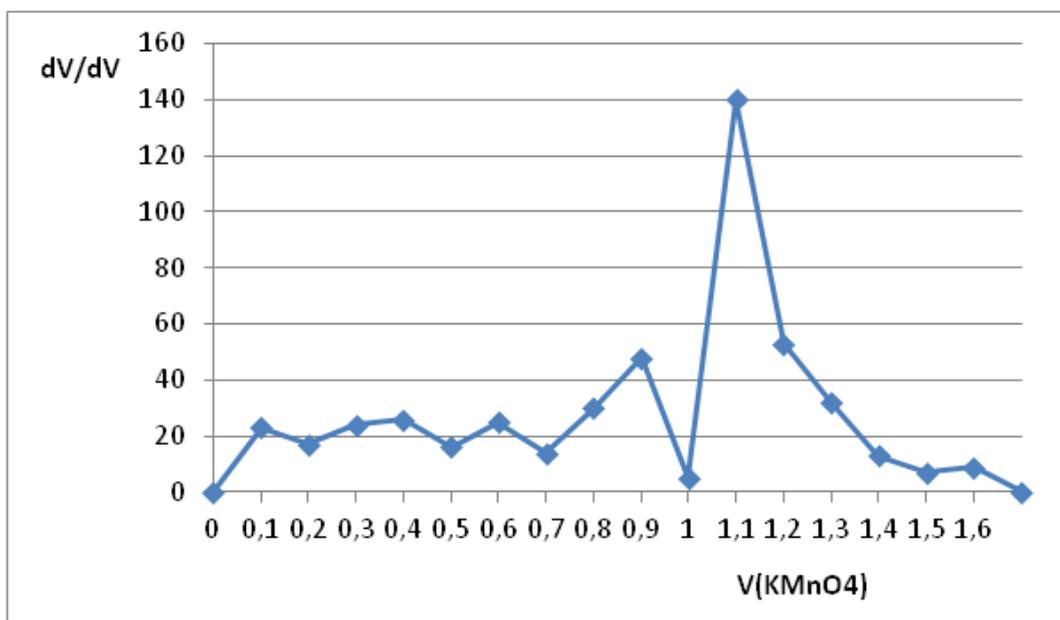


Рис. 18. Дифференциальная кривая титрования дубильных веществ в настое из травы зверобоя.

Содержание суммы дубильных веществ, в пересчете на танин (в %) в настоях, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot 500 \cdot V_2 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot m}$$

где V_1 – объем раствора перманганата калия с концентрацией 0,02 моль/л, израсходованного на титрование, мл; 2,5 – объем настоя, взятого для титрования, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; V_2 – общий объем настоя, мл; a – аликвота, мл.

Количество дубильных веществ в пересчете на танин, содержащихся в настоях (в граммах) рассчитывали по следующей формуле (для потенциометрического титрования):

$$X(\text{г}) = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot 500 \cdot V_2}{a \cdot 25}$$

Где V_1 – объем раствора перманганата калия с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; 25 – объем настоя, взятого для титрования, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; V_2 – общий объем настоя, мл; a – аликвота, мл.

Результаты по содержанию дубильных веществ в настоях из ЛРС, полученные потенциометрическим титрованием и с использованием индикатора представлены в табл. 29.

Таблица 29. Результаты по содержанию дубильных веществ в настоях из ЛРС ($n=5$, $p=0,95$)

ЛРС	Потенциометрическое титрование		Титрование с индикатором
	Содержание суммы дубильных веществ, %	Содержание суммы дубильных веществ, г	Содержание суммы дубильных веществ, %
Листья мяты перечной	0,19±0,02	0,40±0,02	0,21±0,02
Трава зверобоя	0,18±0,02	0,36±0,03	0,22±0,03
Трава пустырника	0,34±0,04	0,70±0,02	0,38±0,05
Цветки ромашки	0,12±0,01	0,23±0,01	0,14±0,02

аптечной			
Трава чабреца	$0,16 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,04$
Цветки бессмертника	$0,13 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$
Трава мелиссы	$0,065 \pm 0,003$	$0,13 \pm 0,002$	$0,074 \pm 0,002$
Листья шалфея	$0,17 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,03$

Полученные данные показывают возможность применять в анализе настоев по содержанию дубильных веществ, как титрование с использованием индикатора, так и потенциометрическое титрование. Результаты сходимы. Кривые титрования настоев менее крутые, чем у отваров за счет более низкого содержания дубильных веществ. Однако, при построении дифференциальных кривых, определение эквивалентного объема не вызывает трудностей.

Для анализа настоев как лекарственной формы предпочтительнее, также, как и для отваров, выразить содержание действующих веществ в граммах. Массовое содержание дает возможность судить о сопоставимости настоев травы чабреца и листьев шалфея, а также цветков бессмертника и травы мелиссы по содержанию дубильных веществ, переходящих в получаемый объем настоя.

3.1.5. Потенциометрическое определение дубильных веществ в лекарственных растительных препаратах

Для рассмотрения возможности применения «сквозной» стандартизации по дубильным веществам были исследованы некоторые лекарственные растительные препараты (ЛРП): «Тонзилгон Н», «Стоматофит», «Доппельгерц Нервотоник», «Миртикам», настойка травы зверобоя, настойка травы пустырника. ЛРС, используемое для получения перечисленных препаратов содержит дубильные вещества, поэтому была изучена возможность «сквозной» стандартизации сырья и препаратов по данной группе БАС с помощью потенциометрического титрования.

Состав препаратов приведен в табл. 30.

Таблица 30. Состав лекарственных растительных препаратов

«Стоматофит», жидкий экстракт для наружного применения	«Тонзилгон Н», капли для приема внутри	«Миртикам», сироп гомеопатический	«Доппельгерц Нервотоник», эликсир
100 г препарата содержат: Активные компоненты: айра корневища -6,5 г; арники трава -6,5 г; дуба кора -13 г; мяты перечной листья-6,5 г; ромашки аптечной цветки-13 г; тимьяна обыкновенного трава – 6,5 г; шалфея лекарственного листья-13 г; Вспомогательные вещества: Натрия тетракарбонат, глицерин, метилцеллюлоза, этанол (95%), вода очищенная	100 г препарата содержат: 1. Активные ингредиенты: 29 г водно- спиртового экстракта из смеси лекарственного растительного сырья: Аллея корни- 0,4 г; Ромашки цветки – 0,3 г; Хвоща трава – 0,5 г; Грецкого ореха листья-0,4 г; Тысячелистника трава-0,4 г; Дуба кора-0,2 г; Одуванчика лекарственного трава-0,4 г; 2. Вспомогательные вещества: Вода очищенная- 71 г	100 г сиропа содержат: Активные ингредиенты: Экстракт плодов черники-15 г; Очанка лекарственная D12, D30, D200 -1,67 г; Клопогон кистевидный D10, D30, D200 - 1,67 г; Гельземий вечнозеленый D10, D30, D200 - 1,67 г; Вспомогательные вещества: сахар, вода очищенная	100 г эликсира содержат: Активные ингредиенты: зверобоя травы экстракт жидкий 2. Вспомогательные вещества: концентрат вишневого ликера — 0,573 г; вино ликерное — 101,543 г

Содержание дубильных веществ в препаратах «Тонзилгон Н» и «Стоматофит» проводили по следующей методике: аликвоту препарата, равную 2,5 мл, переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 25 мл индигосульфокислоты, водой доводили до метки; полученный раствор переливали в коническую колбу вместимостью 750 мл, и титровали раствором калия перманганата с концентрацией 0,02 М до появления золотисто-желтого окрашивания.

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин (в мг/мл) в препаратах «Тонзилгон Н» и «Стоматофит» рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot 500 \cdot 1000}{2,5}$$

где V_1 – объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, пошедшего на титрование, мл; 2,5 – объем препарата, отобранного для титрования, мл; 500 – объем мерной колбы, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г.

Потенциометрическое титрование указанных ЛРП проводили следующим образом: аликвоту препарата, равную 2,5 мл, переносили в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляли 25 мл 5% серной кислоты, водой доводили до метки; содержимое переливали в коническую колбу вместимостью 750 мл (раствор А), 25 мл раствора А, помещали в мерный стакан, погружали платиновый и хлорсеребряный электроды и титровали раствором калия перманганата с концентрацией 0,02 М с помощью микробюретки, перемешивая с использованием магнитной мешалки.

Кривые титрования препаратов «Стоматофит» и «Тонзилгон Н» представлены на рис. 19 и 20 соответственно.

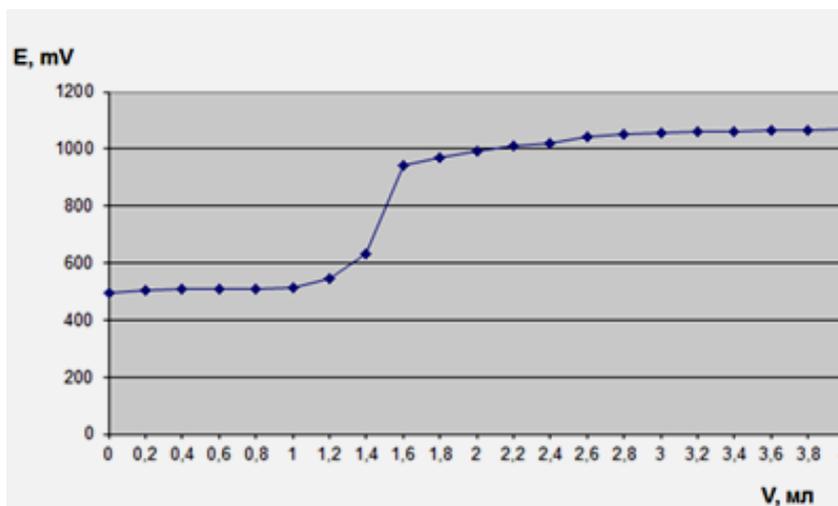


Рис. 19. Интегральная кривая потенциометрического титрования препарата «Стоматофит» 0,02 М раствором калия перманганата.

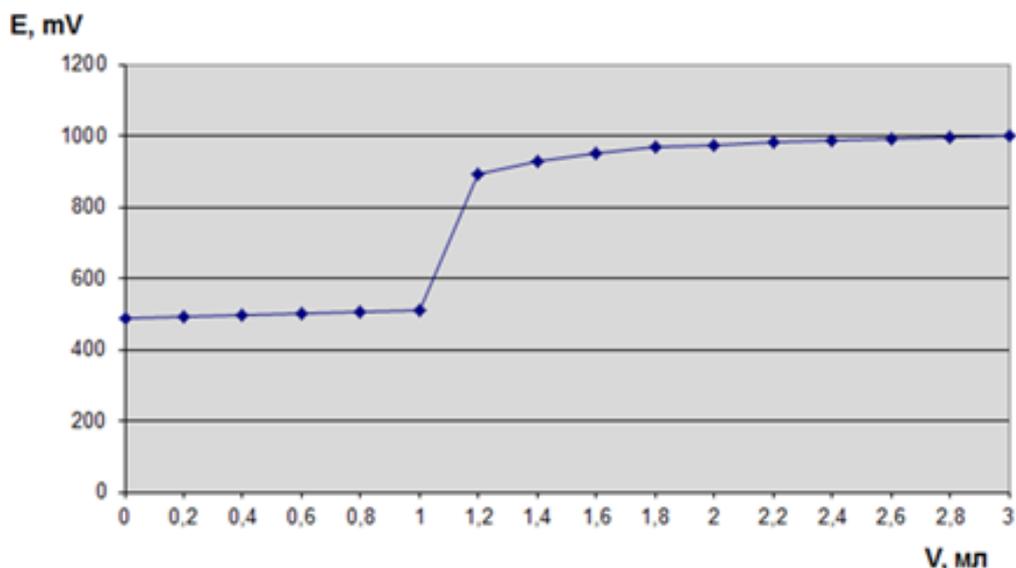


Рис.20. Интегральная кривая титрования препарата «Тонзилгон» 0,02 М раствором калия перманганата.

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин (в мг/мл) в препаратах «Тонзилгон Н» и «Стоматофит» вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot 0,004157 \cdot 50 \cdot 1000}{a \cdot 2,5}$$

где V_1 — объем раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л, израсходованного на титрование, мл; 2,5 – объем настоя, отобранного для титрования, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата с концентрацией 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г; 500 – объем мерной колбы, мл; а– аликвота, мл.

Установить содержание дубильных веществ в препарате «Миртикам» не удалось ни индикаторным, ни потенциометрическим титрованием. Перехода окраски индикатора не наблюдалось, также, как и скачка потенциала при потенциометрическом титровании. Литературные данные свидетельствуют о высоком содержании антоцианов в плодах черники, а полученные результаты показывают, что антоцианы потенциометрически в данных условиях не титруются.

Определение содержания дубильных веществ в настойке травы зверобоя и травы пустырника, а также в препарате «Доппельгерц Нервотоник» проводили аналогично рассмотренным выше препаратам, за тем исключением, что объем ЛРП составил 25 мл (вместо 2,5 мл).

Кривые титрования настойки травы зверобоя, препарата «Доппельгерц Нервотоник» и настойки травы пустырника представлены на рис. 21, 22 и 23 соответственно.

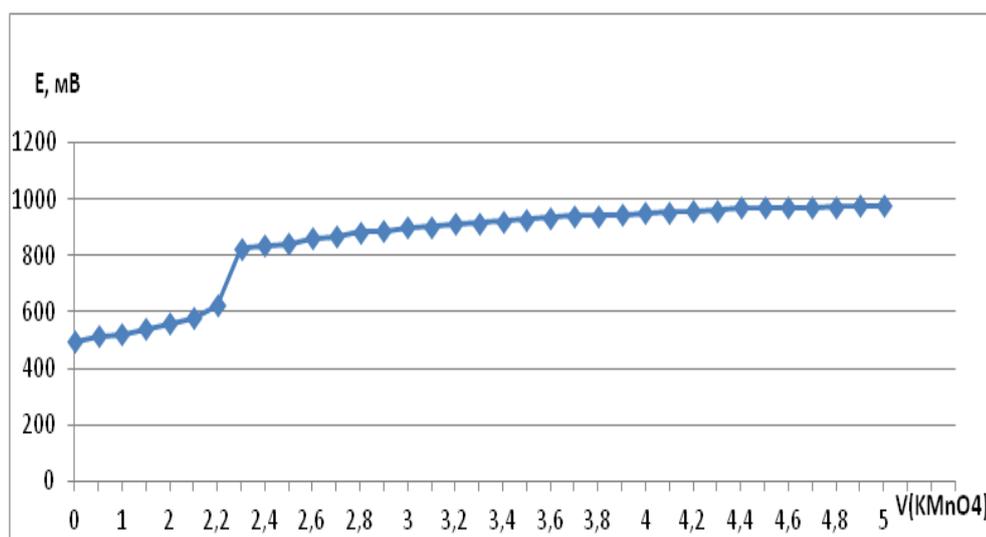


Рис. 21. Интегральная кривая титрования дубильных веществ в настойке травы зверобоя 0,02 М раствором калия перманганата.

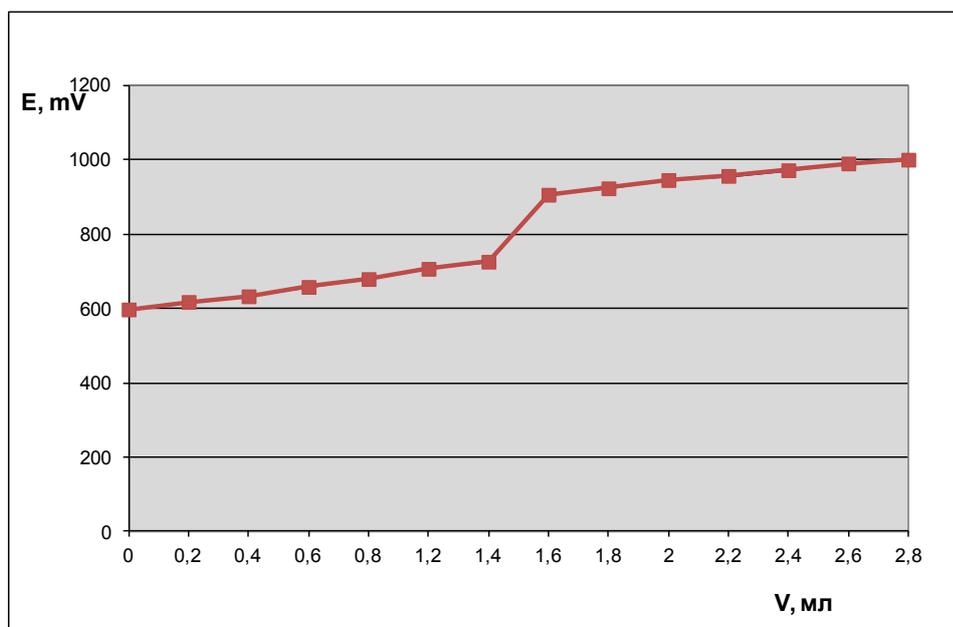


Рис. 22. Интегральная кривая титрования дубильных веществ в настойке травы пустырника 0,02 М раствором калия перманганата.

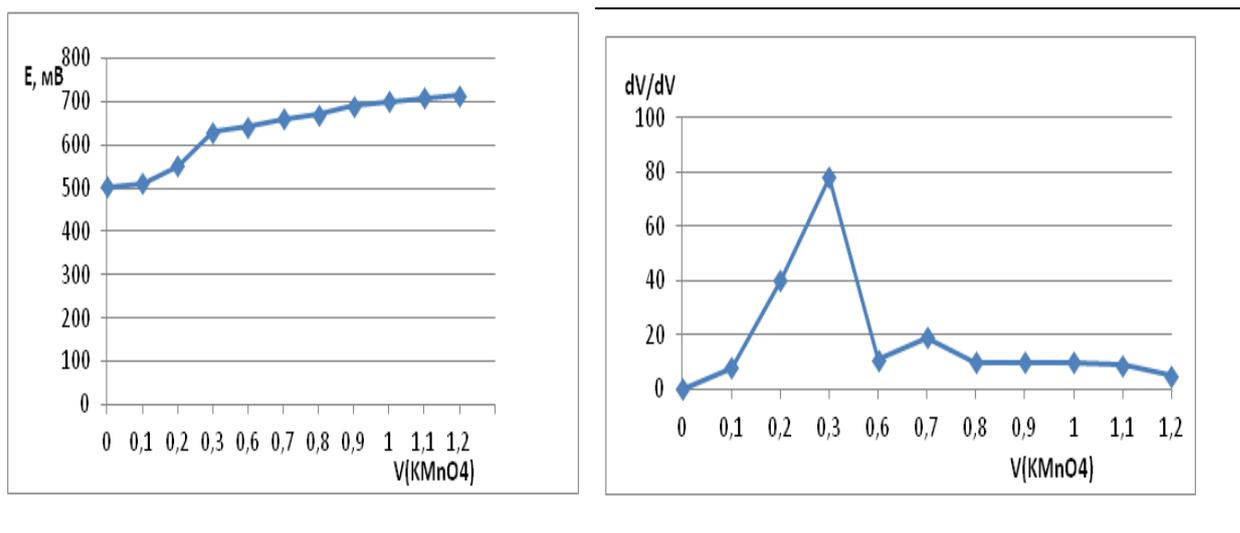


Рис. 23. Интегральная и дифференциальная кривые титрования дубильных веществ в препарате «Доппельгерц Нервотоник» 0,02 М раствором калия перманганата.

Содержание дубильных веществ в препаратах: настойка травы зверобоя, настойка травы пустырника и «Доппельгерц Нервотоник» представлены в табл. 31.

Таблица 31. Содержание дубильных веществ в лекарственных растительных препаратах

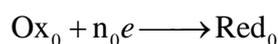
Препарат	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, мг/мл	
	Потенциометрия	Титрование с индикатором
«Тонзилгон Н»	39,91±0,06	40,56±0,11
«Стоматофит»	53,21±0,08	49,96±0,21
«Доппельгерц Нервотоник»	1,00±0,05	1,03±0,07
Настойка травы зверобоя	7,65±0,04	7,66±0,05
Настойка травы пустырника	4,99±0,03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

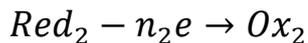
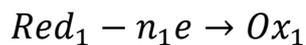
Полученные результаты показали, что содержание дубильных веществ в препарате «Доппельгерц Нервотоник» достаточно мало, в связи с чем определение этой группы БАС несет в себе большую ошибку и не может быть применено для стандартизации. Для остальных препаратов можно рекомендовать стандартизацию по содержанию дубильных веществ, как индикаторным, так и потенциометрическим титрованием.

3.1.6. Математическая модель окислительно-восстановительного титрования одним окислителем нескольких восстановителей в условиях термодинамического равновесия при $T, P = \text{Const}$

Данная математическая модель легла в основу компьютерной программы, позволяющей упростить расчеты по содержанию веществ в восстановленной форме при потенциометрическом титровании одним окислителем нескольких восстановителей. Именно такой процесс протекает при титровании суммы дубильных веществ раствором калия перманганата.

Рассмотрим задачу на примере процесса титрования раствора, содержащего два различных восстановителя, раствором окислителя в кислой среде при $pH = \text{Const}$. В этом случае имеют место три окислительно-восстановительных реакциях (ОВР): восстановление окислителя, окисление первого восстановителя и окисление второго восстановителя. При этом в растворе будут протекать следующие окислительно-восстановительные реакции:





где: Ox – окисленная, а Red – восстановленная форма окислительно-восстановительной пары, индекс 0 соответствует титранту окислителя, а 1 и 2 – двум разным титруемым восстановителям.

Для построения математической модели, описывающей кривую окислительно-восстановительного потенциометрического титрования, можно использовать термодинамическое уравнение Нернста, представляющее зависимость ОВ потенциала от соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм. Для использования уравнения Нернста в расчетах и построения кривой титрования необходимо выполнение важных практических условий:

1. Добавлять титрант в исследуемый раствор восстановителей малыми порциями;
2. Раствор постоянно перемешивать;
3. После каждого добавления титранта – окислителя выждать необходимое для установления потенциала время.

Это означает, что в процессе титрования три окислительно-восстановительных пары всегда находятся в состоянии равновесия, и дает возможность использования уравнения Нернста. Поскольку, строго говоря, любое добавление окислителя приводит к титрованию всех присутствующих в растворе восстановителей (в разной степени), то измеряемый потенциал является смешанным потенциалом всех присутствующих в растворе Red/Ox форм. Неизменность измеряемого потенциала и отсутствие тока во внешней цепи (поляризации) возможны только при равенстве потенциалов этих Ox/Red форм.

Таким образом, условие электрохимического равновесия, пренебрегая нестандартным состоянием H^+ в растворе и принимая $\gamma_i = 1$, можно записать:

$$\varphi = \varphi_0^0 + \frac{RT}{n_0 F} \ln \frac{[\text{Ox}_0]}{[\text{Red}_0]} \quad (4.1.1)$$

$$\varphi = \varphi_1^0 + \frac{RT}{n_1 F} \ln \frac{[\text{Ox}_1]}{[\text{Red}_1]} \quad (4.1.2)$$

$$\varphi = \varphi_2^0 + \frac{RT}{n_2 F} \ln \frac{[\text{Ox}_2]}{[\text{Red}_2]}, \quad (4.1.3)$$

где $\varphi_1 = \varphi_2 = \varphi_3 = \varphi$

Запишем условие материального баланса, из которого следует, что сумма концентраций окисленной и восстановленной форм, является константой:

$$C_i = [\text{Ox}_i] + [\text{Red}_i] \quad (4.1.4)$$

Из условия электронного баланса следует, что количество электронов, отданных восстановителем, должно равняться количеству электронов, принятых окислителем.

Объединяя уравнения, получим:

$$\varphi = \varphi_0^0 + \frac{RT}{n_0 F} \ln \frac{[\text{Ox}_0]}{C_0 - [\text{Ox}_0]} \quad (4.1.5), \text{ где } C_0 - \text{исходная концентрация}$$

окислителя,

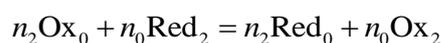
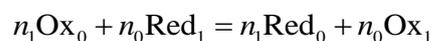
$$\varphi = \varphi_1^0 + \frac{RT}{n_1 F} \ln \frac{[\text{Ox}_1]}{C_1 - [\text{Ox}_1]} \quad (4.1.6), \text{ } C_1 - \text{исходная концентрация первого}$$

восстановителя,

$$\varphi = \varphi_2^0 + \frac{RT}{n_2 F} \ln \frac{[\text{Ox}_2]}{C_2 - [\text{Ox}_2]} \quad (4.1.7), \text{ } C_2 - \text{исходная концентрация второго}$$

восстановителя,

Из условий электронного баланса следует, что в растворе протекают следующие окислительно-восстановительные реакции:



Отсюда следует, что при образовании n_0 моль окисленной формы первого титруемого вещества расходуется n_1 моль титранта, а при образовании n_0 моль окисленной формы второго титруемого вещества расходуется n_2 моль титранта, таким образом, получаем

$$v(\text{Ox}_0) = v_0 - \frac{n_0}{n_1} v(\text{Ox}_1) - \frac{n_0}{n_2} v(\text{Ox}_2), \quad (4.1.8)$$

где v_0 – введенное в систему количество вещества окислителя (Ox_0), а $v(\text{Ox}_0)$ – текущее значение количества вещества Ox_0 .

Учитывая, что в уравнениях (4.1.5) – (4.1.7) и в числителях, и в знаменателях стоят концентрации веществ, находящихся в одном и том же растворе, можно перейти к количествам соответствующих веществ т.к. объем в числителе и знаменателе сократится. Поэтому данные уравнения можно записать в виде:

$$\varphi = \varphi_0^0 + \frac{RT}{n_0 F} \ln \frac{v(\text{Ox}_0)}{v_0 - v(\text{Ox}_0)} \quad (4.1.9)$$

$$\varphi = \varphi_1^0 + \frac{RT}{n_1 F} \ln \frac{v(\text{Ox}_1)}{v_1 - v(\text{Ox}_1)} \quad (4.1.10)$$

$$\varphi = \varphi_2^0 + \frac{RT}{n_2 F} \ln \frac{v(\text{Ox}_2)}{v_2 - v(\text{Ox}_2)} \quad (4.1.11)$$

Учитывая, что v_0 определяется объемом прилитого титранта, уравнение (4.1.9) приобретает вид:

$$\varphi = \varphi_0^0 + \frac{RT}{n_0 F} \ln \frac{v(\text{Ox}_0)}{C_0 V_T - v(\text{Ox}_0)} \quad (4.1.12)$$

Подставим (4.1.8) в (4.1.12) получим:

$$\varphi = \varphi_0^0 + \frac{RT}{n_0 F} \ln \frac{C_0 V_T - \frac{n_0}{n_1} v(\text{Ox}_1) - \frac{n_0}{n_2} v(\text{Ox}_2)}{\frac{n_0}{n_1} v(\text{Ox}_1) + \frac{n_0}{n_2} v(\text{Ox}_2)} \quad (4.1.13)$$

Итак, получены три уравнения с тремя неизвестными, которые отражают зависимость ОВ потенциала раствора от объема, прилитого титранта. Однако данную систему нельзя решить аналитически, поэтому приведем ее к виду, удобному для численного решения методом итераций. Для этого преобразуем каждое из уравнений так, чтобы в левой части осталась только одна переменная, а в правой – функция от переменных данной системы:

$$\left\{ \begin{array}{l} \varphi = \varphi_0^0 + \frac{RT}{n_0 F} \ln \frac{C_0 V_T - \frac{n_0}{n_1} \nu(\text{Ox}_1) - \frac{n_0}{n_2} \nu(\text{Ox}_2)}{\frac{n_0}{n_1} \nu(\text{Ox}_1) + \frac{n_0}{n_2} \nu(\text{Ox}_2)} \\ \nu(\text{Ox}_1) = (\nu_1 - \nu(\text{Ox}_1)) e^{\frac{n_1 F (\varphi - \varphi_1^0)}{RT}} \\ \nu(\text{Ox}_2) = (\nu_2 - \nu(\text{Ox}_2)) e^{\frac{n_2 F (\varphi - \varphi_2^0)}{RT}} \end{array} \right. \quad (4.1.14)$$

Метод итераций, при решении систем уравнений состоит из следующих этапов:

1. Берут приближенные значения всех переменных, входящих в уравнения системы.
2. Вычисляют новые значения переменных, пользуясь функциями из правой части уравнений системы.
3. Повторяют п. 2 с уточненными значениями.
4. Как только разность между предыдущим и текущим значением переменных становится меньше наперед заданной величины, определяющей точность вычисления, решение системы считается найденным.

Начальные значения переменных можно найти, исходя из упрощенной модели ОВ титрования, которую обычно применяют при построении кривых ОВ титрования. При этом считается, что для участка кривой, лежащего до точки эквивалентности, весь титрант расходуется на окисление титруемого

вещества, следовательно, количество окисленной формы первого титруемого вещества определяется следующим образом:

$$\nu(\text{Ox}_1) = \frac{n_1}{n_0} \nu_0 = \frac{n_1}{n_0} C_0 V \quad (4.1.15)$$

Подставив (4.1.15) в (4.1.10) получим приближенное значение ОБ потенциала:

$$\varphi = \varphi_1^0 + \frac{RT}{n_1 F} \ln \frac{\frac{n_1}{n_0} C_0 V_T}{\nu_1 - \frac{n_1}{n_0} C_0 V_T} \quad (4.1.16)$$

Для оценки количества окисленной формы второго вещества выразим его из (4.1.11), получим:

$$\nu(\text{Ox}_2) = \frac{\nu_2 e^{\frac{n_2 F (\varphi - \varphi_2^0)}{RT}}}{1 + e^{\frac{n_2 F (\varphi - \varphi_2^0)}{RT}}} \quad (4.1.17)$$

В результате получены уравнения, позволяющие рассчитать количества титруемых соединений (восстановителей) и приблизительно оценить значение потенциала в точке эквивалентности. В рамках предлагаемой математической модели была написана программа расчета кривой титрования одним окислителем нескольких восстановителей, позволяющая определять их концентрации (количества) в исходной аналитической пробе.

3.2. Применение потенциометрии для количественного определения органических кислот

Свободные органические кислоты являются первичными метаболитами и присутствуют практически во всех видах ЛРС. Особенно много их накапливается в плодах, например шиповника, рябины обыкновенной и калины. В соответствии с методикой ГФ [52] суммарное содержание органических кислот в плодах шиповника определяют титриметрически в присутствии метиленового синего и фенолфталеина до появления в пене лилово-розового окрашивания.

Данную методику нельзя считать универсальной, т.к. она неосуществима в случае анализа более интенсивно окрашенных извлечений или извлечений, не образующих пены при взбалтывании (тогда невозможно определить конечную точку титрования). Кроме того, согласно фармакопейной методике, необходимо проводить существенное (и приблизительное) разбавление 10 мл извлечения из сырья свежее прокипяченной водой объемом 200–300 мл. Неоднозначность в разбавлении извлечения может привести к ошибкам и неопределенности при сравнении результатов серийного анализа.

При разработке методики потенциометрического определения органических кислот в ЛРС за основу была взята фармакопейная методика, в которую внесены ряд изменений: при разбавлении извлечения во всех случаях надо брать строго оговоренное количество воды (200 мл). На последнем этапе в методику включено потенциометрическое титрование, для чего в мерный стакан с помощью пипетки отмеряли 25 мл водного извлечения, опускали стеклянный и хлорсеребряный электроды, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере и титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида. Фиксировали значения ЭДС и по полученным результатам строили кривые титрования для определения точки эквивалентности.

Методика потенциометрического определения суммы свободных органических кислот в ЛРС. Точную навеску сырья массой около 25 г, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, переносят в колбу вместимостью 250 мл, приливают 200 мл воды очищенной и кипятят в течение 2 ч на водяной бане, присоединив колбу к обратному холодильнику. Извлечение охлаждают, фильтруют, переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают.

Пипеткой в химический стакан отмеряют 25 мл водного извлечения, опускают рабочий электрод - стеклянный и электрод сравнения -

хлорсеребряный, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Титруют раствором натрия гидроксида концентрацией 0,1 М с помощью микробюретки при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Фиксируют значения ЭДС; полученные результаты обрабатывают в виде кривых титрования в координатах $pH = f(V)$ для определения точки эквивалентности.

Для более точного определения эквивалентного объема строят дифференциальную кривую титрования в координатах $dpH/dV = f(V)$.

Содержание свободных органических кислот в пересчете на кислоту яблочную в процентах (X) в абсолютно сухом сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,0067 \cdot K \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где 0,0067 – количество кислоты яблочной, соответствующее 1 мл раствора натрия гидроксида с концентрацией 0,1 моль/л, г; W – потеря в массе при высушивании, %; K – поправочный коэффициент; V – объем раствора натрия гидроксида с концентрацией 0,1 моль/л, пошедшего на титрование, мл; V_a – объем извлечения, взятый на титрование, мл; m – масса сырья, г; 250 – объем полученного извлечения, мл.

3.2.1. Потенциометрическое определение органических кислот в лекарственном растительном сырье

Разработанная методика потенциометрического определения суммы органических кислот была использована для анализа плодов шиповника, рябины обыкновенной, калины и смородины черной. Все исследования проводили в сравнении с фармакопейной методикой.

Установлено, что методика титрования с использованием индикаторов хорошо воспроизводится при анализе кислот в плодах шиповника и калины. Определение точки эквивалентности при титровании извлечения из плодов смородины черной затруднительно в связи с интенсивной окраской

извлечения, а плодов рябины обыкновенной - из-за отсутствия выраженной пены. Эти проблемы объясняют большую ошибку опыта.

Потенциометрическое титрование дает воспроизводимые результаты и ошибку в пределах 2%, что позволяет применять этот метод в анализе всех перечисленных видов ЛРС.

Интегральная и дифференциальная кривые потенциометрического титрования органических кислот на примере плодов шиповника представлены на рис. 24 и 25 соответственно.

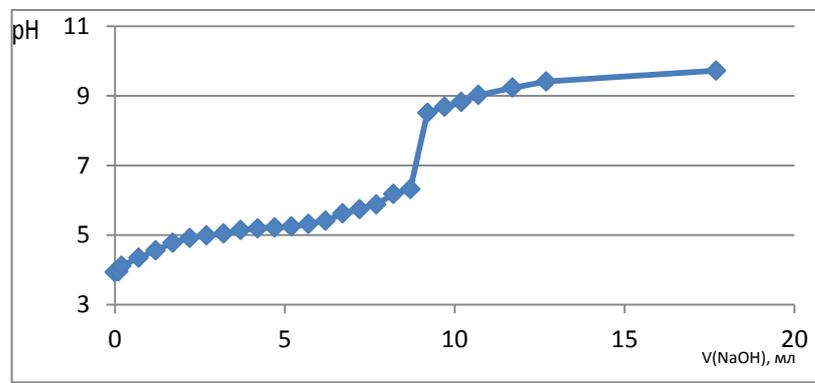


Рис. 24. Интегральная кривая титрования органических кислот раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М в извлечении плодов шиповника.

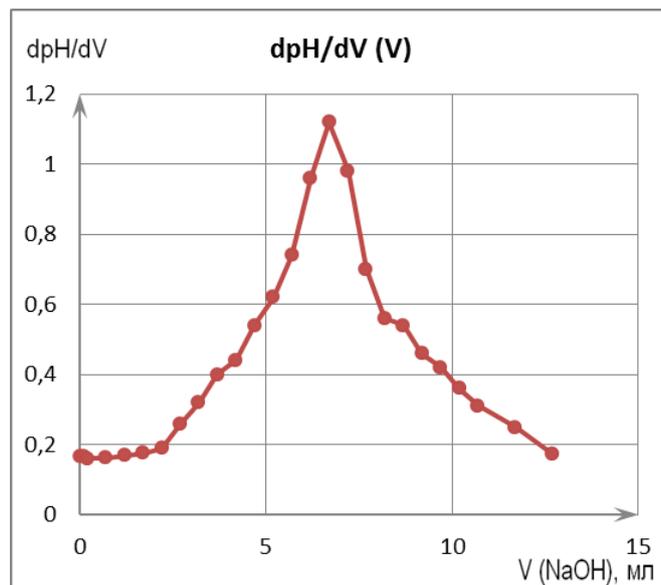


Рис. 25. Дифференциальная кривая титрования органических кислот раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М в извлечении плодов шиповника.

Согласно теории потенциометрического титрования, определение кислот в смеси по-отдельности возможно в случае различия в их константах кислотности на три-четыре и более порядка. В противном случае на кривой титрования наблюдается один скачок, то есть кислоты определяются в сумме, что видно на рис. 26. Полученная кривая титрования имеет вид, типичный для титрования слабых кислот сильным основанием. Скачок титрования четко выражен, эквивалентный объем легко определяется по дифференциальной кривой титрования. Результаты представлены в табл. 32.

Таблица 32. Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на кислоту яблочную в плодах шиповника ($n=5, p=0,95$)

Содержание суммы органических кислот в пересчете на кислоту яблочную, %	Потенциометрическое титрование	Методика ГФ
		2,65±0,03

Для доказательства правомерности включения методики потенциометрического титрования суммы органических кислот в НД, была проведена валидация методики.

При проведении валидации были установлены характеристики, такие как специфичность, линейность, правильность, сходимость.

1.Специфичность.

Рисунки 26, 27, 28 иллюстрируют специфичность разработанной методики - результаты титрования экстрагента, смеси органических кислот – лимонной и щавелевой, концентрация каждой из которых в модельном растворе составила по 0,25 М и извлечения из исследуемого ЛРС соответственно.

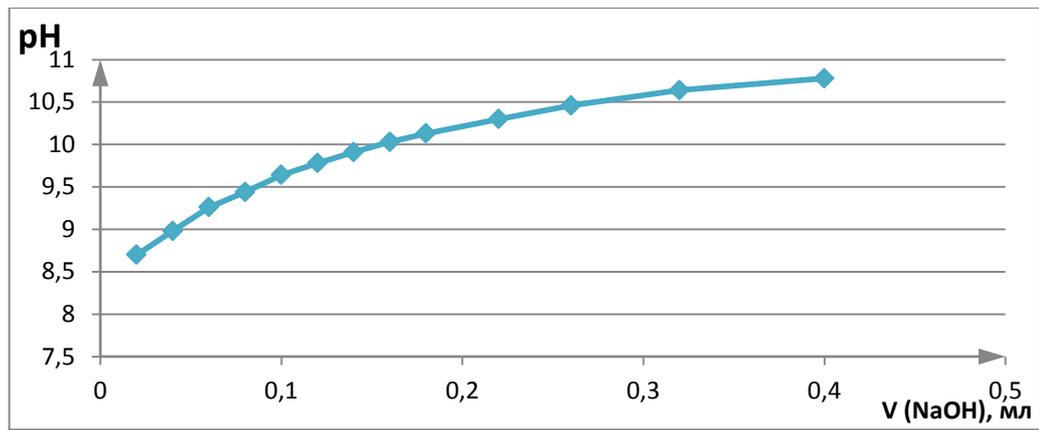


Рис. 26. Кривая титрования воды очищенной раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М.

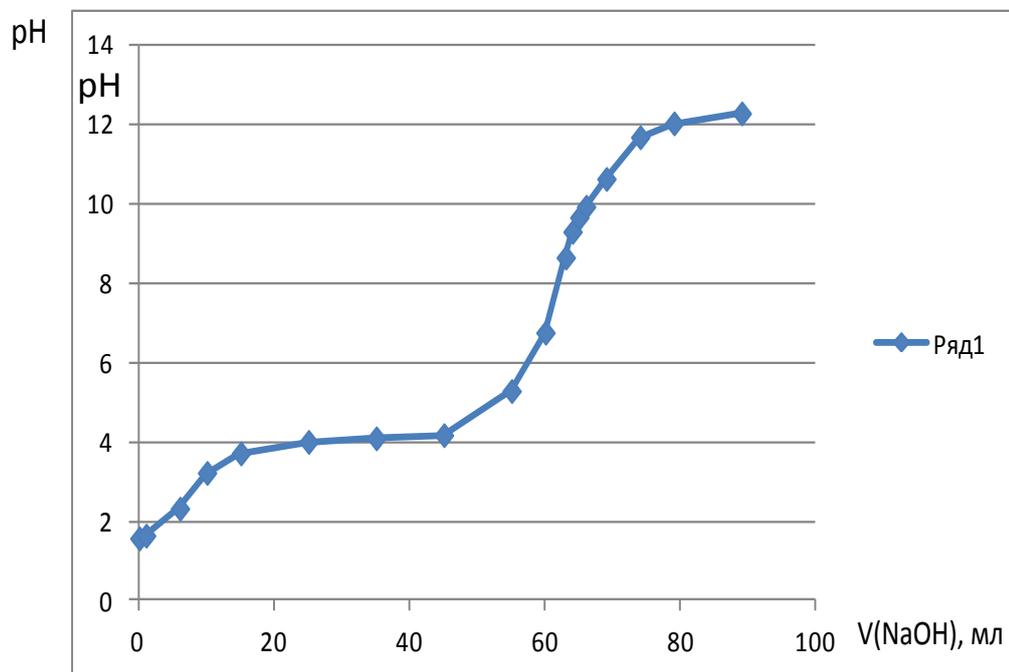


Рис.27. Кривая титрования модельной смеси раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М.

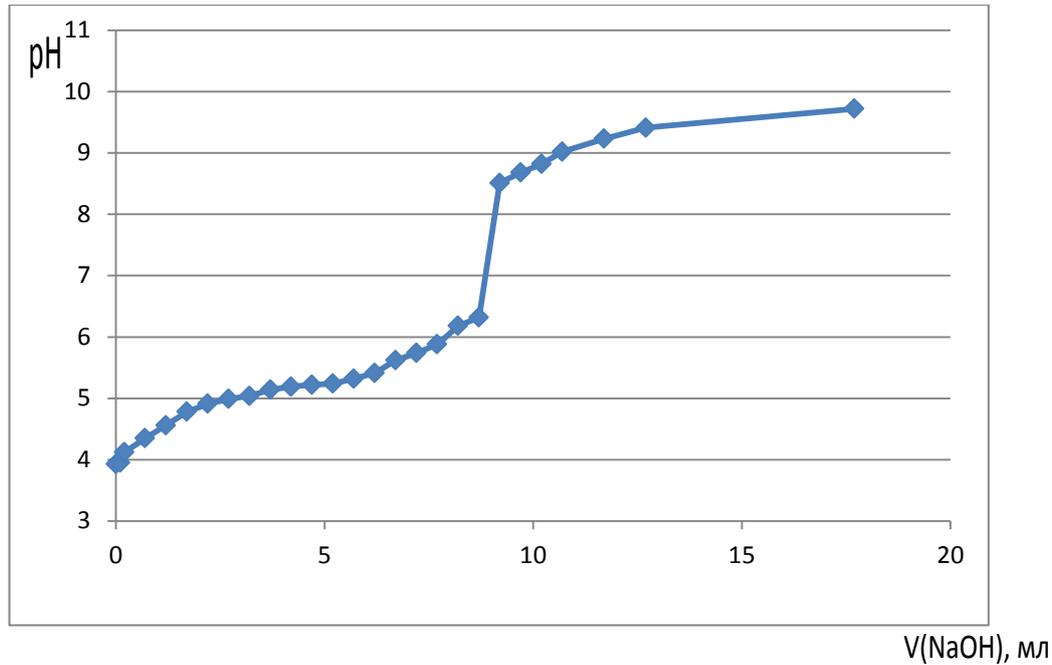


Рис. 28. Кривая титрования органических кислот извлечения плодов шиповника раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М.

2. Диапазон применения.

Для установления возможности использования методики в заданном диапазоне применения показывали такие характеристики как правильность, линейность, и прецизионность.

3. Линейность.

Линейность доказывали на 5 разных разведениях модельной смеси: 0,1 моль/л, 0,15 моль/л, 0,2 моль/л, 0,25 моль/л, 0,3 моль/л (рис. 30).

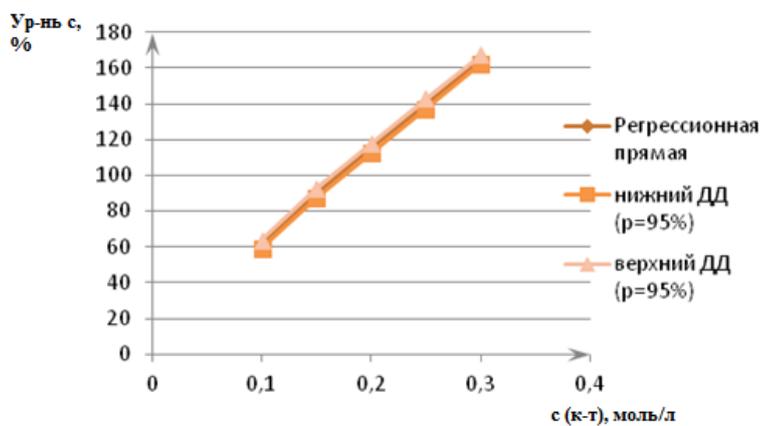


Рис.30. Графическое представление линейности методики потенциометрического титрования органических кислот.

Характеристика линейности включает в себя коэффициент корреляции, наклон прямой, а также отрезок на оси ординат. Полученные данные представлены в табл.33.

Таблица 33. Линейность потенциометрического титрования органических кислот

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y = 0,862x + 2,3$
Наклон а	0,862
Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	2,3
Коэффициент корреляции r	0,9996

4. Правильность.

Правильность доказывали путем определения отклика по методу добавок, т.е. отклик определялся путем добавления действующего вещества (кислоты уксусной) к аликвоте извлечения с установленным содержанием органических кислот. Результаты представлены в табл.34.

Таблица 34. Правильность потенциометрического титрования органических кислот

Уровень концентрации, %	Заданная масса кислот, мг (в пересчете на кислоту яблочную)	Расход 0,1М натрия гидроксида, мл	Определенное содержание кислот, мг	Заданное содержание кислот, мг	Отклик, %
80	68,39	10,2	68,34	68,39	99,93
80	67,29	10,1	67,67	67,29	100,56
80	69,22	10,3	69,01	69,22	99,70
100	85,13	12,7	85,10	85,13	99,96
100	82,11	11,8	79,06	82,11	96,29
100	87,95	13,1	87,78	87,95	99,81
120	102,3	15,2	101,84	102,3	99,55
120	99,87	15,0	100,5	99,87	100,63
120	101,22	15,1	101,17	101,22	99,95

Оценка проводили путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($p=95\%$) (табл. 35).

Таблица 35. Правильность потенциометрического титрования органических кислот, статистические характеристики

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,60
Значение стандартного отклонения	1,29
Значение коэффициента вариации (КВ)	1,22
Доверительный интервал - нижняя граница ($p=95\%$)	96,29
Доверительный интервал - верхняя граница ($p=95\%$)	100,63

5. Сходимость (повторяемость)

Сходимость была доказана при помощи испытаний 6 проб одной серии плодов шиповника (табл. 36).

Таблица 36. Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот

Проба	Масса навески, г	Расход 0,1М NaOH, мл	Содержание органических кислот, %
1	25,0612	8,9	2,64
2	24,9801	8,9	2,65
3	25,2231	9,1	2,69
4	25,1465	9,0	2,66
5	25,0181	9,0	2,68
6	24,9907	8,8	2,62

Оценка и расчет результатов проводились путем вычисления среднего значения, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала (табл. 37).

Таблица 37. Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот, статистические характеристики

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	2,62
Наибольшее значение, %	2,69
Среднее значение, %	2,66
Значение стандартного отклонения, %	0,02
Значение коэффициента вариации (КВ), %	0,89
Доверительный интервал ($p=95\%$), %	2,64-2,68

В результате проведения валидации были доказаны специфичность, линейность, диапазон применения, правильность и прецизионность методики потенциометрического титрования суммы органических кислот в плодах шиповника.

Содержание суммы органических кислот в пересчете на кислоту яблочную и абсолютно сухое сырье в плодах рябины, калины и смородины представлено в табл. 38.

Таблица 38. Содержание суммы органических кислот в ЛРС ($n=5, p=0,95$)

ЛРС	Содержание суммы органических кислот в пересчете на кислоту яблочную, %			
	Методика ГФ	Относительная ошибка, %	Потенциометрия	Относительная ошибка, %
Плоды рябины обыкновенной	3,78±0,22	5,8	3,68±0,04	1,1
Плоды калины	6,09±0,12	2,0	5,91±0,08	1,3
Плоды смородины черной	5,32±0,14	2,6	5,08±0,07	1,4

Типичные интегральная и дифференциальная кривые титрования суммы органических кислот для исследуемых объектов на примере извлечения из плодов рябины обыкновенной представлены на рис. 30 и 31.

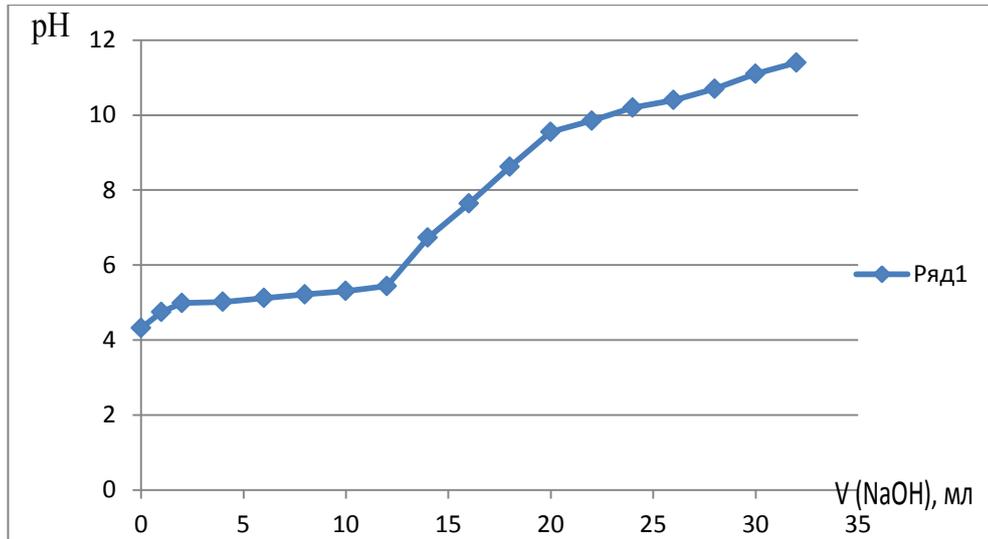


Рис.30. Интегральная кривая титрования извлечения плодов рябины обыкновенной 0,1 М раствором натрия гидроксида.

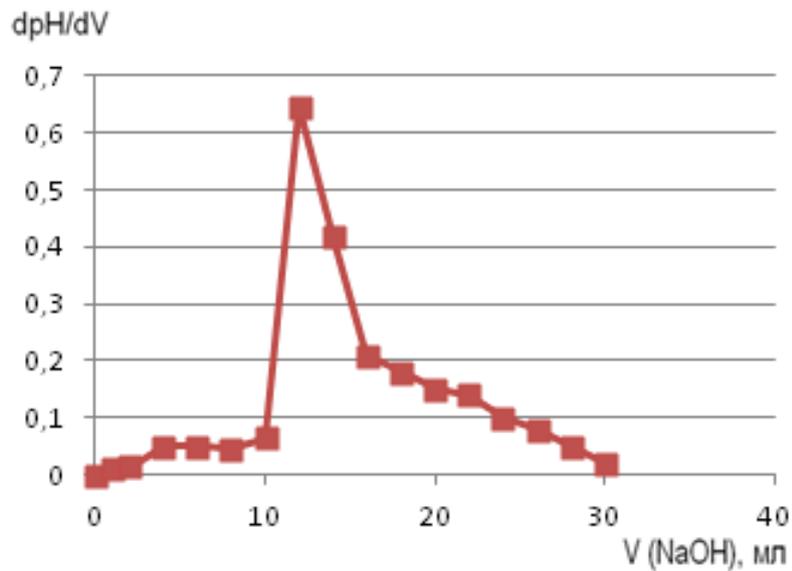


Рис. 31. Дифференциальная кривая титрования извлечения плодов рябины обыкновенной 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Таким образом, полученные результаты показали, что титрование суммы органических кислот в ЛРС возможно проводить с использованием индикаторов (метиленового синего и фенолфталеина) только в случае слабой окраски извлечений и образования характерной пены при перемешивании во

время титрования. Для всех видов ЛРС, в которых преобладают свободные органические кислоты, более точным является потенциметрическое титрование.

3.2.2. Потенциметрическое определение органических кислот в настоях из лекарственного растительного сырья

Была рассмотрена возможность определения суммы органических кислот в настоях из ЛРС (плодов шиповника, черной смородины, калины, рябины обыкновенной). Для этого были модифицированы методика индикаторного и потенциметрического титрования. Водные извлечения получали согласно инструкциям, приведенным в инструкциях по применению ЛРС.

Методика определения суммы свободных органических кислот с использованием индикаторов в водных извлечениях из сырья.

Аликвоту водного извлечения, равную 10 мл, переносят в мерную колбу объемом 200 мл, добавляют 1 мл 1% спиртового раствора фенолфталеина и 2 мл 0,1% раствора метиленового синего; доводят раствор до метки свежeproкипячённой водой, перемешивают. Содержимое мерной колбы переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл и титруют при постоянном перемешивании раствором натрия гидроксида в концентрации 0,1 моль/л до появления в пене лилово-красной окраски.

Для ЛРС с низким содержанием органических кислот используют алиkvоту извлечения, равную 100 мл.

Содержание свободных органических кислот в пересчете на кислоту яблочную в процентах (X) в водных извлечениях рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,0067 \cdot K \cdot V_1 \cdot 100}{V_a \cdot m}$$

где V – объем раствора натрия гидроксида с концентрацией 0,1 моль/л, израсходованного на титрование, мл; m – масса водного извлечения,

определенная пикнометрически, г; K – поправочный коэффициент; V_a – объем извлечения, взятый на титрование, мл; V_1 – объем водного извлечения, мл; 0,0067 – количество кислоты яблочной, соответствующей 1 мл раствора натрия гидроксида с концентрацией 0,1 моль/л, г.

Методика потенциометрического определения суммы свободных органических кислот в водных извлечениях из ЛРС. В мерный стакан с помощью пипетки отмеряют 25 мл водного извлечения (для ЛРС с высоким содержанием органических кислот) или 100 мл (при низком содержании органических кислот), опускают стеклянный и хлорсеребряный электроды, присоединенные к соответствующим клеммам на рН-метре. Титруют раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 моль/л из микробюретки при постоянном перемешивании. Фиксируют показания потенциометра, по полученным результатам строят кривые титрования в координатах $pH = f(V)$ для определения точки эквивалентности.

Содержание свободных органических кислот в пересчете на кислоту яблочную в процентах (X) в водных извлечениях вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,0067 \cdot K \cdot V_1 \cdot 100}{V_a \cdot m}$$

где V – объем раствора натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М, пошедшего на титрование, мл; V_a – объем извлечения, взятый на титрование, мл; m – масса водного извлечения, определенная пикнометрически, г; 0,0067 – количество кислоты яблочной, соответствующей 1 мл раствора натрия гидроксида с концентрацией 0,1 моль/л, г; K – поправочный коэффициент; V_1 – объем водного извлечения, мл.

Кривые титрования на примере определения органических кислот в отваре плодов рябины обыкновенной представлены на рис.32 и 33.

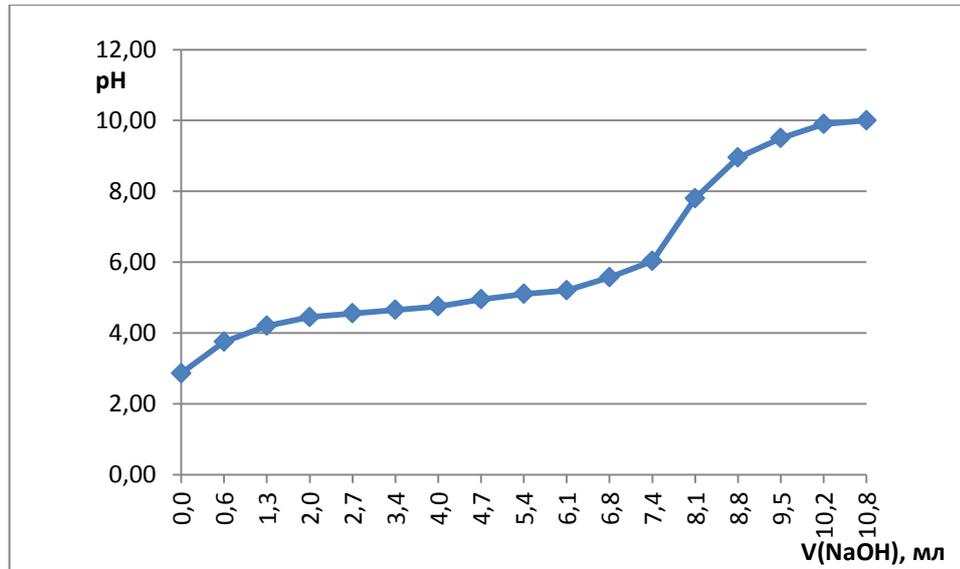


Рис.32. Интегральная кривая титрования настоя плодов рябины 0,1 М раствором натрия гидроксида.

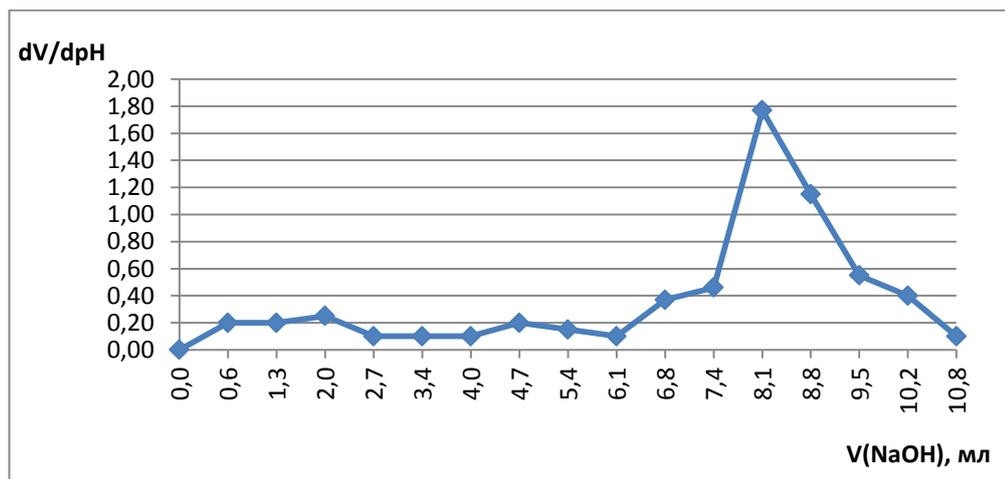


Рис.33. Дифференциальная кривая титрования настоя плодов рябины 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Содержание суммы органических кислот, определенное двумя методиками – индикаторным и потенциометрическим титрованием, представлено в табл. 39.

Таблица 39. Содержание суммы органических кислот в водных извлечениях из ЛРС ($n=5$, $p=0,95$)

Водное извлечение		рН извлечения	Содержание суммы органических кислот в пересчете на кислоту яблочную, %	
			Титрование с использованием индикаторов	Потенциометрия
Отвар плодов	шШиповника	4,29 ± 0,02	0,21±0,03	0,19±0,01
	Рябины обыкновенной	3,85 ± 0,03	0,39±0,02	0,37±0,02
	Калины	3,21 ± 0,02	0,49± 0,05	0,46±0,03
	Смородины черной	3,66±0,04	0,28±0,04	0,27±0,03
Настой	Листьев мяты перечной	5,12±0,04	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,04
	Травы Melissa	4,87±0,05	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,03
	Листьев шалфея	5,52±0,03	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,02
	Травы чабреца	5,13±0,04	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,04
	Листьев крапивы	7,12±0,04	0,068±0,003	Не определяется
	Травы душицы	5,22±0,02	0,16 ± 0,02	0,14±0,03
	Цветков ромашки аптечной	5,16±0,03	0,14±0,03	0,11±0,02
	Цветков бессмертника	4,74±0,03	0,19±0,02	0,17±0,02
Отвар	Корневищ с корнями диоскореи nipponской	6,73±0,04	Не определяется	Не определяется

Как видно из данных табл. 39, содержание органических кислот в отварах шиповника, рябины обыкновенной, калины превышает содержание этих БАС в остальных объектах исследования. Однако порядок цифр одинаков, что может говорить о вкладе в результат титрования фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и др. фенольных соединений, присутствующих в химическом составе цветков, трав и листьев. Этот факт позволяет считать, что титрование неселективно в отношении свободных органических кислот для сырья бессмертника, ромашки, Melissa, мяты,

чабреца, душицы и не применимо для стандартизации настоев этих видов ЛРС по анализируемому показателю.

Особенно малое количество органических кислот содержится в настоях листьев крапивы, что согласуется со значением рН настоя, равным $7,12 \pm 0,04$, в то время как рН остальных извлечений свидетельствует о слабокислой реакции среды. В связи с высоким значением рН настоя листьев крапивы проведение потенциметрического титрования органических кислот в нем невозможно.

3.2.3. Потенциметрическое определение содержания органических кислот в витаминных сборах

На примере анализа витаминных сборов № 1 и 2 была рассмотрена возможность применения потенциметрического титрования для определения органических кислот. В состав сборов входят в равных количествах плоды шиповника и плоды смородины черной (сбор № 1), а также плоды шиповника и плоды рябины обыкновенной (сбор № 2).

Определение органических кислот в сборах проводили по двум методикам: титриметрически с использованием индикаторов (методика, приведенная в 3.2.1 для плодов шиповника) и потенциметрически. Также было исследовано количество органических кислот, переходящих в отвары витаминных сборов, по той же методике, что для настоя плодов шиповника (3.2.2).

На рис. 34 и 35 представлены интегральные кривые титрования суммы органических кислот в витаминных сборах № 1 и 2 соответственно.

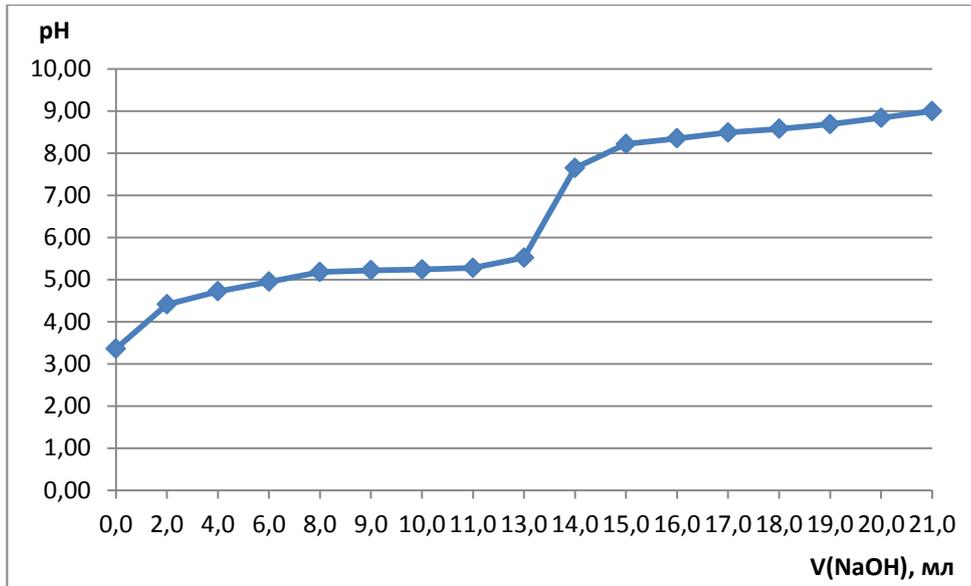


Рис.34. Интегральная кривая титрования извлечения витаминного сбора №1 0,1 М раствором натрия гидроксида.

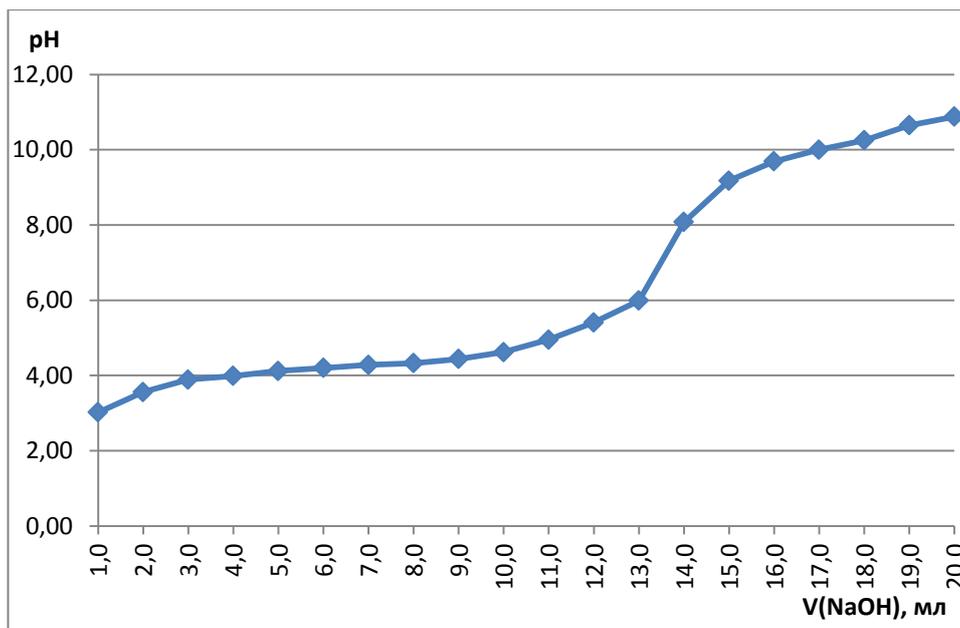


Рис.35. Интегральная кривая титрования извлечения витаминного сбора №2 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Данные по содержанию органических кислот в витаминных сборах и их настоях, полученные двумя методиками, представлены в табл. 40.

Таблица 40. Содержание органических кислот в витаминных сборах и их настоях ($n=5$; $p=0,95$)

Объект исследования	Содержание суммы органических кислот в пересчете на кислоту яблочную, %		
	Титрование с использованием индикаторов	Потенциометрическое титрование	Теоретическое значение
Витаминный сбор № 1	4,12±0,03	3,98±0,04	3,94
Витаминный сбор № 2	3,18±0,05	3,06±0,02	3,21
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 результаты сопоставимы. Кривые потенциометрического титрования имеют ярко выраженный скачок, что позволяет четко определять эквивалентный объем. Теоретическое содержание суммы органических кислот, вычисленное исходя из количества кислот в индивидуальных компонентах сборов, близко к определенному практически, что свидетельствует о правомерности применения предложенных методик для определения этих БАС в сборах. Небольшие расхождения могут быть связаны с взаимным влиянием соединений, извлекаемых из компонентов сборов.

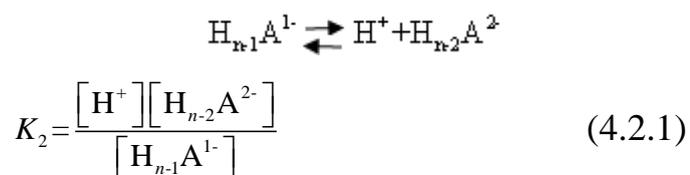
3.2.4. Математическая модель определения состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования

Математическая модель легла в основу компьютерной программы, которая позволяет рассчитать содержание органических кислот при потенциометрическом титровании, а также установить состав раствора и форму (ионизированная, молекулярная) кислоты в растворе.

Представленная математическая модель описывает процесс определения состава раствора, содержащего смесь органических кислот по результатам потенциометрического титрования с помощью статистической обработки по методу наименьших квадратов. Для вывода уравнения, описывающего кривую потенциометрического титрования раствора, содержащего смесь нескольких слабых кислот можно использовать следующие закономерности:

1. Уравнения, выражающие условия химических равновесий, существующих в растворе.
2. Уравнения, выражающие материальный баланс по атомам элементов, входящих в состав частиц системы
3. Уравнение, отражающее электронейтральность раствора

Рассмотрим раствор одной n -основной кислоты. В нем содержатся частицы, состав которых можно выразить общей формулой: $H_{n-i}A^{i-}$, где i принимает значения от 0 (что соответствует незаряженным молекулам кислоты) до n (что соответствует непротонированному аниону кислоты). Между частицами устанавливается i равновесий, для которых можно написать соответствующие константы равновесия. В частности, при $i=2$:



Откуда:

$$[H_{n-1}A^{1-}] = \frac{[H^+][H_{n-2}A^{2-}]}{K_2} \quad (4.2.2)$$

При $i=1$:



Откуда:

$$[H_nA] = \frac{[H^+][H_{n-1}A^{1-}]}{K_1} \quad (4.2.4)$$

Поставив (4.2.2) в (4.2.4) получим:

$$[H_nA] = \frac{[H^+]^2[H_{n-2}A^{2-}]}{K_1K_2} \quad (4.2.5)$$

Рассуждая аналогично для разных величин i и приняв, что $K_0 \equiv 1$ получаем выражение, связывающее равновесные концентрации незаряженных молекул и концентрации частиц всех форм кислоты в растворе, в котором i может принимать значения от 0 до n :

$$[H_nA] = \frac{[H^+]^i [H_{n-i}A^{i-}]}{\prod_{j=0}^i K_j}, \quad (4.2.6)$$

где K_j - константы ионизации соответствующих кислот.

Выразим из (4.2.6) равновесную концентрацию иона $H_{n-i}A^{i-}$:

$$[H_{n-i}A^{i-}] = \frac{[H_nA] \prod_{j=0}^i K_j}{[H^+]^i} \quad (4.2.7)$$

Материальный баланс раствора по анионам кислоты можно выразить уравнением:

$$C_a = \sum_{i=0}^n [H_{n-i}A^{i-}] \quad (4.2.8)$$

где C_a - суммарная концентрация всех форм кислоты в растворе. Подставив (4.2.7) в (4.2.8) получим:

$$C_a = [H_n A] \sum_{i=0}^n \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[H^+]^i} \quad (4.2.9)$$

Выразив из (4.2.9) концентрацию молекул кислоты и подставив полученное выражение в (4.2.7), получим в явном виде формулу, которая позволяет рассчитать равновесные концентрации любой формы кислоты в растворе в зависимости от концентрации протонов и суммарной концентрации кислоты:

$$[H_{n-i} A^{i-}] = C_a \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[H^+]^i \sum_{i=0}^n \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[H^+]^i}} \quad (4.2.10)$$

Условие электронейтральности раствора выражается в том, что суммарный заряд всех катионов равняется суммарному заряду всех анионов. В исследуемом растворе присутствуют катионы металла, протоны, гидроксид-ионы и разные анионы кислоты, соответственно электронейтральность для него будет выражаться уравнением:

$$[Me^+] + [H^+] = [OH^-] + \sum_{i=0}^n i [H_{n-i} A^{i-}] \quad (4.2.11)$$

Т.к. исходный раствор, вообще говоря, может содержать не только сами кислоты, но их соли, концентрация катионов металла складывается из ионов, содержащихся в исходном растворе и ионов, вносимых со щелочью. Для упрощения модели примем, что в исходном растворе могут содержаться только ионы щелочных металлов, тогда:

$$[Me^+] = \frac{C_M V_o}{V_o + V_b} + \frac{C_b V_b}{V_o + V_b} \quad (4.2.12)$$

Где

C_M - концентрация катионов металла в исходном растворе;

C_b - концентрация щелочи, приливаемой к раствору;

V_o - объем исходного раствора;

V_b - объем прилитой щелочи;

Концентрация протонов определяется потенциометрически, следовательно:

$$[\text{H}^+] = 10^{-pH} \quad (4.2.13)$$

Концентрация гидроксид-ионов находится из ионного произведения воды:

$$[\text{OH}^-] = \frac{K_w}{[\text{H}^+]} \quad (4.2.14)$$

Суммарный заряд всех форм кислоты, присутствующих в растворе можно определить на основе уравнения (4.2.10):

$$\sum_{i=0}^n i [\text{H}_{n-i}\text{A}^{i-}] = C_a \sum_{i=0}^n i \left\{ \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[\text{H}^+]^i \sum_{i=0}^n \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[\text{H}^+]^i}} \right\} = C_a f_a(pH) \quad (4.2.15)$$

Где функция $f_a(pH) = \sum_{i=0}^n i \left\{ \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[\text{H}^+]^i \sum_{i=0}^n \frac{\prod_{j=0}^i K_j}{[\text{H}^+]^i}} \right\}$ вводится для упрощения записи

выражений.

Объединив выражения (4.2.11), (4.2.12), (4.2.13), (4.2.14) и (4.2.15) после небольших преобразований получаем:

$$\frac{C_b V_b}{V_o + V_b} + 10^{-pH} - \frac{K_w}{10^{-pH}} = C_a f_a(pH) - C_M \frac{V_o}{V_o + V_b} \quad (4.2.16)$$

Для упрощения записи введем следующие обозначения:

$$f_b(V_b, pH) = \frac{C_b V_b}{V_o + V_b} + 10^{-pH} - \frac{K_w}{10^{-pH}} \quad (4.2.17)$$

$$f_M(V_b) = -\frac{V_o}{V_o + V_b} \quad (4.2.18)$$

После этого(4.2.16) преобразуется к очень простому виду:

$$f_b(V_b, pH) = C_a f_a(pH) + C_M f_M(V_b) \quad (4.2.20)$$

Расширим (4.2.19) на случай раствора нескольких кислот. Кислоты диссоциируют независимо друг от друга, следовательно, для раствора нескольких кислот уравнение (4.2.11) будет отличаться только тем, что в нем будет несколько членов, выражающих суммарный заряд анионов этих кислот. Эти члены будут выражаться формулами, аналогичными (4.2.15), поэтому уравнение (4.2.19) приобретет вид:

$$f_b(V_b, pH) = \sum_{k=1}^N \{C_{ak} f_{ak}(pH)\} + C_M f_M(V_b) \quad (4.2.20)$$

где N – общее количество кислот в растворе, а индекс k показывает номер кислоты, к которой относится соответствующее выражение.

Таким образом, получено выражение, в которое линейно входят параметры, определяемые в результате титрования (концентрации кислот и катионов в исходном растворе). Статистическая оценка этих параметров по данным эксперимента может быть получена методом наименьших квадратов (МНК-оценка). В случае линейного вхождения оцениваемых параметров в исходное выражение МНК-оценка определена однозначно и может быть получена в аналитическом виде, что существенно упрощает расчеты.

Получим МНК-оценку параметров для случая смеси двух кислот, который может быть легко распространен на любое число кислот в растворе.

Предположим, что в результате эксперимента получено M значений pH и соответствующих им величин V_b . По ним можно рассчитать M значений функции $f_b(V_b, pH)$. Обозначим их как $f_{b \text{ практ}}$, в тоже время, подставив соответствующие значения pH и V_b в (4.2.20) можно получить расчетные значения той же функции – обозначим их как $f_{b \text{ теор}}$. В математической статистике доказывается, что оценки параметров, входящих в исходное выражение (4.2.20) будут иметь оптимальные значения, если сумма квадратов разностей $f_{b \text{ практ}}$ и $f_{b \text{ теор}}$ будет минимальной.

$$S = \sum_{k=1}^M (f_{b \text{ практ } k} - f_{b \text{ теор } k})^2 \rightarrow \min \quad (4.2.21)$$

Минимум функции нескольких переменных достигается при условии равенства нулю частных производных этой функции по всем переменным. Таким образом, для случая раствора двух кислот это условие можно записать в виде системы уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial S}{\partial C_{a1}} = 0 \\ \frac{\partial S}{\partial C_{a2}} = 0 \\ \frac{\partial S}{\partial C_M} = 0 \end{cases} \quad (4.2.22)$$

В явном виде функция S может быть записана следующим выражением:

$$S = \sum_{k=1}^M (C_{a1} f_{a1}(pH_k) + C_{a2} f_{a2}(pH_k) + C_M f_M(V_{bk}) - f_b(V_{bk}, pH_k))^2 \quad (4.2.23)$$

Приравняв ее частные производные к 0 и сократив на 2 получим следующую систему уравнений:

$$\begin{cases} C_{a1} \sum_{k=1}^M f_{a1}^2(pH_k) + C_{a2} \sum_{k=1}^M f_{a1}(pH_k) f_{a2}(pH_k) + C_M \sum_{k=1}^M f_{a1}(pH_k) f_M(V_{bk}) = \sum_{k=1}^M f_{a1}(pH_k) f_b(V_{bk}, pH_k) \\ C_{a1} \sum_{k=1}^M f_{a1}(pH_k) f_{a2}(pH_k) + C_{a2} \sum_{k=1}^M f_{a2}^2(pH_k) + C_M \sum_{k=1}^M f_{a2}(pH_k) f_M(V_{bk}) = \sum_{k=1}^M f_{a2}(pH_k) f_b(V_{bk}, pH_k) \\ C_{a1} \sum_{k=1}^M f_{a1}(pH_k) f_M(V_{bk}) + C_{a2} \sum_{k=1}^M f_M(pH_k) f_{a2}(pH_k) + C_M \sum_{k=1}^M f_M^2(V_{bk}) = \sum_{k=1}^M f_M(pH_k) f_b(V_{bk}, pH_k) \end{cases} \quad (4.2.24)$$

Решая данную систему относительно исходных концентраций, получим МНК-оценки исходного состава раствора по данным потенциометрического титрования.

Предложенная математическая модель положена в основу компьютерной программы, которая строит кривые титрования по данным потенциометрического анализа, упрощает расчеты по установлению содержания суммы органических кислот в анализируемом образце и позволяет определить форму (ионная или молекулярная) кислоты в растворе. Иными словами, используя предложенный подход, можно построить так называемые кривые распределения, выражающие зависимость

существования различных анионов кислоты от рН раствора. Таким образом, любое измеренное значение рН дает возможность определить в каком качестве и количестве находится в растворе исследуемая слабая кислота.

3.3. Использование титриметрии в анализе элементного состава лекарственного растительного сырья и растительных препаратов

Лекарственные растения богаты различными микро- и макроэлементами, необходимыми для здоровья человека. Одним из основополагающих элементов опорно-двигательной системы является кальций, формирующий скелет и участвующий в сокращении мышц. БАС растений находятся в биоусваиваемой форме и поэтому эффективны в нормализации минерального баланса. Так, например, филлохинон, содержащийся наряду с соединениями кальция в листьях крапивы двудомной, способствует лучшему усвоению последних костной системой организма [91].

В связи с вышеизложенными фактами актуальной является разработка простых в исполнении, недорогих и воспроизводимых методик анализа элементного состава ЛРС.

3.3.1. Разработка методики титриметрического определения кальция и магния в лекарственном растительном сырье

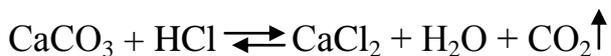
Данные исследования были выполнены совместно с Т.А. Скалозубовой и И.А. Самылиной [180,183, 197-199].

В качестве объекта исследования стала крапива двудомная, богатая кальцием. Были разработаны и запатентованы условия экстракции кальция из листьев крапивы, позволяющие вывести кальций из друз и цистолитов в раствор, что было доказано микроскопическими исследованиями. Далее проводили очистку извлечения от ионов магния, в большом количестве присутствующих в ЛРС и мешающих определению кальция. Было опробовано комплексометрическое титрование раствором трилона Б в присутствии различных индикаторов: эриохрома черного Т, мурексида,

хромогена темно-синего, а также потенциметрически с использованием ион-селективного по кальцию электрода. Для разработки методики извлечения кальция и магния из ЛРС и их количественного определения в извлечениях руководствовались теоретическими расчетами и рассуждениями. Рассматривались такие моменты, как присутствие кальция и магния в ЛРС в виде солей и комплексов с органическими кислотами; возможность растворения соединений этих элементов в воде и растворах кислот различных концентраций; способность ЭДТА вытеснять кальций и магний из их соединений.

Большая доля магния, содержащегося в растении, входит в состав молекул хлорофилла, небольшое количество присутствует в виде солей органических кислот. Высвобождение магния из его соединений в раствор в виде ионов возможно под действием сильных минеральных кислот. Кальций в листьях крапивы двудомной присутствует в составе таких образований, как друзы и цистолиты – в виде соли, а также присутствует в ионной форме в цитоплазме и в виде комплексной соли.

При действии на ЛРС сильной минеральной кислотой, например, кислотой хлористоводородной, друзы и цистолиты, состоящие из оксалата и карбоната кальция, разрушаются, и кальций переходит в извлечение, образуя растворимую соль.



Извлечение готовили на 8%-ой кислоте хлористоводородной. Экспериментально было установлено, что данный уровень концентрации способствует наибольшему переходу кальция в ионную форму.

В результате вышеизложенных соображений была разработана следующая методика определения кальция и магния в ЛРС.

Точную навеску сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, массой около 5 г помещают в коническую или круглодонную термостойкую колбу объемом 200 мл,

прибавляют 100 мл раствора кислоты хлористоводородной с концентрацией 8%. Колбу соединяют с обратным холодильником и кипят на водяной бане в течение 15 мин. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры, после чего фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 200 мл, доводят до метки раствором кислоты хлористоводородной с концентрацией 8%. Катионы магния, как мешающие анализу, осаждают в виде магния гидроксида путем добавления к извлечению концентрированного раствора натрия гидроксида; при этом ионы кальция остаются в растворе.

Вариант а). Индикатор – эриохром черный Т.

Полученный осадок отфильтровывают, а фильтрат нейтрализуют кислотой хлористоводородной концентрированной до $\text{pH} = 7-8$. Затем в коническую колбу вносят 25 мл фильтрата, 25 мл дистиллированной воды, доводят значение pH до 9-10 аммиачным буферным раствором, добавляют небольшое количество индикатора эриохрома черного Т и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) с помощью микробюретки до перехода красной окраски в фиолетово-синюю.

Вариант б). Индикатор – мурексид.

Полученный осадок отфильтровывают, а фильтрат нейтрализуют кислотой хлористоводородной концентрированной до $\text{pH} = 12 - 13$. Затем в коническую колбу вносят 25 мл фильтрата, 25 мл дистиллированной воды, небольшое количество индикатора мурексида и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) с помощью микробюретки до перехода розовой окраски в сиренево-фиолетовую.

Вариант в). Индикатор – хромоген темно-синий.

Полученный осадок отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют раствором концентрированной кислоты хлористоводородной до значения pH равного 10-12. Далее в коническую колбу вносят 25 мл полученного фильтрата, 25 мл дистиллированной воды, небольшое количество индикатора

хромогена темно-синего и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) с помощью микробюретки до перехода красной окраски в сине-фиолетовую.

Содержание ионов кальция в сырье рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,05 \cdot M_{Ca} \cdot 200 \cdot b \cdot 100 \cdot 100}{m_c \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 1000}$$

Где: V - объем раствора ЭДТА, пошедшего на титрование, мл; W - влажность, %; M_{Ca} - молярная масса кальция, г/моль; a - аликвота, мл; 200 - объем мерной колбы, мл; m_c – масса сырья, г; b - разведение.

Вариант в). Потенциометрия

К полученному извлечению добавляют раствор натрия гидроксида концентрированный до рН=5 для правильной работы электрода, так как электрод не работает в сильнокислой среде. В химический стакан отбирают пипеткой 50 мл извлечения и 10 мл раствора 0,1 М раствора калия хлорида. Раствор перемешивают в течение 5-10 мин на магнитной мешалке. Затем в раствор погружают хлорсеребряный и кальций – селективный электроды, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Измеряют электродвижущую силу после установления равновесия. Концентрацию кальция определяют по калибровочному графику (электродвижущая сила – функция концентрации ионов кальция) (рис.36).

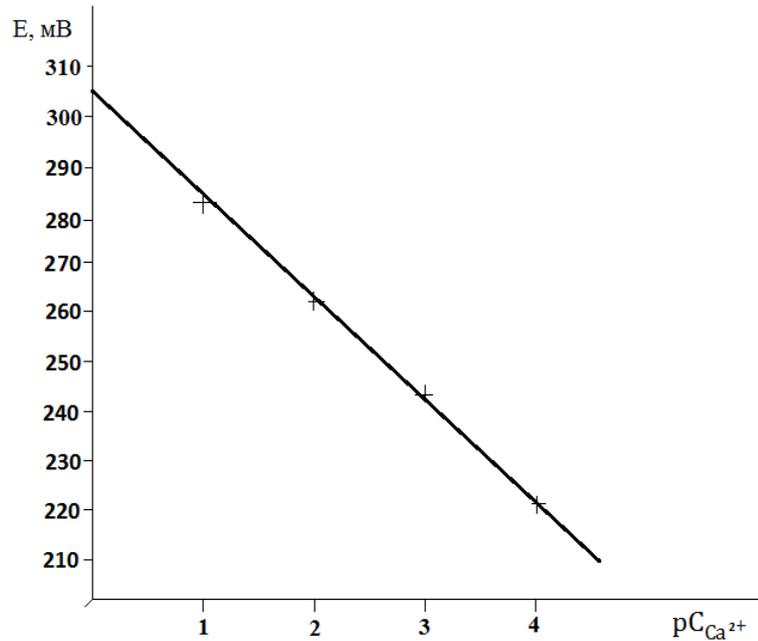


Рис.36. Калибровочный график зависимости ЭДС от отрицательного десятичного логарифма концентрации ионов кальция.

Содержание ионов кальция в сырье, определенное потенциометрически, вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{M_{Ca} \cdot c_{Ca} \cdot b \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{m_c \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 1000}$$

Где: M_{Ca} - молярная масса кальция, г/моль; 200- объем мерной колбы, мл; b -разведение; a - аликвота; c_{Ca} – концентрация ионов кальция, найденная по калибровочному графику, моль/л; m_c – масса сырья, г; W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

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

Методика определения магния. Точную навеску сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, массой около 5 г помещают в колбу объемом 200 мл, заливают 100 мл раствора кислоты хлористоводородной с концентрацией 8%. Колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят на водяной бане в течение

15 мин. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и отфильтровывают через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 200 мл, доводят до метки раствором кислоты хлористоводородной с концентрацией 8%. Отбирают в коническую колбу аликвоту фильтрата, равную 25 мл, добавляют 25 мл воды, 3 мл концентрированного раствора аммиака, аммиачного буферного раствора до значения рН, равного 10, небольшое количество индикатора пирокатехинового фиолетового и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) с помощью микробюретки до перехода зелено-голубой окраски в сине-фиолетовую.

Содержание ионов магния в сырье рассчитывают по формуле:

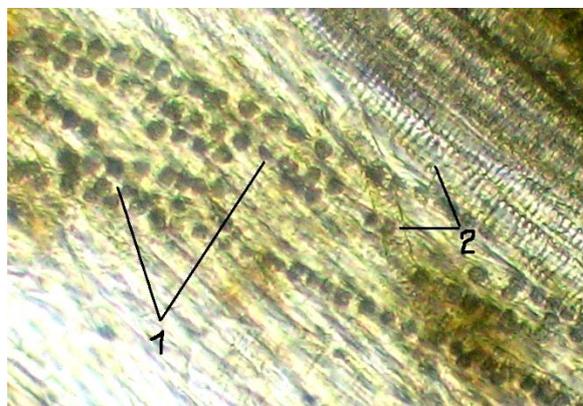
$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,05 \cdot M_{Mg} \cdot 200 \cdot b \cdot 100 \cdot 100}{m_c \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 1000}$$

Где: V - объем раствора ЭДТА, пошедшего на титрование, мл; 200 - объем мерной колбы, мл; M_{Mg} - молярная масса магния, г/моль; b - разведение; m_c - масса сырья, г; a - аликвота; W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

Результаты по содержанию кальция и магния представлены в табл. 41.

Таблица 41. Содержание кальция и магния в листьях крапивы двудомной ($n=5, p=0,95$)

Методика определения кальция/магния с индикатором	Содержание кальция или магния, %	Дисперсия S^2	Среднее квадратическое отклонение S	Доверительный интервал $\pm\Delta X$	Относительная ошибка, %
кальция с эриохромом черным Т	1,2746	0,0003	0,0163	0,0003	0,0219
кальция с мурексидом	1,0124	0,00022	0,0148	0,0002	0,0291
кальция с хромогеном темно-синим	1,1775	0,00024	0,0155	0,0003	0,0262
магния с пирокатехиновым фиолетовым	0,8418	0,0017	0,0415	0,0008	0,0979
кальция потенциометрически	1,3023	0,0014	0,0377	0,0007	0,0497



А

1 – цепочки друз оксалата кальция; 2 – сосуды.



Б

1 – оболочка цистолит; 2 – ретортовидный волосок.

Рис.37. Микропрепарат листа крапивы двудомной с поверхности. А- до воздействия кислоты; Б- после экстракции (увеличение $\times 200$).

Как видно из данных табл. 30, методики индикаторного и потенциометрического определения кальция хорошо воспроизводимы и дают

схожие результаты. Микроскопическое исследование (рис.37) показало, что разработанная методика экстракции обеспечивает полный переход кальция из друз и цистолитов в раствор (на рис. 37Б друзы отсутствуют, а у цистолита видна только оболочка без содержимого).

*Валидация методики количественного определения кальция в листьях
крапивы*

1. Специфичность.

О специфичности разработанной аналитической методики судили по результатам, полученным при титровании действующего вещества- кальция; плацебо; извлечения из ЛРС.

Для получения плацебо из извлечения осаждали ионы кадмия. Для этого к 25 мл фильтрата извлечения, полученного экстракцией раствором кислоты хлористоводородной с концентрацией 8%, добавляли 25 мл дистиллированной воды, 3 мл концентрированного раствора аммиака и аммиачный буферный раствор до значения рН равного 10. В результате получается плацебо, то есть раствор, содержащий все компоненты, кроме анализируемого.

Для доказательства специфичности методики в отношении кальция, анализировали раствор соли кальция с известной концентрацией – 0,1 моль/л. Приготовление раствора, содержащего 0,1 М ионов кальция: точную навеску кальция нитрата массой около 1,64 г, высушенного предварительно до постоянной массы, растворяли в мерной колбе объемом 100 мл в деионизированной воде. Для анализа отбирали 10 мл полученного раствора.

Для доказательства отсутствия влияния экстрагента анализировали воду деионизированную. Титрование проводили на автоматическом титраторе в условиях испытательной лаборатории.

Полученные результаты представлены в табл. 42.

Таблица 42. Данные, доказывающие специфичность титриметрической методики определения кальция в извлечении из ЛРС

Титруемый раствор	Расход титрованного раствора трилона Б (0,05 М)
Растворитель (вода деионизированная)	0 мл
Плацебо	0 мл
Раствор кальция нитрата (0,5 М)	10 мл
Солянокислое извлечение	0,340 мл

Результаты показали специфичность разработанной методики.

2. Линейность.

Для доказательства линейности готовили исследуемый раствор с пятью концентрациями ионов кальция в диапазоне концентраций 80-120% (табл. 43).

Таблица 43. Линейность методики определения кальция в ЛРС

Уровень содержания Ca^{2+} , %	Масса $CaNO_3$, г	Расход раствора ЭДТА, мл
80	3,8622	0,266
80	3,9982	0,276
90	4,3452	0,295
90	4,3863	0,300
100	4,8278	0,330
100	4,8504	0,332
110	5,3107	0,336
110	5,2804	0,360
120	5,7933	0,397
120	5,8049	0,399

Таблица 44. Линейность методики определения кальция в ЛРС (статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y = 0,00043x + 0,00209$
Наклон а	0,00043
Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	0,003
Коэффициент корреляции, r	0,9982

3. Диапазон применения.

Подтверждались такие валидационные характеристики как линейность, правильности и прецизионность.

4. Правильность.

Правильность доказывалась путем анализа растворов с пятью различными (80-120%) концентрациями ионов кальция. Растворы готовили добавлением навесок кальция нитрата в плацебо. Статистические характеристики оценки правильности представлены в табл.45.

5. Прецизионность.

5.1 Сходимость

Сходимость показана на шести подготовленных растворах, содержащих 100% концентрации ионов кальция в исследуемом растворе (табл. 46).

Таблица 45. Статистические характеристики правильности методики определения кальция в ЛРС

Уровень содержания ионов кальция, %	Навеска кальция нитрата, г	Расход титранта, мл	Определенное содержание, %	Заданное содержание, %	Отклик, %
80	3,8622	0,266	0,946	0,942	100,42
80	3,9982	0,276	0,980	0,975	100,51
90	4,3452	0,295	1,046	1,059	98,77
90	4,3863	0,300	1,067	1,070	99,72
100	4,8278	0,330	1,172	1,178	99,49
100	4,8504	0,332	1,179	1,183	99,66
110	5,3107	0,336	1,298	1,295	100,23
110	5,2804	0,360	1,280	1,288	99,38
120	5,7933	0,397	1,410	1,413	99,79
120	5,8049	0,399	1,418	1,416	100,14
Статистические характеристики					Результат
Среднее значение					99,81%
Стандартное отклонение					0,45%
Коэффициент вариации					0,45%
Нижняя граница доверительного интервала					99,36%
Верхняя граница доверительного интервала					100,26%

Таблица 46. Сходимость методики определения кальция в ЛРС
(статистические характеристики)

Проба (шифр)	Расход титранта, мл	Содержание кальция, %
1	0,341	1,211
2	0,340	1,207
3	0,338	1,200
4	0,350	1,242
5	0,342	1,214
6	0,340	1,207
Статистические характеристики		Результат
Наименьшее значение, %		1,200
Наибольшее значение, %		1,242
Среднее значение, %		1,214
Стандартное отклонение, %		0,012
Коэффициент вариации, %		0,97
Доверительный интервал $P = 0,95\%$		1,202-1,226

5.2 Промежуточная прецизионность

Доказательство промежуточной прецизионности проводили по результатам, полученных разными провизорами-аналитиками (табл.47).

Таблица 47. Прецизионность методики определения кальция в ЛРС
(статистические характеристики)

№ эксп.	Сотрудник 1			Сотрудник 2		
	Навеска кальция нитрата, г	Расход титранта, мл	Содержание кальция, %	Навеска кальция нитрата, г	Расход титранта, мл	Содержание кальция, %
1	4,8213	0,331	1,186	4,8205	0,331	1,176
2	4,8215	0,344	1,210	4,8246	0,329	1,168
3	4,8309	0,335	1,193	4,8286	0,332	1,178
4	4,8309	0,335	1,193	4,8301	0,335	1,189
5	4,8400	0,336	1,189	4,8225	0,331	1,176
6	4,8254	0,333	1,182	4,8226	0,338	1,200

Статистические характеристики

Статистические характеристики	Результаты сотрудник А	Результаты сотрудник В
Наименьшее значение, %	1,182	1,176
Наибольшее значение, %	1,210	1,200
Среднее значение, %	1,192	1,181
Стандартное отклонение, %	0,008	0,010
Коэффициент вариации, %	0,67	0,83
Доверительный интервал, %	1,256-1,272	1,171-1,191

Было проведено определение содержания кальция в настое листьев крапивы, который готовили согласно ОФС «Настои и отвары» ГФ XI, при соотношении сырья и экстрагента 1:10

Методика определения содержания кальция в настое. Аликвоту настоя, равную 10 мл помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл дистиллированной воды, добавляют концентрированный раствор натрия гидроксида для осаждения ионов магния в виде магния гидроксида, ионы кальция остаются в растворе.

Вариант а). Индикатор – эриохром черный Т.

Полученный осадок отфильтровывают, а фильтрат нейтрализуют концентрированной кислотой хлористоводородной до значения рН, равного 7-8. К полученному фильтрату добавляют аммиачный буферный раствор до значения рН, равного 9-10, небольшое количество индикатора эриохрома черного Т и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) с помощью микробюретки до перехода красной окраски в фиолетово-синюю.

Вариант б). Индикатор – мурексид.

Полученный осадок отфильтровывают, а фильтрат нейтрализуют концентрированным раствором кислоты хлористоводородной до значения рН, равного 12-13. К фильтрату добавляют небольшое количество индикатора мурексида и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) из микробюретки до перехода розовой окраски в сиренево-фиолетовую.

в) Определение магния с индикатором – хромогеновым темно-синим.

Полученный осадок отфильтровывают, а фильтрат нейтрализуют концентрированным раствором кислоты хлористоводородной до значения рН, равного 10-12. В фильтрат добавляли небольшое количество индикатора хромогена темно-синего и титруют раствором трилона Б (NaЭДТА) (0,05 М) из микробюретки до перехода красной окраски в сине-фиолетовую.

Содержание ионов кальция в настое рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{V \cdot 0,05 \cdot M_{Ca} \cdot b \cdot V_1 \cdot 100}{m_n \cdot a \cdot 1000}$$

Где: V - объем раствора ЭДТА, пошедшего на титрование, мл; M_{Ca} - молярная масса кальция, г/моль; b - разведение; a - аликвота; m_n - масса настоя, определенная пикнометрически, г; V_1 - объем настоя, мл.

Вариант г). Потенциометрия.

В химический стакан вносят 50 мл настоя, смешивают с 10 мл раствора калия хлорида с концентрацией 1 моль/л. В стакан погружают магнит и перемешивают раствор в течение 5-10 мин с помощью магнитной мешалки. Затем в раствор погружают хлорсеребряный и кальций - селективный электроды, соединенные с иономером и измеряют значение ЭДС после установления равновесия. Концентрацию кальция устанавливают по калибровочному графику ($ЭДС = f(C_{Ca^{2+}})$).

На следующем этапе была разработана методика потенциометрического определения кальция в жидких экстрактах, компонент(ы) которых содержат включения: крапивы, водяного перца, левзеи, «Ротокан», элутерококка.

Методика. 50 мл жидкого экстракта из лекарственного растительного сырья подкисляют раствором кислоты хлористоводородной до pH=5 с целью перевода кальция в растворенное состояние. Затем смешивают экстракт в химическом стакане с раствором калия хлорида с концентрацией 1 моль/л в соотношении 5:1. В стакан погружают магнит и перемешивают раствор в течение 5-10 мин на магнитной мешалке. Затем погружают хлорсеребряный и кальций-селективный электроды, соединенные с клеммами иономера и измеряют электродвижущую силу после установления равновесия. Концентрацию кальция устанавливают по калибровочному графику ($ЭДС = f(C_{Ca^{2+}})$).

Содержание ионов кальция в жидких экстрактах, определенное потенциометрически, вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{M_{Ca} \cdot c_{Ca} \cdot b \cdot V \cdot 100}{m \cdot a \cdot 1000}$$

Где: M_{Ca} - молярная масса кальция, г/моль; V - объем экстракта, мл; b - разведение; a - аликвота; c_{Ca} – концентрация ионов кальция, найденная по калибровочному графику, моль/л; m – масса экстракта, определенная пикнометрически, г;

Результаты по содержанию кальция в настое крапивы и жидких экстрактах представлены в табл. 48, 49.

Таблица 48. Содержания кальция и магния в настое и жидком экстракте листьев крапивы ($n=10$; $f=0,95$)

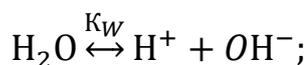
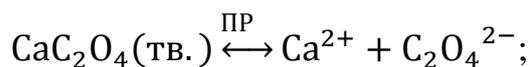
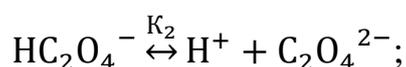
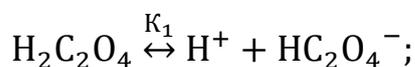
Методика	Объект анализа	Содер – жание кальция или магния, %	Дисперсия S^2	Среднее квадратическое отклонение S	Доверительный интервал $\pm \Delta X$	Относительная ошибка, %
Определение Ca с эриохромом черным Т	Настой 1:10 (ГФ XI)	0,0748	1,57E-07	0,00039	7,85E-06	0,104975
	Жидкий экстракт 1:1	0,0816	1,12E-8	0,00011	2,10E-06	0,025791
Определение Ca с мурексидом	Настой 1:10 (ГФ XI)	0,0553	6,48E-8	0,00025	5,05E-06	0,067036
	Жидкий экстракт 1:1	0,0775	5,00E-9	7,07E-05	1,40E-06	0,018092
Определение Ca с хромогенном темносиним	Настой 1:10 (ГФ XI)	0,0729	7,20E-9	0,00008	1,68E-06	0,023081
	Жидкий экстракт 1:1	0,0800	8,00E-08	0,00283	5,61E-05	0,701083
Определение Mg с пирокатехиновым фиолетовым	Настой 1:10 (ГФ XI)	0,0377	2,95E-8	1,72E-04	3,41E-06	0,090462
	Жидкий экстракт 1:1	0,0471	4,61E-8	2,15E-04	4,26E-05	0,090462
Потенциометрическое определение Ca	Настой 1:10 (ГФ XI)	0,0649	0,0061E-07	0,000008	1,54E-06	0,023784
	Жидкий экстракт 1:1	0,0804	0,015E-07	0,000012	2,38E-06	0,029666

Таблица 49. Содержания кальция в жидких экстрактах потенциометрическим методом ($n=10; f=0,95$)

Экстракт	Водяного перца	Ротокан	Элеутерококка	Левзеи
Содержание кальция, %	0,064±0,003	0,016±0,002	0,010±0,003	0,040±0,004

3.3.2. Математическая модель определения растворимости оксалата кальция в растворах кислоты хлористоводородной и зависимость рН насыщенных растворов от аналитической концентрации кислоты хлористоводородной

Модель является термодинамической и позволяет рассчитать растворимость оксалата кальция в зависимости от рН и концентрации кислоты хлористоводородной. Данная процедура обеспечивает подбор условий для более эффективной экстракции без постановки предварительного эксперимента. В кислом растворе оксалата кальция устанавливаются следующие равновесия:



Запишем уравнения условий равновесия:

$$[H^+][HC_2O_4^-] = K_1[H_2C_2O_4]; (4.3.1)$$

$$K_1 = 5,6 \cdot 10^{-2}; \beta_1 = \frac{1}{K_1} (\beta - \text{константа устойчивости})$$

$$[H^+][C_2O_4^{2-}] = K_2[HC_2O_4^-]; (4.3.2)$$

$$K_2 = 5,4 \cdot 10^{-5}; \beta_2 = \frac{1}{K_2}$$

$$[Ca^{2+}][C_2O_4^{2-}] = ПР; ПР = 2,3 \cdot 10^{-9}; (4.3.3)$$

$$[H^+][OH^-] = K_w; K_w = 10^{-14} (4.3.4)$$

$$[Cl^-] = C, (4.3.5)$$

где C - концентрация добавленной кислоты хлорисоводородной.

Уравнения материального баланса:

По кальцию: $[Ca^{2+}] = S$; (4.3.6)

По $[C_2O_4^{2-}]$: $[C_2O_4^{2-}] + [HC_2O_4^-] + [H_2C_2O_4] = S$; (4.3.7)

Условие электронейтральности раствора:

$$[H^+] + 2[Ca^{2+}] = [HC_2O_4^-] + 2[C_2O_4^{2-}] + [OH^-] + C \quad (4.3.8)$$

Протонное условие (гидролиз $C_2O_4^{2-}$ нет смысла учитывать, поскольку $K_r(C_2O_4^{2-})$ на 5-6 порядков меньше K_a).

$$[H^+] = C + [OH^-] \quad (4.3.9)$$

Если концентрация насыщенного раствора оксалата кальция (растворимость) равна S , то $PP = S^2$.

Для равновесия осадок – насыщенный раствор:

Для удобства обозначим $[C_2O_4^{2-}]$ как $[Ox^{2-}]$.

Отсюда:

$$[Ca^{2+}] = \frac{PP}{[Ox^{2-}]} \quad (4.3.10)$$

Т.к. концентрация кислоты хлорисоводородной, введенной в раствор совпадает с концентрацией хлорид-ионов:

$$[Cl^-] = C \quad (4.3.11)$$

Из ионного произведения воды следует, что:

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} \quad (4.3.12)$$

Переходя к константам устойчивости из (4.3.1) и (4.3.2) получим:

$$[H_2Ox] = \beta_1 \beta_2 [H^+]^2 [Ox^{2-}] \quad (4.3.13)$$

$$[HOx^-] = \beta_2 [H^+] [Ox^{2-}] \quad (4.3.14)$$

Подставив значения из (4.3.5) и (4.3.12) в уравнение электронейтральности получим:

$$2 \frac{PP}{[Ox^{2-}]} + [H^+] = C + \frac{K_w}{[H^+]} + 2[Ox^{2-}] + \beta_2 [H^+] [Ox^{2-}] \quad (4.3.15)$$

Т.к. при растворении оксалата кальция в раствор выходит равное количество катионов и анионов, материальный баланс определяется выражением:

$$[\text{Ca}^{+2}] = [\text{Ox}^{2-}] + [\text{HOx}^-] + [\text{H}_2\text{Ox}] \quad (4.3.16)$$

Подставив в (4.3.3) значения из (4.3.15) и (4.3.16) получим:

$$\frac{PP}{[\text{Ox}^{2-}]} = [\text{Ox}^{2-}] + \beta_2 [\text{H}^+] [\text{Ox}^{2-}] + \beta_1 \beta_2 [\text{H}^+]^2 [\text{Ox}^{2-}] \quad (4.3.17)$$

Вынесем за скобку концентрацию оксалат-иона в правой части уравнения, умножим обе части на эту же концентрацию, перенесем выражение в скобках в левую часть и возьмем корень квадратный. В результате преобразований получим:

$$[\text{Ox}^{2-}] = \sqrt{\frac{PP}{1 + \beta_2 [\text{H}^+] + \beta_1 \beta_2 [\text{H}^+]^2}} \quad (4.3.18)$$

Таким образом, мы получили в явном виде функцию зависимости равновесной концентрации оксалат-ионов от концентрации ионов водорода, а, следовательно, и от рН.

Дальнейший расчет можно вести двумя разными путями, в зависимости от поставленных условий.

Если достаточно знать зависимость растворимости оксалата кальция от рН, то, помня о том, что равновесная концентрация ионов кальция равна растворимости, подставляем (4.3.18) в (4.3.10) и получаем в явном виде зависимость $S=f(\text{pH})$:

$$S = \frac{PP}{\sqrt{\frac{PP}{1 + \beta_2 10^{-\text{pH}} + \beta_1 \beta_2 10^{-2\text{pH}}}}} = \frac{\sqrt{PP}}{\sqrt{1 + \beta_2 10^{-\text{pH}} + \beta_1 \beta_2 10^{-2\text{pH}}}} \quad (4.3.19)$$

Если же необходимо знать зависимость не просто от рН, а от концентрации введенной в систему кислоты хлористоводородной, то необходимо подставить (4.3.18) в (4.3.15) при этом получим функцию

зависимости концентрации ионов водорода от концентрации введенной кислоты хлористоводородной, но уже в неявном виде:

$$\frac{2\sqrt{PP}}{\sqrt{\frac{1}{1+\beta_2[H^+]+\beta_1\beta_2[H^+]^2}}} - \sqrt{\frac{PP(2+\beta_2[H^+])^2}{1+\beta_2[H^+]+\beta_1\beta_2[H^+]^2}} = C + \frac{K_w}{[H^+]} - [H^+] \quad (4.3.20)$$

Выразить из этого выражения концентрацию ионов водорода в явном виде невозможно, но данное уравнение можно достаточно легко решить численно, например, стандартным методом деления отрезка пополам на интервале рН от 0 до 14. Таким образом, получим некоторую функцию $pH = f(C)$. Подставив ее значение в (4.3.19) получим зависимость растворимости оксалата кальция от концентрации кислоты хлористоводородной.

Данная математическая модель положена в основу компьютерной программы, позволяющей предсказать степень перехода кальция из оксалата кальция в раствор при заданной концентрации кислоты хлористоводородной.

ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 3:

1. Показана возможность использования потенциометрического титрования в анализе ЛРС, содержащего различные количества дубильных веществ, и водных извлечений, полученных из него.
2. Разработаны и валидированы методики потенциометрического определения дубильных веществ в 10 видах ЛРС (корневища лапчатки, корневища змеевика, корневища бадана, соплодия ольхи, кора дуба, листья мяты перечной, листья шалфея лекарственного, трава зверобоя, трава Melissa лекарственной, трава чабреца) и водных извлечениях из него.
3. Показана возможность применения потенциометрического титрования при определении органических кислот в ЛРС и водных извлечениях, полученных из него.
4. Разработаны и валидированы методики потенциометрического определения суммы свободных органических кислот в 10 видах ЛРС (в плодах: рябины, черной смородины, шиповника, калины; в листьях: мяты перечной, шалфея лекарственного; цветках: ромашки аптечной, бессмертника; траве: чабреца, Melissa), 2 витаминных сборах и водных извлечениях. Установлено, что потенциометрическое определение не применимо в анализе извлечений с рН выше 5,6.
5. Показана возможность применения титриметрического определения дубильных веществ и органических кислот при «сквозной» стандартизации в цепочке «ЛРС - лекарственная форма - лекарственный препарат». Разработаны методики количественного определения дубильных веществ и органических кислот в 5-ти экстракционных и комплексных препаратах из ЛРС.
6. Разработаны и валидированы методики титриметрического определения (с использованием индикатора) кальция и магния в ЛРС, настоях, жидких экстрактах и потенциометрического определения содержания кальция в ЛРС, настоях и препаратах.

7. Составлены 3 математические модели, положенные в основу соответствующих компьютерных программ, облегчающих проведение расчетов и прогнозирование результата при разработке аналитических методик и рутинном анализе:

- 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 $T, P=Const$, которые легли в основу соответствующих компьютерных программ.

Глава 4. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

При работе с ЛРС широко применяется метод спектрофотометрии. Он используется для количественного определения флавоноидов, антраценпроизводных, сапонинов и других групп БАС [1], когда требуется определять сумму веществ, оказывающих фармакологическое действие. Для этого проводят либо непосредственное фотометрирование суммы веществ после очистки, либо получают окрашенные комплексы с реактивами, обладающими определенной селективностью (дифференциальный метод). Пересчет суммы веществ ведут по стандартному образцу.

Развитие базы аналитических приборов, появление современных спектрофотометров требуют внесения корректив в некоторые существующие методики определения, а также выявления общих закономерностей для разработки новых методик. Исследования по совершенствованию спектрофотометрических методик определения флавоноидов в ЛРС проводились в 2007-2014гг, в период действия ГФ XI изд.

4.1. Применение спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды

Определение отдельных флавоноидов по максимумам собственного поглощения в прямой спектрофотометрии проводят в рабочих диапазонах длин волн 330-370 нм и в коротковолновой области. Максимумы поглощения в коротковолновой области спектра отличаются большей интенсивностью, но зачастую менее пригодны для анализа из-за малой площади вершины пика, что приводит к большим ошибкам определения. Относительная ошибка прямого спектрофотометрического определения составляет $\pm 2-5\%$ и может быть снижена при дифференциальной методике анализа до 0,5-1,0%. Рабочий интервал концентраций составляет от 5 до 20 мкг в 1 мл раствора.

В настоящее время в фармакопейных методиках и при анализе ЛРС, наиболее часто применяют спектрофотометрическое определение окрашенного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом в связи с широкой доступностью реактива и устойчивостью комплекса. При этом, для подавления собственной диссоциации флавоноидов, добавляют кислоту уксусную или хлористоводородную. Кроме того, добавление кислоты исключает протекание реакции по кольцу В у соединений, имеющих два фенольных гидроксила в этой части молекулы. Комплексы, образующиеся между небольшим избытком алюминия хлорида и орто-гидроксильными группами А и В колец, разрушаются в присутствии кислоты. Комплексы с алюминия хлоридом, образующиеся между С4 кето-группой и 3- или 5-гидроксильной группой оказываются стабильны в присутствии кислоты. Таким образом, добавление кислоты приводит к протеканию реакции в соотношении 1:1 и делает ее более специфичной по отношению к фенольным соединениям, имеющим орто-гидроксильные группы, но лишенных соседней кетогруппы.

4.1.1. Спектрофотометрические характеристики стандартных образцов некоторых флавоноидов

Основным подходом к расчету суммарного содержания флавоноидов в ЛРС является использование стандартных образцов. В связи с этим были исследованы спектральные характеристики некоторых флавоноидов, которые широко представлены в ЛРС и являются наиболее доступными коммерческими образцами.

Были исследованы государственные стандартные образцы (ГСО) флавоноидов: апигенина, кверцетина, лютеолина-7-глюкозида, лютеолина и рутина. Эти соединения доминируют в химическом составе ряда лекарственных растений, богатых флавоноидами и имеют отличия в спектральных характеристиках [81].

Для анализа были приготовлены 0,05% растворы предварительно высушенных до постоянной массы флавоноидов в спирте этиловом 96%

(растворы А). Для получения обзорных абсорбционных спектров 1 мл раствора А разбавляли в мерной колбе объемом 25 мл 96% спиртом. В качестве раствора сравнения использовали 96% спирт этиловый. Полученные спектры поглощения представлены на рис. 38, 40, 42, 44, 46, 48.

Далее были получены и проанализированы дифференциальные спектры поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом. Для этого по 1 мл раствора А каждого ГСО флавоноида помещали в мерные колбы объемом 25 мл, добавляли по 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, по 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводили до метки 96% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали 1 мл раствора А соответствующего ГСО флавоноида и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, которые разбавляли 96% спиртом этиловым в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Также был получен дифференциальный электронный спектр смеси ГСО флавоноидов. Для этого брали по 1 мл раствора А каждого флавоноида (для кверцетина – 0,5 мл), переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 5 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводили до метки 96% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали смесь, состоящую из растворов А каждого ГСО флавоноида, взятого в количестве 1 мл (кверцетина - 0,5 мл), 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доведенных в мерной колбе до 25 мл 96% спиртом этиловым.

Полученные дифференциальные спектры представлены на рис. 39, 41, 43, 45, 47, 49.

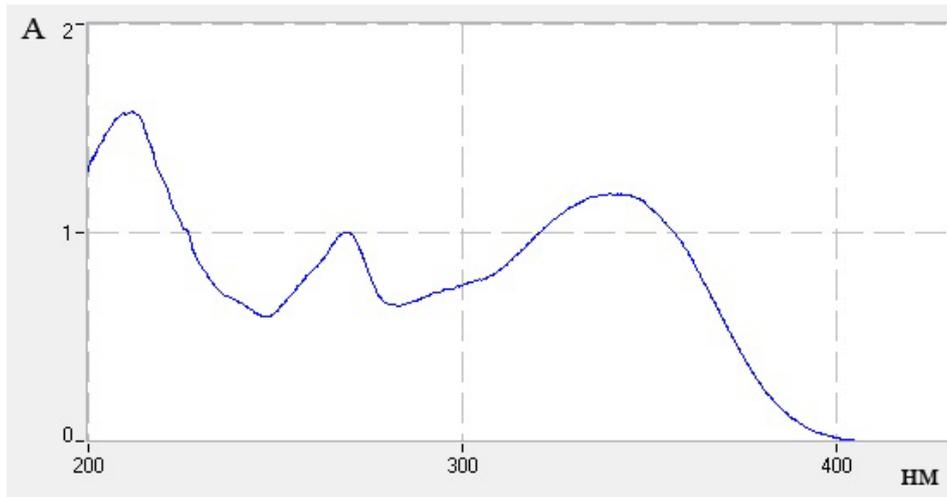


Рис.38. Абсорбционный спектр раствора ГСО апигенина.

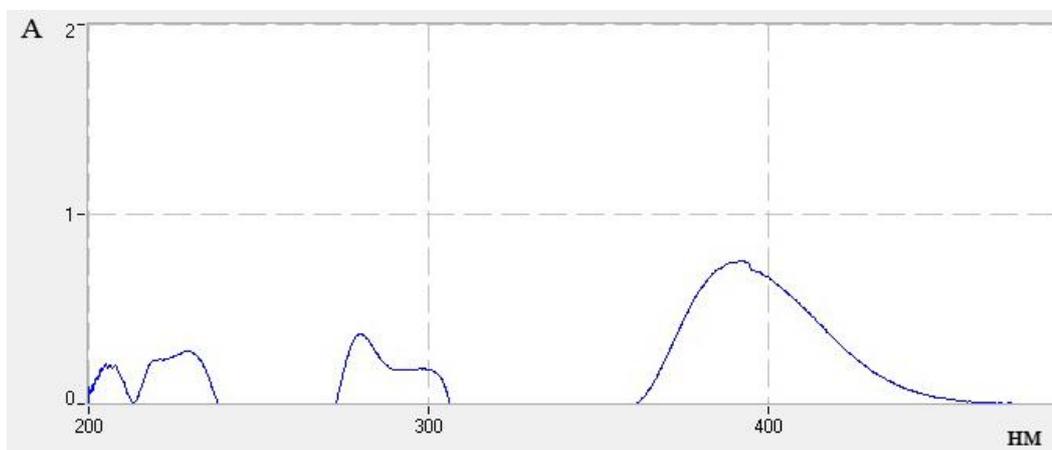


Рис.39. Дифференциальный спектр поглощения комплекса ГСО апигенина с алюминия хлоридом.

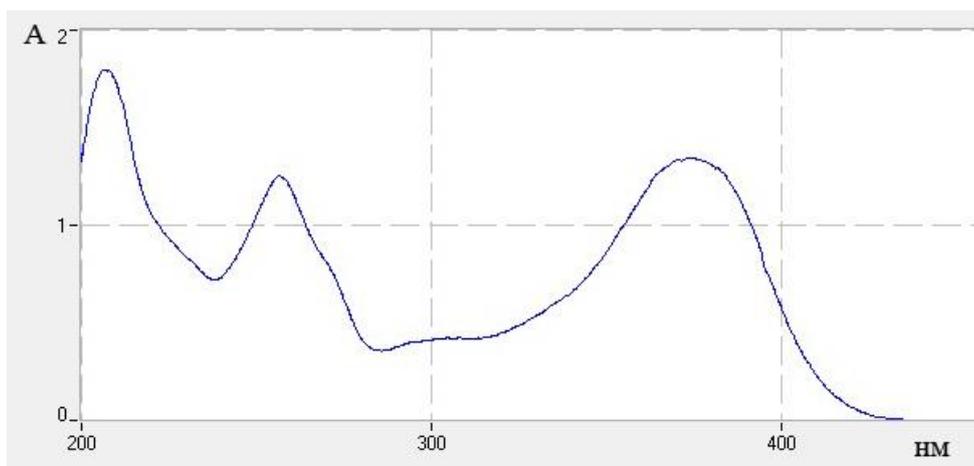


Рис.40. Абсорбционный спектр раствора ГСО кверцетина.

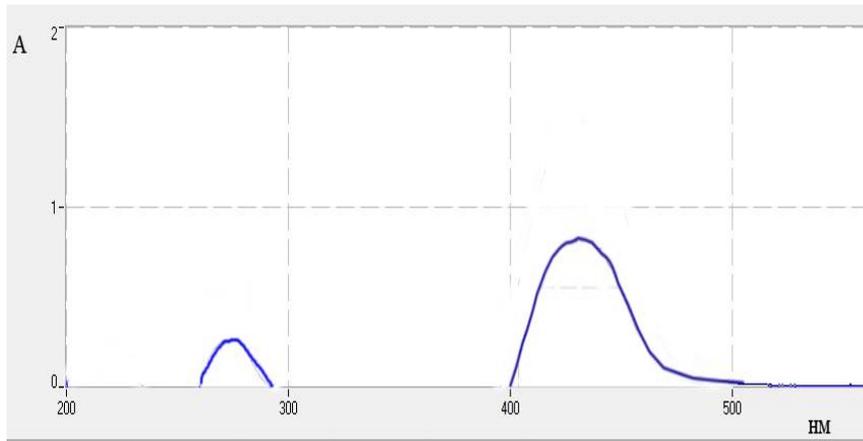


Рис. 41. Дифференциальный спектр поглощения комплекса ГСО кверцетина с алюминия хлоридом.

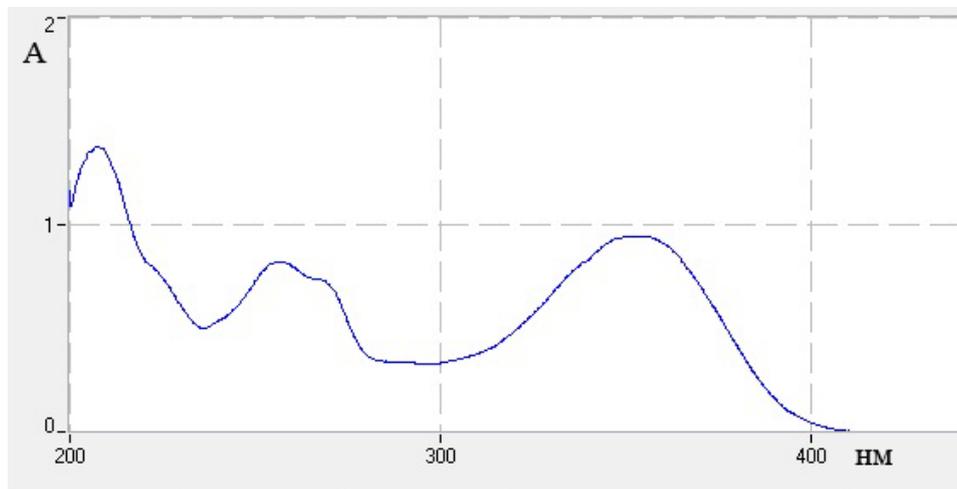


Рис.42. Абсорбционный спектр раствора ГСО лютеолина-7-О-глюкозида.

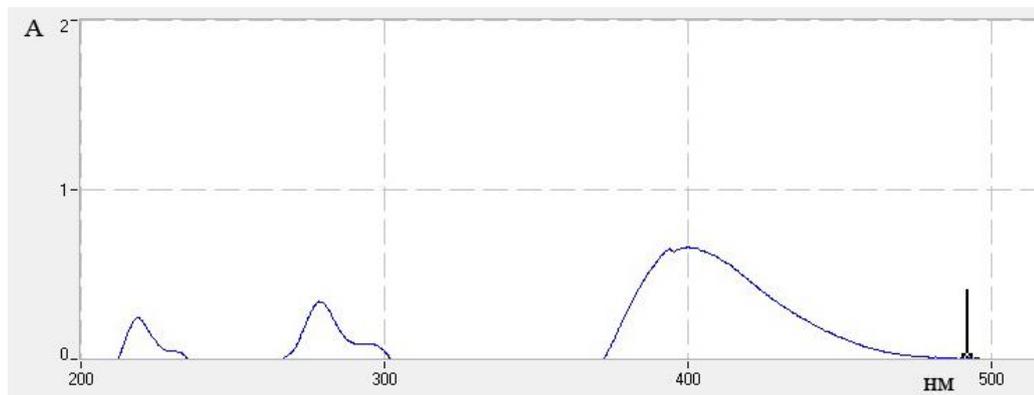


Рис.43. Дифференциальный спектр поглощения комплекса ГСО лютеолина-7-О-глюкозида с алюминия хлоридом.

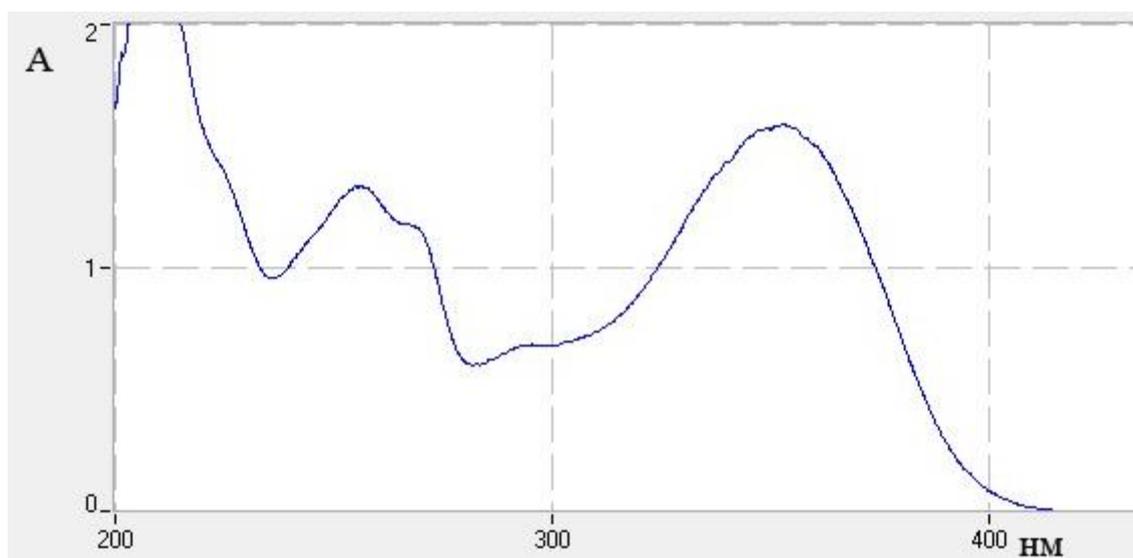


Рис.44. Абсорбционный спектр раствора ГСО лутеолина.

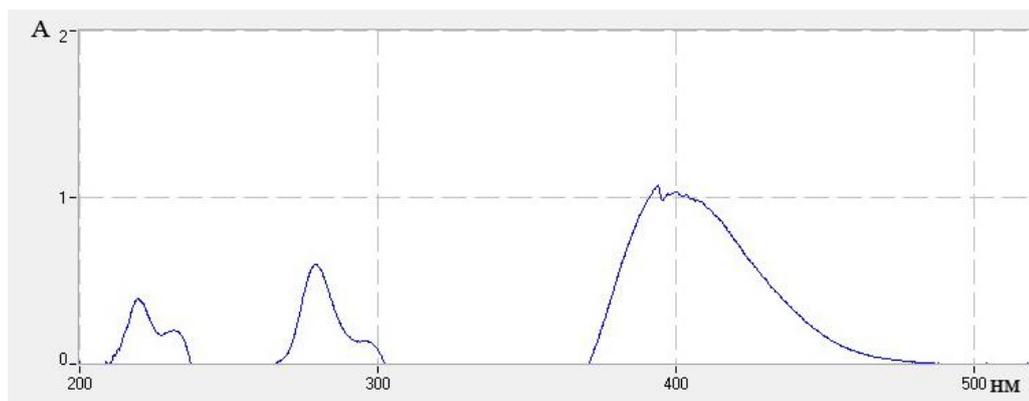


Рис.45. Дифференциальный спектр поглощения комплекса ГСО лутеолина с алюминия хлоридом.

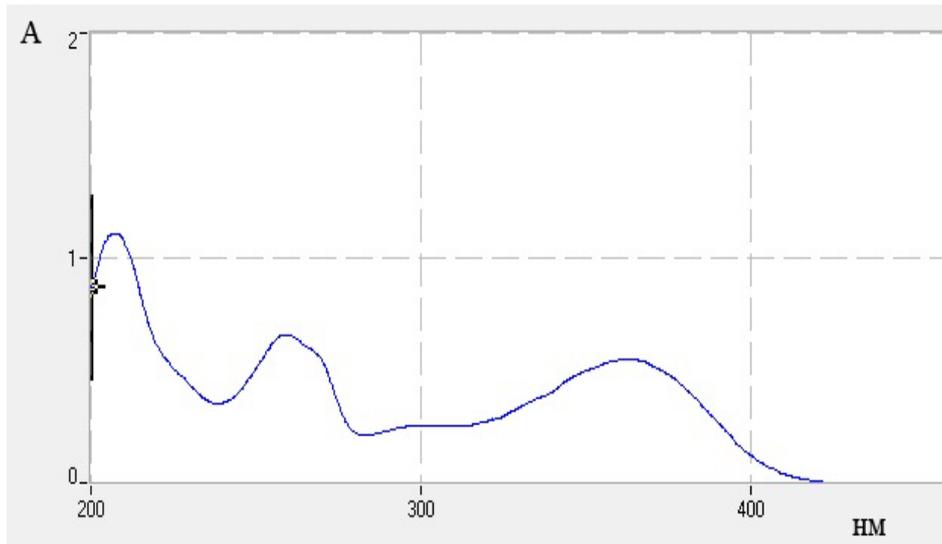


Рис.46. Абсорбционный спектр раствора ГСО рутина.

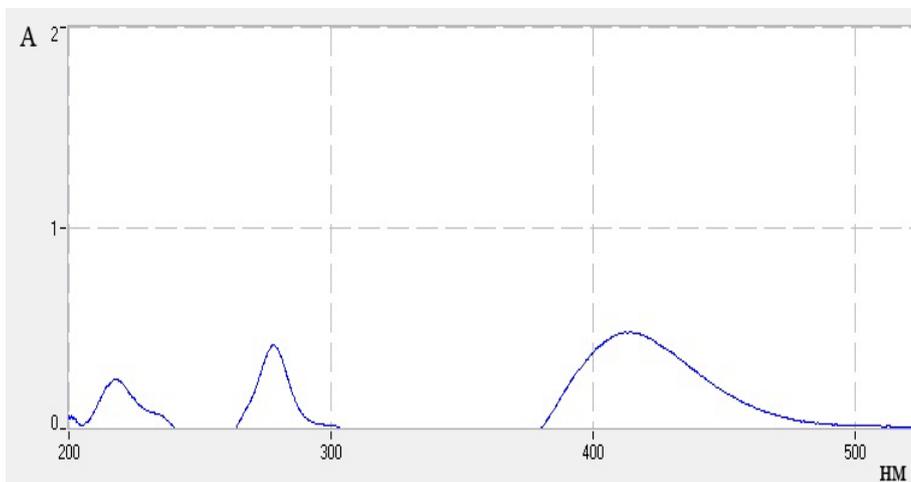


Рис.47. Дифференциальный спектр поглощения комплекса ГСО рутина с алюминия хлоридом.

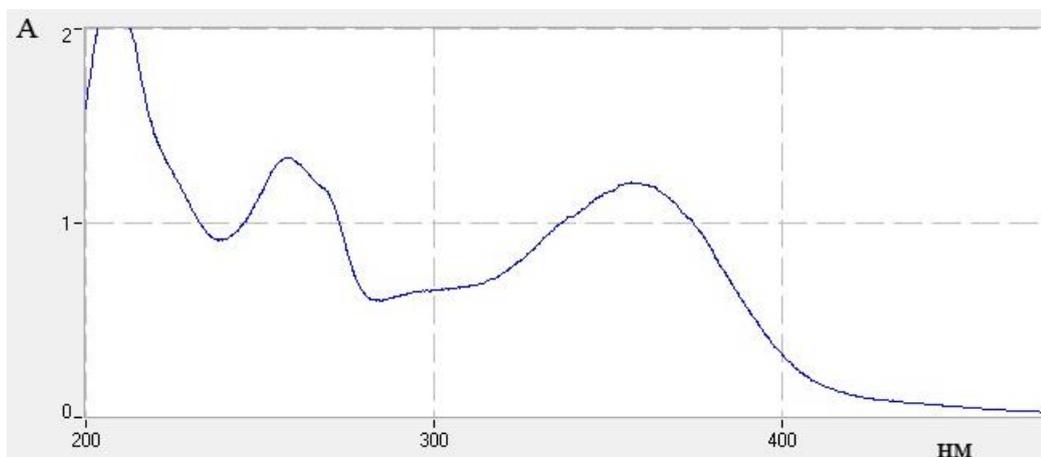


Рис.48. Абсорбционный спектр раствора смеси ГСО флавоноидов.

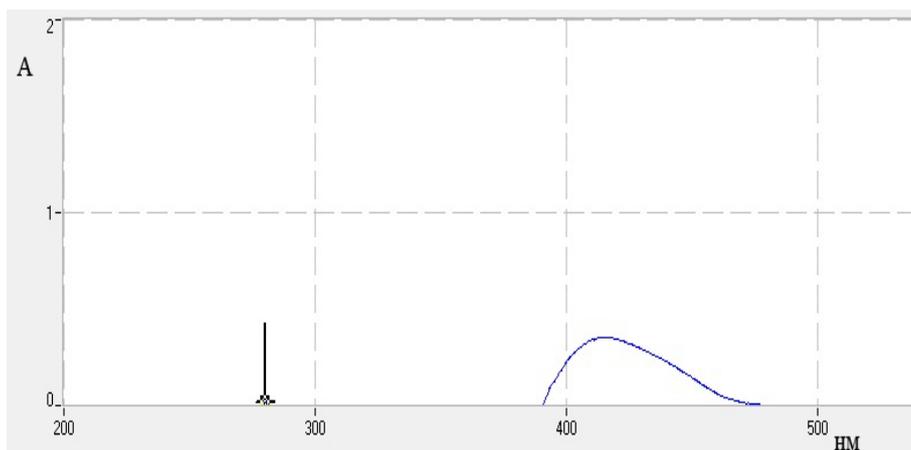


Рис. 49. Дифференциальный спектр поглощения комплексов ГСО флавоноидов с алюминия хлоридом.

Из представленных спектров ГСО лютеолина и ГСО лютеолина-7-О-глюкозида (рис.43-46) видно, что максимумы поглощения приходятся на одни и те же значения длин волн, следовательно, гликозидирование в данном случае не влияет на спектральные характеристики флавоноида. Максимумы поглощения в дифференциальных спектрах флавоноидов и соответствующие им значения оптических плотностей представлены в табл. 50.

Таблица 50. Максимумы поглощения и соответствующие им значения оптических плотностей в дифференциальных спектрах флавоноидов

Флавоноид, ГСО	Аналитическая длина волны, нм	Величина оптической плотности
Апигенин	398	0,69
Кверцетин	425	1,41
Лютеолин-7-О-глюкозид	400	0,62
Лютеолин	400	1,03
Рутин	409	0,47
Смесь флавоноидов	414	0,35

4.1.2. Определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника и настое.

Цветки бессмертника – официальное ЛРС, в котором по ГФ XI изд., вып.2 (статья 9), регламентируется содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид. Методика не предусматривала проведение очистки или использования дифференциальной спектрофотометрии, а предлагала определять содержание флавоноидов по суммарному спектру поглощения спиртового извлечения.

Присутствие в цветках бессмертника сопутствующих соединений может вносить вклад в абсорбционный спектр, поэтому нами была воспроизведена данная методика на пяти сериях различных производителей с использованием спектрофотометрии в диапазоне длин волн 300-500 нм.

Точную навеску сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, массой около 1 г помещали в колбу объемом 250 мл, прибавляли 100 мл 50% спирта и экстрагировали на водяной бане при температуре 60°C в течение 15 мин. Полученное извлечение, охлажденное до комнатной температуры, фильтровали через бумажный фильтр, который предварительно смачивали 50% спиртом, в мерную колбу объемом 500 мл. Экстракцию повторяли указанным выше способом еще 4 раза. Полученные описанным образом извлечения фильтровали в ту же мерную колбу и доводили их объем 50% спиртом этиловым до метки (раствор А).

Аликвоту раствора А объемом 1 мл переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки 95% спиртом этиловым (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре в интервале длин волн 300-500 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 95% спирт этиловый.

Типичный абсорбционный спектр извлечения цветков бессмертника представлен на рис. 50. Как видно, при длине волны 315 нм, при которой рекомендовано снимать значение поглощения, выраженный максимум

отсутствует, и однозначно определить аналитическую длину волны невозможно. Размытая зона поглощения указывает на присутствие в извлечении ряда мешающих соединений, имеющих близкие максимумы абсорбции. В этом случае целесообразно применять дифференциальную спектрофотометрию, например, после комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом.

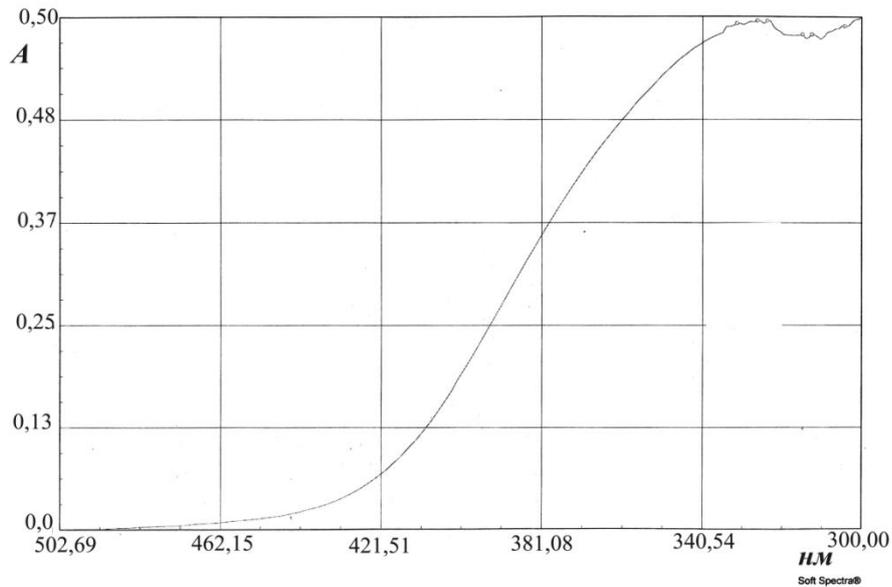


Рис.50. Спектр поглощения спиртового извлечения из цветков бессмертника.

Были подобраны оптимальные условия получения комплекса флавоноидов цветков бессмертника с алюминия хлоридом (время реакции, соотношение объема извлечения и 2% раствора комплексообразователя). Полученные данные представлены в табл. 51.

Для получения дифференциального спектра поглощения, 2 мл раствора А переносили в мерную колбу объемом 25 мл, добавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида, 0,5 мл разведенной кислоты уксусной и доводили до метки объем раствора 95% этиловым спиртом (раствор В). Оптическую плотность раствора В измеряли через 20 минут после начала реакции комплексообразования на спектрофотометре при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (рис. 52). Раствором сравнения служила

смесь, состоящая из 2 мл раствора А и 0,5 мл разведенной кислоты уксусной, доведенных 95% спиртом до метки в мерной колбе объемом 25 мл.

Таблица 51. Подбор условий реакции комплексообразования флавоноидов цветков бессмертника с алюминия хлоридом

Время после начала реакции, мин	Оптическая плотность	Количество добавленного 2% раствора алюминия хлорида, мл	Оптическая плотность (через 20 мин после начала реакции)
8	0,25	0	0
15	0,34	0,5	0,18
20	0,42	1,0	0,26
29	0,42	1,5	0,33
39	0,43	2,0	0,42
49	0,42	2,5	0,42
59	0,43	3,0	0,42

Стандартный образец изосалипурпозид на российском рынке не доступен. Была рассмотрена возможность использования для этих целей ГСО рутина, для чего был получен и проанализирован спектр поглощения комплекса ГСО рутина с алюминия хлоридом.

Навеску ГСО рутина массой около 0,02 г (точная навеска), предварительно высушенного в сушильном шкафу при 60⁰С в течение 30 мин, помещали в колбу вместимостью 100 мл. Добавляли 60 мл 70% спирта этилового и проводили экстракцию на водяной бане до полного растворения рутина. После охлаждения доводили объем до 100 мл спиртом этиловым 70% (раствор Б).

1 мл раствора Б переносили в мерную колбу объемом 25 мл, добавляли 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте этиловом, 2 капли разведенной кислоты уксусной и доводили до метки 70% спиртом этиловым.

Раствор сравнения готовили следующим образом: 1 мл раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 2 мл 95% спирта этилового и доводили до метки 70% спиртом. Спектр поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом представлен на рис. 51. Максимум поглощения

комплекса ГСО рутина, имеющего паспорт, с алюминия хлоридом приходится на длину волны 409 ± 2 нм, что позволяет сделать вывод о том, что в приведенных условиях анализа возможно установление содержания суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного дифференциальной спектрофотометрией в пересчете на рутин.

Было подтверждено, что поглощение раствора комплекса рутина с алюминия хлоридом подчиняется закону Бугера–Ламберта–Бера. Калибровочный график (рис.52), показывает возможность использования рутина в качестве стандартного образца.

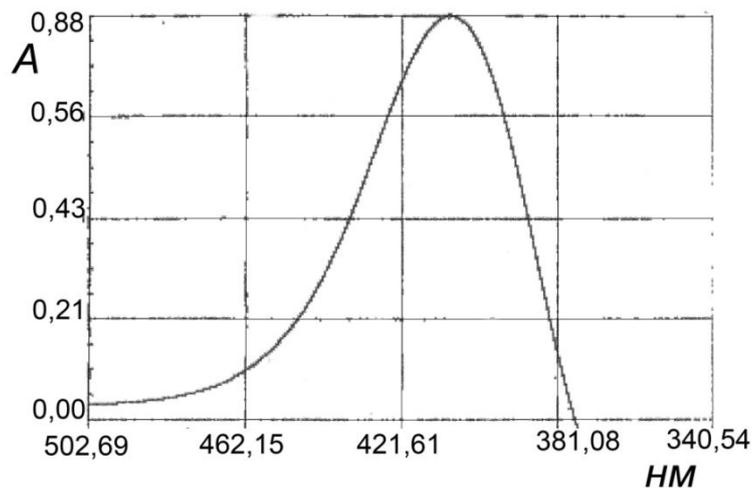


Рис. 51. Абсорбционный спектр комплекса ГСО рутина с алюминия хлоридом.

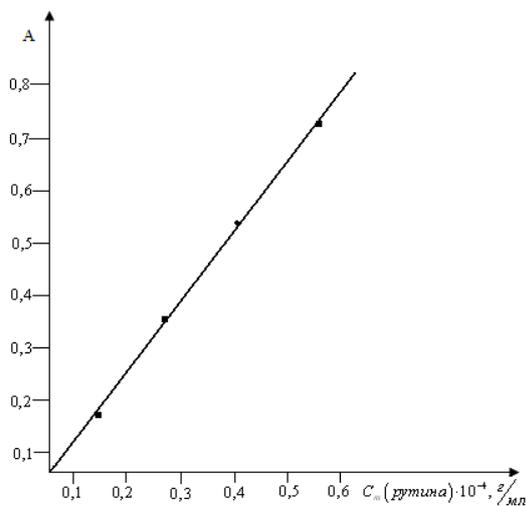


Рис. 52. Калибровочный график комплекса рутина с алюминия хлоридом

Содержание суммы флавоноидов в цветках бессмертника в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 500 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где: m_0 – масса рутина, г; A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом; m – масса сырья, г; W – влажность, %.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 52.

Таблица 52. Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов цветков бессмертника ($n = 5$)

X_{cp}	S	P	S^2	Δx	$\varepsilon \%$
3,18	0,074	95	0,0054	4,64E-05	2,3

Содержание суммы флавоноидов в цветках бессмертника в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье составляет в среднем 3,18%. Так как анализу были подвергнуты пять серий различных производителей, приобретенные в аптечных сетях (следовательно, соответствующие по качеству требованиям НД), то эти данные можно считать достоверными. Если рекомендовать метод дифференциальной фотометрии для включения в НД, то необходимо менять существующую норму содержания суммы флавоноидов (не менее 6%).(табл. 52). Дифференциальный метод позволит проводить анализ с большей точностью и селективностью.

Предложенная методика позволяет определять поглощение в интервале от 0,2 до 1, что обеспечивает наименьшую ошибку эксперимента. Длины волн, соответствующие максимумам поглощения всех анализируемых серий представлены в табл. 53.

Таблица 53. Длины волн, соответствующие максимумам поглощения всех анализируемых серий цветков бессмертника

Серия (шифр)	Длина волны λ_{\max} , нм	Оптическая плотность при λ_{\max}
1	409	0,38
2	410	0,37
3	409	0,39
4	407	0,42
5	409	0,36

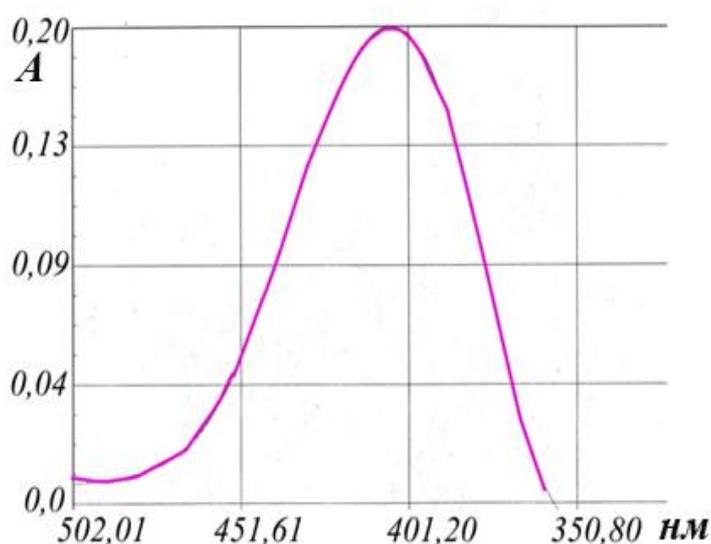


Рис. 54. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов спиртового извлечения из цветков бессмертника с алюминия хлоридом.

Определение суммы флавоноидов в настое цветков бессмертника

Цветки бессмертника применяются для приготовления настоя, в который переходят, наряду с другими группами БАС и флавоноиды, поэтому следующей задачей было определение их содержания в настое цветков бессмертника.

Настой готовили по методике ГФ XI изд. [19]. Для этого навеску сырья массой около 10 г (точная навеска) помещали в инфундирку, добавляли 100 мл воды комнатной температуры, нагревали на водяной бане 15 минут. Затем настой выдерживали при комнатной температуре 45 минут и фильтровали

через ватно-марлевый фильтр в мерную колбу объемом 100 мл. Объем настоя доводили водой до метки. Значение рН настоя, измеренное потенциометрически, составило 5,46 [69].

Аликвоту настоя, равную 1 мл, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводили объем раствора до метки водой. Раствор сравнения готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили 1 мл настоя, 2 мл спирта этилового 96%, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводили водой до метки. Спустя 20 минут измеряли оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов в настое цветков бессмертника с алюминия хлоридом на спектрофотометре в толщине слоя 10 мм в интервале длин волн 330-500 нм. Спектр поглощения полученного комплекса представлен на рис. 54.

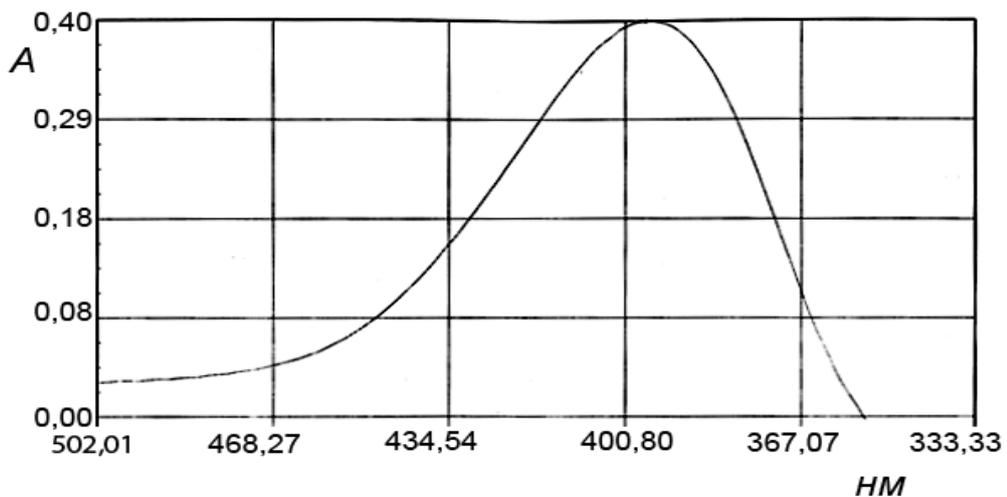


Рис.54. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов настоя цветков бессмертника с алюминия хлоридом.

Максимум поглощения комплекса флавоноидов настоя цветков бессмертника приходится на длину волны 396 ± 2 нм. Различие в значении максимумов поглощения дифференциальных комплексов флавоноидов и водно-спиртового и водного экстрактов связаны с разным компонентным составом растворов. Кроме того, в воде и водно-спиртовом растворе

преобладают различные флавоноиды, что было показано в наших ранних работах [116,119]. Влияние на расположение максимума поглощения может оказывать различный температурный режим экстракции.

Длина волны 396 нм наиболее близка к максимуму поглощения апигенина (398 нм), который, согласно литературным данным [6,44,56], присутствует в сырье. Поэтому содержание суммы флавоноидов в настое цветков бессмертника предложено проводить в пересчете на апигенин.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин (в %) в настое цветков бессмертника рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 25 \cdot m_n},$$

Для выражения содержания суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в настое цветков бессмертника в мг в 1 мл настоя использовали формулу:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1000}{A_0 \cdot 25 \cdot 25},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца апигенина с алюминия хлоридом; m_n – масса настоя, определенная пикнометрически, г; m_0 – масса апигенина, г.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин в настое цветков бессмертника представлено в табл. 54.

Таблица 54. Содержание суммы флавоноидов в настое цветков бессмертника ($n=5$; $p=0,95$)

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин	в % от массы настоя	в 1 мл настоя, в мг
		0,029±0,002

4.1.3. Определение суммы флавоноидов в траве пустырника и препаратах

В ГФ XI изд. (дополнение к ст. 54) трава пустырника стандартизуется по содержанию суммы экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом, и

сумме иридоидов. Европейская фармакопея предлагает определять сумму флавоноидов в пересчете на гиперозид посредством дифференциальной фотометрии после реакции с алюминия хлоридом. В качестве экстрагента используется смесь гексаметилентетрамина с ацетоном и хлористоводородной кислотой. Затем проводят очистку этилацетатом [79]. Методика достаточно трудоемка и длительна в исполнении, предполагает использование нескольких агрессивных органических растворителей. Была рассмотрена возможность разработки более простой и универсальной методики количественного определения флавоноидов в траве пустырника.

Флавоноиды, содержащиеся в траве пустырника, согласно проведенным качественным реакциям, достоверно обнаруживаются в спиртовых извлечениях (табл. 55).

Таблица 55. Результаты качественных реакций на флавоноиды с извлечениями из травы пустырника и настойкой пустырника

	Объект исследования	Реакция			
		с раствором алюминия хлоридом	проба Chinoda	с раствором ацетата свинца	с реактивом Вильсона
1	Спиртовое извлечение травы пустырника	+	+	+	–
2	Водное извлечение травы пустырника	–	–	+	–
3	Настойка пустырника	+	+	+	+

«+» – положительный результат реакции; «–» – отрицательный результат реакций.

Результаты реакций показали присутствие в пробах 1 и 3 флавоноидов, в том числе флавонолов и флавонол-3-гликозидов и флавоноидов, содержащих орто-гидроксильные группы. Однако реакция с ацетатом свинца не является достаточно специфичной, а реакция с реактивом Вильсона дает положительный результат только с настойкой пустырника, поэтому универсальными методами подтверждения присутствия флавоноидов в

рамках «сквозной» стандартизации можно считать общегрупповую реакцию с алюминия хлоридом и проба *Chinoda*.

При разработке методики определения суммы флавоноидов в траве пустырника подбирали оптимальные параметры: концентрацию спирта, соотношение сырья и экстрагента, время экстракции, время реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом, соотношение количества извлечения и 5% раствора алюминия хлорида. Результаты представлены в табл. 56–58.

Таблица 56. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из травы пустырника ($n=5$; $P=0,95$)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье:экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстрагент			
30	3:100	20	0,12±0,01
40			0,15±0,02
50			0,16±0,01
60			0,18±0,03
70			0,23±0,02
80			0,20±0,02
Соотношение сырье : экстрагент			
70	1:100	20	0,22±0,01
	2:100		0,22±0,02
	3:100		0,23±0,01
	4:100		0,19±0,03
	5:100		0,20±0,03
Время экстрагирования			
70	3:100	20	0,19±0,01
		30	0,20±0,03
		40	0,23±0,03
		50	0,23±0,01
		60	0,24±0,02

Таблица 57. Влияние времени на полноту образования комплекса флавоноидов пустырника с алюминия хлоридом ($n=5$; $P=0,95$)

Время	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,12±0,02	0,14±0,03	0,16±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01

Таблица 58. Влияние соотношения аликвоты извлечения (2 мл) и объема 5% раствора алюминия хлорида на образование комплекса ($n=5$; $p=0,95$)

Объем раствора $AlCl_3$	0,5 мл	1 мл	2 мл	3 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,15±0,02	0,21±0,03	0,23±0,01	0,23±0,01

Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов пустырника с алюминия хлоридом в диапазоне длин волн 350-450 нм представлен на рис.55. Содержание суммы флавоноидов в траве пустырника в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье составило $0,23\pm 0,03\%$

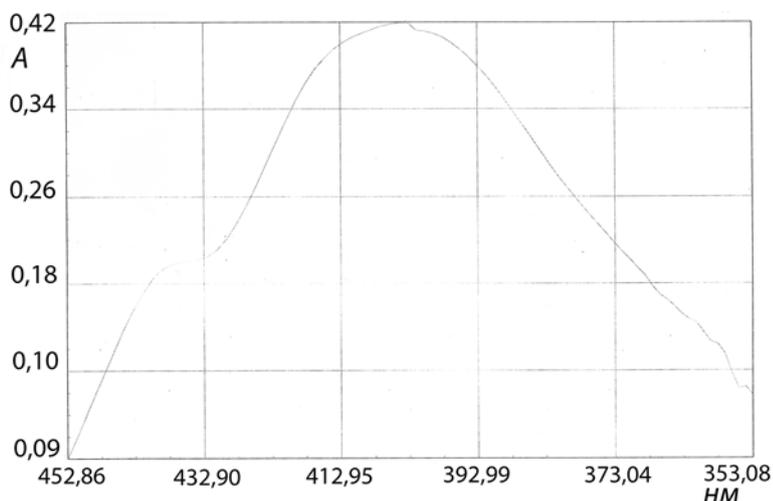


Рис. 55. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов травы пустырника с алюминия хлоридом.

Полученные данные были использованы при разработке методики определения содержания суммы флавоноидов в траве пустырника.

Методика. Точную навеску сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, массой около 3 г, помещают в колбу со шлифом объемом 200 мл, приливают 100 мл 70% спирта этилового, проводят экстракцию с обратным холодильником на плитке в течение 40 мин, периодически перемешивая для удаления частиц сырья со стенок колбы. Затем содержимое колбы охлаждают, фильтруют через ватно–марлевый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки 70% спиртом этиловым (раствор А).

Аликвоту раствора А, объемом 2 мл, переносят мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят до метки 70% спиртом этиловым. Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов травы пустырника с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 403 ± 2 нм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный следующим образом: в мерную колбу объемом 25 мл вносят 2 мл раствора А, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят 70% спиртом этиловым до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (X) в % в траве пустырника рассчитывают по формуле:

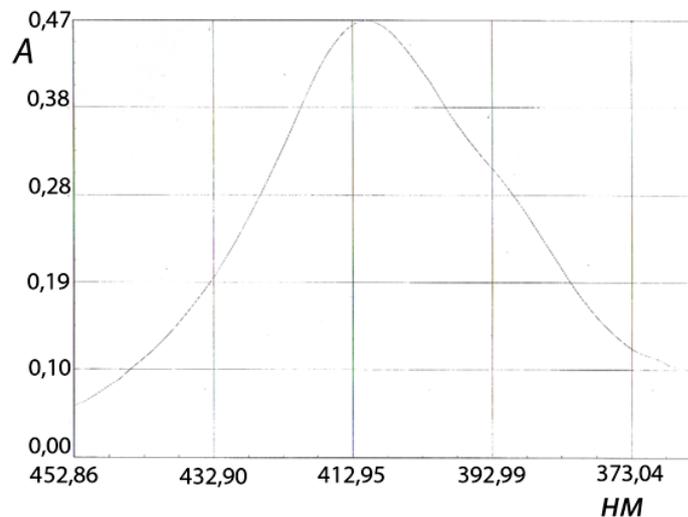
$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

Где m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО рутина, г; A –оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 –оптическая плотность раствора ГСО рутин; W – потеря сырья в массе при высушивании, %.

Для изучения возможности применения дифференциальной спектрофотометрии в «сквозной» стандартизации травы пустырника и его препаратов по содержанию суммы флавоноидов были разработаны методики для настоя и настойки пустырника.

Определение суммы флавоноидов в настойке пустырника

Предварительно в диапазоне длин волн 370-450 нм были получены абсорбционные спектры комплексов флавоноидов настойки травы пустырника с алюминия хлоридом с добавлением кислоты уксусной и без добавления (рис.56,57). Сравнительный анализ спектров показал, что без добавления кислоты происходят процессы диссоциации флавоноидов, так как в этом случае помимо основного максимума поглощения, присутствует «плечо». Это может свидетельствовать о том, что реакция между флавоноидами и алюминия хлоридом протекает в соотношении более, чем один к одному, то есть в реакции принимают участие фенольные гидроксилы кольца В. Таким образом, более рациональной является методика с добавлением кислоты. Положение максимума поглощения дифференциального спектра флавоноидов настойки пустырника с алюминия хлоридом приходится на 411 ± 2 нм, что позволяет проводить пересчет



суммы на рутин.

Рис. 56. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов настойки пустырника с алюминия хлоридом в присутствии кислоты.

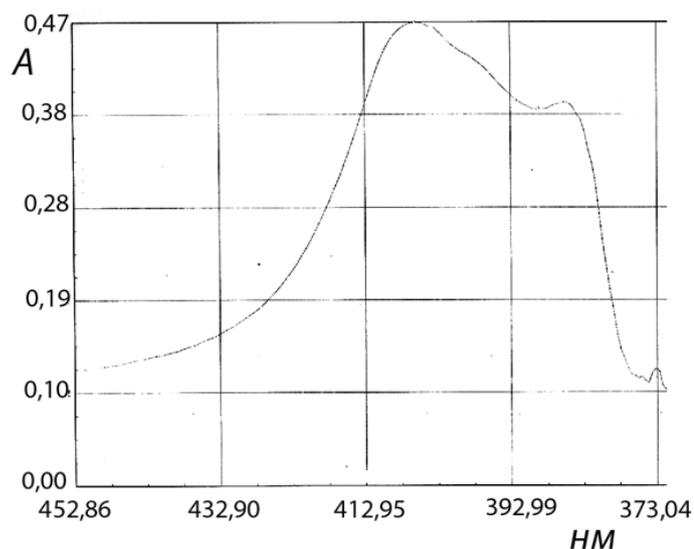


Рис.57. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов настойки пустырника с алюминия хлоридом, полученный без добавления кислоты.

Методика. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл настойки пустырника, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят до метки 70% спиртом. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 411 нм.

Для получения раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл настойки, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки 70% спиртом этиловым.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мг/мл (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000}{A_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25}$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора; A₀ – оптическая плотность раствора ГСО рутина с алюминия хлоридом; m₀ – масса рутина, г.

Содержание в настойке пустырника суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило 0,065 мг/мл. Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 59.

Таблица 59. Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в настойке травы пустырника ($n=5$; $p=0,95$)

$X_{\text{ср}}$	S	S^2	$\pm\Delta x$	$\varepsilon \%$
0,065	0,0011	1,25E-06	1,13E-05	1,7

Определение суммы флавоноидов в настое травы пустырника

Трава пустырника широко используется для изготовления настоя. Была рассмотрена возможность использования разработанной методики для определения флавоноидов в настое травы пустырника.

Настой готовили согласно инструкции по применению: навеску сырья массой около 3 г (точная навеска) помещали в эмалированную посуду вместимостью 500 мл, приливали 200 мл доведенной до кипения воды и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 минут, затем настаивали при комнатной температуре 45 минут и фильтровали через ватно-марлевый фильтр.

При добавлении спиртового раствора алюминия хлорида к настою травы пустырника происходило выпадение осадка, что не давало возможности проведения спектрофотометрического анализа. Подбор разбавления и соотношения объема аликвоты настоя и раствора алюминия хлорида, а также воды и спирта не дали положительных результатов. Поэтому было решено использовать сухой алюминия хлорид и создавать кислую среду для подавления гидролиза. Также понадобилось добавление натрия ацетата для создания буферности, потому что сдвиг значения рН среды приводил к неустойчивости раствора (выпадение осадка).

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 5 мл настоя, добавляли 0,2 г сухого алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 0,2 г натрия ацетата и доводили 70% спиртом этиловым до метки (рабочий раствор). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 5 мл настоя, 0,2 г натрия ацетата, 0,5 мл кислоты уксусной

разведенной и доводили 70% спиртом этиловым до метки (раствор сравнения). Через 40 минут снимали абсорбционный спектр комплекса флавоноидов настоя травы пустырника с алюминия хлоридом. Максимум поглощения, характерный для комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом отсутствовал, что свидетельствовало о том, что при данных условиях получения настоя, флавоноиды пустырника в воду не переходят. Однако на абсорбционном спектре присутствовал ярко выраженный максимум при длине волны 348 ± 2 нм. При добавлении алюминия хлорида пожелтение раствора не наблюдалось. Длина волны и визуальная оценка результата протекающей в настое реакции при добавлении алюминия хлорида дают возможность предположить, что максимум поглощения обусловлен оптическими свойствами фенольных соединений нефлавоноидной природы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что дифференциальная спектрофотометрия для определения суммы флавоноидов может быть использована при стандартизации травы пустырника и настойки. При этом аналитическая длина волны в первом случае составляет 403 ± 2 нм, а во втором – 411 ± 2 нм. Обе длины волны позволяют проводить пересчет содержания флавоноидов на рутин. Для определения содержания флавоноидов в настое травы пустырника метод дифференциальной спектрофотометрии окрашенного комплекса с алюминия хлоридом не применим.

4.1.4. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в траве чабреца и препаратах

Трава чабреца по ГФ XI изд. стандартизуется по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 50% спиртом. Сырье применяется для производства жидкого экстракта и для получения настоя [52,56,80]. В обеих лекарственных формах присутствуют гидрофильные БАС, в том числе флавоноиды [56]. Были проведены исследования по разработке спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в сырье и препаратах чабреца.

При разработке методики определения содержания суммы флавоноидов в траве чабреца были подобраны оптимальные условия экстракции (соотношение сырья и экстрагента, концентрация спирта, время экстрагирования) и реакции комплексообразования (продолжительность реакции, устойчивость комплекса во времени, соотношение объема извлечения и раствора комплексообразователя). Результаты представлены в табл. 60, 61, 62.

Максимум поглощения комплекса флавоноидов чабреца с алюминия хлоридом наблюдался при длине волны 405 ± 2 нм.

Таблица 60. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из травы чабреца ($n=5$; $p=0,95$)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстрагент			
30	1:20	20	1,31±0,01
40			1,19±0,02
50			1,34±0,01
60			1,28±0,03
70			1,24±0,02
Соотношение сырье : экстрагент			
50	1:20	20	1,30±0,01
	1:30		1,30±0,02
	1:40		1,33±0,01
	1:50		1,26±0,03
Время экстрагирования			
50	1:40	20	1,33±0,01
		30	1,23±0,03
		40	1,17±0,03
		50	1,36±0,01
		60	1,22±0,02

Таблица 61. Влияние соотношение объема извлечения и раствора алюминия хлорида на полноту образования комплекса с флавоноидами ($n=5$; $p=0,95$)

Объем 5% раствора алюминия хлорида	0,5 мл	1 мл	2 мл	3 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,98±0,02	1,16±0,03	1,36±0,04	1,36±0,04

Таблица 62. Влияние времени на полноту образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом ($n=5$; $p=0,95$)

Время, мин	5	10	15	20	30	50
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,28±0,04	1,31±0,02	1,34±0,03	1,36±0,01	1,36±0,01	1,37±0,01

Пересчет суммы флавоноидов на рутин целесообразно проводить в связи с тем, что полученные спектры исследуемых образцов имеют максимумы поглощения, укладывающиеся в полуширину полосы поглощения стандартного образца рутина.

Методика.

Около 1 г (точная навеска)измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, приливают 40 мл 50% спирта этилового и нагревают с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 50 мин при периодическом перемешивании для удаления частиц сырья со стенок колбы. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через ватно-марлевый фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем 50% спиртом до метки (раствор А).

Аликвоту раствора А равную 2 мл помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 2 мл 5% раствора алюминия хлорида, приготовленного на 70% спирте этиловом и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной.

Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 20 мин.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 405 ± 2 нм.

Раствором сравнения служил раствор, состоящий из 2 мл извлечения и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доведенных 70% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) в траве чабреца вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

Где А– оптическая плотность испытуемого раствора, А₀ – оптическая плотность раствора комплекса ГСО рутин с алюминия хлоридом; m – масса сырья, г; m₀ – масса рутина, г; W– потеря в массе сырья при высушивании, %.

Метрологические характеристики предложенной методики представлены в табл. 63.

Таблица 63. Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в траве чабреца ($n=5$; $p=0,95$)

X _{ср}	S	P	S ²	±Δx	ε %
1,36	0,02	95	0,00037	0,00054	1,5

Валидация методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в траве чабреца.

При проведении валидационных исследований для разработанной методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве чабреца были определены: специфичность, линейность, диапазон применения, правильность, прецизионность.

1.Специфичность

Специфичность доказывалась путем анализа абсорбционных спектров экстрагента (водно-этанольной смеси) извлечения из травы чабреца на фоне раствора сравнения – экстрагента и комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом в сравнении с раствором, содержащем те же компоненты и в тех же количествах, что и в рабочем за исключением алюминия хлорида. Экстрагент при анализируемой длине волны не поглощает электромагнитное излучение, следовательно, не влияет на точность анализа.

Вследствие того, что применяется метод дифференциальной спектрофотометрии, поглощение экстракта будет нивелировано присутствием в кювете сравнения всех компонентов экстракта, кроме комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом.

2. Линейность

Линейность доказывалась на различных разведениях исследуемого раствора (не менее 5-ти) в диапазоне применения как минимум 80–120% концентрации анализируемого вещества в растворе [3]. Оценка линейности проводилась при помощи уравнения регрессии методом наименьших квадратов. Проводилось 5 определений величины оптической плотности, измеренных при проведении анализа по вышеприведенной методике для 5 вариантов навесок в пределах разброса значений массы навески $\pm 25\%$ одной серии травы чабреца. Полученные данные представлены в табл. 64. В результате обработки данных получена прямая, описываемая уравнением регрессии первой степени. Рассчитанный коэффициент корреляции равен 0,98. Критерий приемлемости соблюден.

Таблица 64. Зависимость оптической плотности от массы навески травы чабреца

Масса навески, г	0,7706	0,9289	1,0321	1,1353	1,2101
Оптическая плотность	0,41	0,49	0,55	0,60	0,64

Для разработанной аналитической методики были показаны такие характеристики как линейность, правильность и прецизионность в диапазоне применения. Дальнейшие исследования не требуются [3].

3. Правильность

Доказать правильность путем сравнения методики не представляется возможным в связи с тем, что спектрофотометрически определяется сумма флавоноидов. Так как нет другой валидной методики для определения суммы флавоноидов в траве чабреца, правильность доказывалась методом добавок

[50]. Отклик определялся путем добавления действующего вещества – рутина к исследуемому образцу (извлечению) с известной концентрацией флавоноидов в пересчете на рутин. Полученный отклик был пропорционален добавленному количеству рутина, это однозначно доказывает, что определяется именно рутин (флавоноиды), а не какие-либо другие компоненты.

При определении правильности проводили 9 испытаний с 3 концентрациями в выбранном диапазоне применения методики [3]. Оценка проводилась путем расчета процента определения известного добавленного количества действующего вещества, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($p=0,95$). Полученные результаты и метрологические характеристики представлены в табл. 65 и 66.

Таблица 65. Правильность методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в траве чабреца

Уровень содержания, %	Навеска рутина, мг	Оптическая плотность	Определенное содержание рутина, %	Заданное значение, %	Отклик, %
80	2,2	2,65	1,60	1,58	99,5
80	2,0	2,60	1,57	1,56	99,4
80	2,1	2,57	1,55	1,57	101,3
100	5,9	3,25	1,96	1,95	99,5
100	5,7	3,21	1,94	1,93	99,5
100	6,1	3,25	1,96	1,97	100,5
120	9,9	3,88	2,34	2,35	100,4
120	9,8	3,85	2,33	2,34	100,4
120	10	3,91	2,36	2,36	100,0

Таблица 66. Статистические характеристики методики спектрофотометрического определения содержания флавоноидов в траве чабреца

Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение	99,98
Стандартное отклонение	0,75
Коэффициент вариации	0,63
Нижняя граница доверительного интервала ($p=95\%$)	98,8
Верхняя граница доверительного интервала ($p=95\%$)	100,5

4.Прецизионность

Повторяемость аналитической методики была показана на 6 пробах. Полученные данные представлены в табл. 67, метрологические характеристики – в табл. 68.

Таблица 67. Повторяемость спектрофотометрического определения содержания флавоноидов в траве чабреца

Масса навески, г	1,0115	1,0362	0,9983	1,0022	1,0079	1,0367	1,0009	1,0507	1,0083
Содержание флавоноидов,%	1,36	1,40	1,34	1,33	1,36	1,39	1,36	1,41	1,38

Таблица 68. Метрологические характеристики проверки повторяемости ($n=6$, $P=0,95$)

X_{cp}	S	$\pm\Delta x$	$\varepsilon \%$	RSD*
1,370	0,027	0,002	0,15	0,68

* RSD –коэффициент вариабельности.

Относительная погрешность получаемых результатов $\varepsilon=0,15\%$, то есть меньше 2,5%, следовательно, критерий приемлемости соблюден.

Определение флавоноидов в настое и жидком экстракте травы чабреца

При разработке методики определения флавоноидов в настой травы чабреца руководствовались закономерностями, выявленными при разработке методики для анализа сырья. Также принимали во внимание основные правила спектрофотометрии, а именно, величина оптической плотности должна быть больше 0,2, но меньше 1,5; отсутствие осадка и опалесценции в анализируемом растворе. В результате была предложена следующая методика:

Методика: 10 мл настоя помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 1 мл 5% раствора алюминия хлорида, периготовленного на 70% спирте этиловом и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 20 мин. Фильтруют около

10 мл раствора через бумажный фильтр в колбу объемом 50 мл. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 ± 2 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл извлечения и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доведенных 70% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание флавоноидов (X) в миллиграммах в 1 мл настоя в пересчете на рутин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1000}{A_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 10},$$

где: m_0 – масса стандартного образца рутина, г; A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настое травы чабреца составило $1,80 \pm 0,04$ мг/мл.

Из травы чабреца на фармацевтических предприятиях получают жидкий экстракт, который используется при производстве препарата «Пертуссин» (кроме жидкого экстракта чабреца в него входят калия бромид, сахарный сироп и 80% спирт этиловый). Исходя из концепции «сквозной» стандартизации и используя данные, полученные при разработке методики определения суммы флавоноидов в траве чабреца, была предложена спектрофотометрическая методика для стандартизации жидкого экстракта чабреца.

Методика: 5 мл жидкого экстракта травы чабреца помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 1 мл 5% раствора алюминия хлорида, приготовленного на 70% спирте этиловом и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 20 мин. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 412 ± 2 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл

экстракта и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доведенных 70% спиртом этиловым до метки в мерной колбе объемом 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) в миллиграммах в 1 мл экстракта рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1000}{A_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 5},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A₀– оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом; m₀ – масса стандартного образца рутина, г.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в жидком экстракте чабреца составило 11,21±0,05 мг/мл (при n=5, p=0,95).

4.1.5. Определение суммы флавоноидов в траве зверобоя и препаратах

Сумму флавоноидов в траве зверобоя согласно ГФ XI, вып. 2, статья 52 определяют спектрофотометрически при длине волны 415 нм после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом.

Методика хорошо воспроизводится, заявленная в НД длина волны максимума поглощения правомерна (рис. 58). Анализ был проведен на 6 сериях различных фирм- производителей. Длины волн и количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (%) представлены в табл. 70.

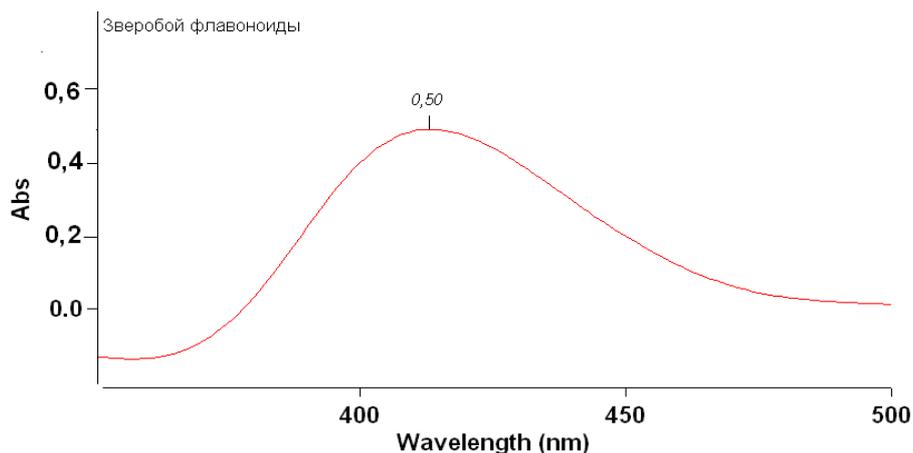


Рис.58. Спектр поглощения комплекса флавоноидов спиртового извлечения из травы зверобоя с алюминия хлоридом.

Таблица 69. Количественное содержание суммы флавоноидов в траве зверобоя ($n=5, p=0,95$)

Производитель	Длина волны, соответствующая максимальной абсорбции, нм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
ЗАО «Здоровье», серия 1	414	1,56
ЗАО «Здоровье», серия 2	415	1,58
ООО «Красногорсклексредства», серия 1	415	1,52
ООО «Красногорсклексредства», серия 2	413	1,54
ЗАО «Иван-чай»	416	1,51

Как видно из данных табл. 69, все длины волн соответствующие максимуму поглощения укладываются в интервал 415 ± 2 нм.

Определение содержания суммы флавоноидов в настое травы зверобоя

Настой травы зверобоя получали в соответствии с инструкцией по применению, указанной на пачке. Навеску сырья массой около 10 г (точная навеска) помещали в колбу, добавляли 200 мл воды комнатной температуры, кипятили на водяной бане 15 минут. Затем настой охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через бумажный фильтр, доводили объем настоя водой до 200 мл в мерной колбе.

При разработке методики определения суммы флавоноидов в настое травы зверобоя изучали влияние времени и количества добавленного раствора алюминия хлорида. При этом добивались отсутствия опалесценции анализируемого раствора и значения абсорбции в интервале 0,2-1 при аналитической длине волны.

Оптимальным соотношением количества настоя и раствора алюминия хлорида (2%) оказалось 1:2. Максимальное значение оптической плотности достигалось через 15 минут после начала реакции. Таким образом, была предложена следующая методика:

Аликвоту настоя, равную 1 мл, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида, 2 капли уксусной кислоты 30%, доводили объем раствора до метки 70% спиртом. Раствор сравнения готовили путем добавления в мерную колбу вместимостью 25 мл: 1 мл настоя, 2 капель кислоты уксусной 30% и доводили 70% спиртом до метки. Спустя 15 минут измеряли оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов в настое травы зверобоя с алюминия хлоридом. Его максимум поглощения соответствует 421 ± 2 нм (рис.59), что дает возможность проводить пересчет суммы флавоноидов на кверцетин.

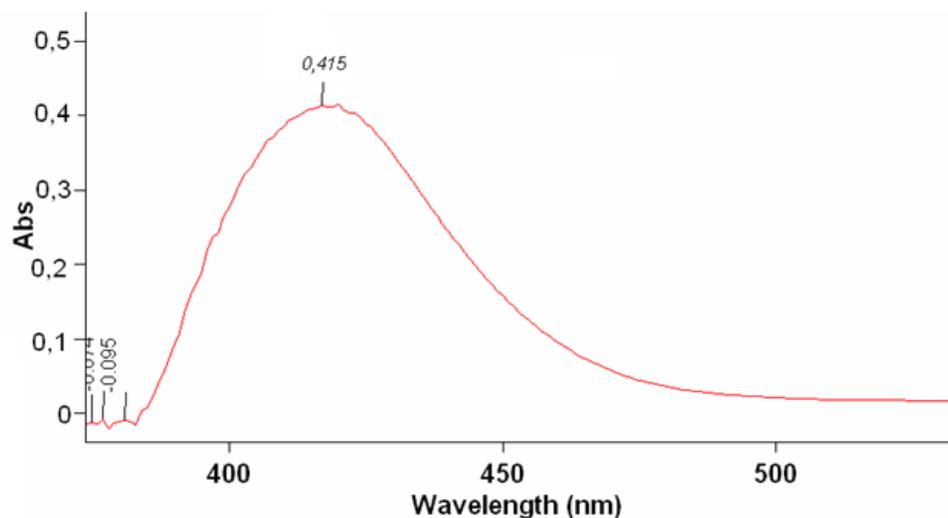


Рис. 59. Спектр поглощения комплекса флавоноидов настоя из травы зверобоя с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в настое травы зверобоя в пересчете на кверцетин (мг/мл) проводили по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000}{A_0 \cdot 25 \cdot 100},$$

где: m_n – масса настоя, определенная пикнометрически, г; 25 – объём мерной колбы, мл; m_0 – масса навески СО кверцетина, г; A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в настое травы зверобоя в пересчете на кверцетин составило $0,158 \pm 0,002$ мг/мл ($n=5$, $p=0,95$). Максимум поглощения обнаружен при длине волны 421 ± 2 нм.

Определение содержания суммы флавоноидов в настойке травы зверобоя

Настойка зверобоя применялась как средство для лечения колита, гиперацидных состояний, гингивита и стоматита. В настоящее время в аптечном ассортименте она отсутствует, но входит в состав ряда комплексных препаратов.

Настойку траву зверобоя готовили согласно составу, указанному в инструкции по применению препарата: на 40% спирте в соотношении сырья и экстрагента 1:5. (Реестр ЛС: pda.rlsnet.ru) . Экстракцию проводили мацерацией в течение 7 суток.

При разработке методики анализа суммы флавоноидов в настойке травы зверобоя оптимизировали те же параметры, что и в случае с настоем.

Методика. Аликвоту настойки, равную 0,5 мл, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида, 1 мл уксусной кислоты разведенной, доводят объём раствора до метки 70% этиловым спиртом. Раствор сравнения получают, добавляя в мерную колбу 0,5 мл настойки, 1 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки 70% спиртом. Спустя 20 минут измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов в настое травы зверобоя с алюминия хлоридом на спектрофотометре. Максимум поглощения комплекса приходится на длину волны 426 ± 2 нм (рис.60).

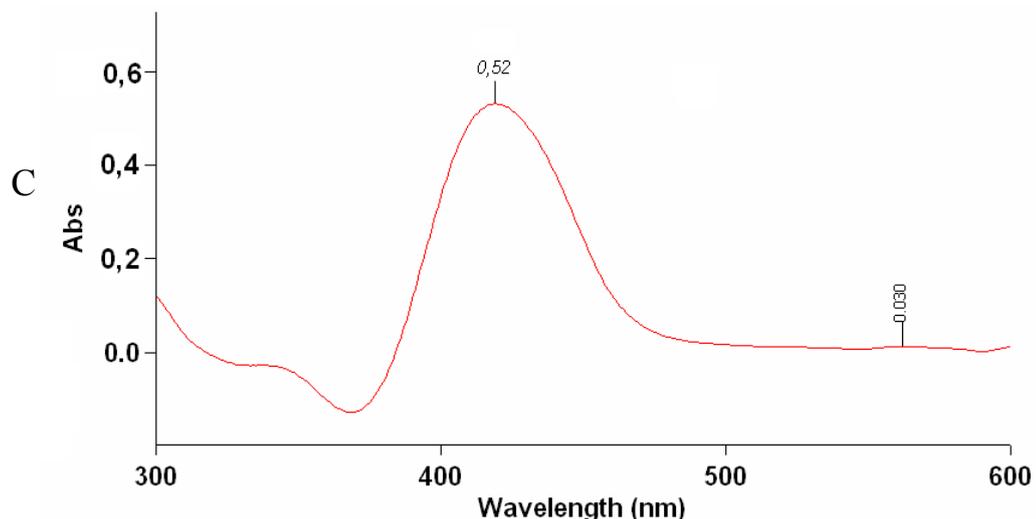


Рис. 60. Спектр поглощения комплекса флавоноидов настойки травы зверобоя с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в мг/мл в настойке травы зверобоя рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000}{A_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 0,5'}$$

где 25 – объём мерной колбы, мл; 0,5 – объём аликвоты, мл; m_0 – масса навески СО кверцетина, г; m_n – масса настойки, г; A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в настойке зверобоя в пересчёте на рутин составило $0,378 \pm 0,004$ мг/мл ($n=5$, $p=0,95$). Максимум поглощения приходится на длину волны 426 ± 2 нм.

Определение содержания суммы флавоноидов в препарате «Доппельгерц Нервотоник»

В состав препарата «Доппельгерц Нервотоник» (элекси́р) входит жидкий экстракт травы зверобоя и вспомогательные вещества:

	100 мл
Зверобоя травы экстракт жидкий	2,084 г
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
концентрат вишневого ликёра	0,573 г
вино ликёрное	101,543 г

Данный препарат вызывает интерес в связи с тем, что помимо экстракта зверобоя содержит вспомогательные вещества, богатые антоцианами, флавоноидами и др. БАС. Поэтому актуальным стало изучение возможности использования дифференциальной спектрофотометрии в анализе препарата с разнообразным составом природных соединений.

При подборе оптимальных условий анализа флавоноидов препарата была разработана следующая методика: 1 мл препарата помещают в колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл разведенной кислоты уксусной, 1 мл 2% раствора алюминия хлорида, доводят объём раствора до метки 95% спиртом. Раствор сравнения готовят следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 1 мл препарата, 1 мл разведенной кислоты уксусной и доводят 95% спиртом метки. Спустя 40 минут измеряют

оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом на спектрофотометре при длине волны 428 ± 2 нм.

Полученный абсорбционный спектр представлен на рис.61.

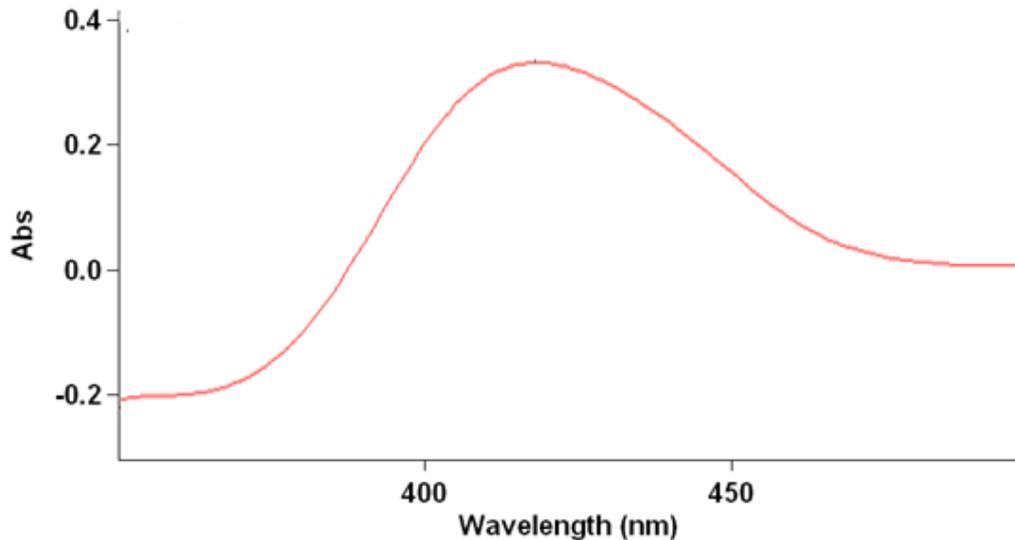


Рис.61. Спектр поглощения комплекса флавоноидов препарата «Доппельгерц Нервотоник» с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в мг/мл в пересчете на кверцетин в препарате «Доппельгерц Нервотоник» рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 0,5}$$

где: 25 – объём мерной колбы, мл; 10 – объём аликвоты, мл; 20 – разведение; m_0 – масса навески СО кверцетина, г; A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в препарате «Доппельгерц Нервотоник» составило $0,124 \pm 0,002$ мг/мл ($n=5$, $p=0,95$) при аналитической длине волны 428 ± 2 нм.

Различие в длинах волн, соответствующих максимальным абсорбциям комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом, в настойке и препарате «Доппельгерц Нервотоник», в состав которого входит жидкий экстракт травы

зверобоя, обусловлено, по-видимому, присутствием в препарате концентрата вишневого ликёра и ликёрного вина, привносящих другие флавоноиды.

4.1.6. Определение суммы флавоноидов в цветках ромашки аптечной

Цветки ромашки аптечной используются в виде настоя, входят в состав лекарственных сборов, комплексных жидких экстрактов. Помимо эфирного масла, противовоспалительные, антиаллергенные и противомикробные свойства также присущи флавоноидам, присутствующим в сырье и его лекарственных формах. В связи с этим рационально изучить возможность стандартизации сырья и по флавоноидам, представляющим вторую по значимости группу БАС.

При разработке методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в цветках ромашки анализировали такие параметры, как концентрация экстрагента – спирта этилового, время экстракции, соотношение количеств сырья и экстрагента, кинетику образования комплекса с алюминия хлоридом и соотношение участников реакции комплексообразования (количество экстракта и раствора алюминия хлорида).

Результаты подбора оптимальных условий методики представлены в табл. 70, 71, 72.

Таблица 70. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из цветков ромашки аптечной ($n=5, p=0,95$)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье: экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин
Экстрагент			
30	1:20	20	0,97±0,01
40			1,12±0,02
50			1,18±0,01
60			1,22±0,03
70			1,29±0,02
80			1,29±0,03
Соотношение сырье : экстрагент			
70	1:30	20	1,32±0,02
	1:40		1,54±0,01
	1:50		1,67±0,03
	1:60		1,76±0,04
Время экстрагирования			
50	1:40	20	1,69±0,01
		30	1,76±0,03
		40	1,77±0,02
		50	1,75±0,04

Таблица 71. Влияние соотношения объема извлечения и раствора алюминия хлорида на полноту образования комплекса флавоноидов с $AlCl_3$ ($n=5, p=0,95$)

Объем 2% раствора алюминия хлорида	0,5 мл	1 мл	2 мл	3 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,54±0,02	1,67±0,03	1,79±0,04	1,78±0,04

Таблица 72. Влияние фактора времени на полноту образования комплекса флавоноидов с $AlCl_3$ ($n=5, p=0,95$)

Время, мин	5	10	15	20	30	50
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,32±0,04	1,56±0,02	1,69±0,03	1,76±0,01	1,77±0,01	1,74±0,01

Анализ данных, представленных в таблицах 70,71,72 позволил предложить следующую методику для анализа флавоноидов в цветках ромашки аптечной:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Точную навеску сырья массой около 1 г помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта этилового. Колбу соединяют с обратным холодильником и проводят экстракцию на плитке с закрытой спиралью, поддерживая слабое кипение в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Складывают марлевый фильтр в 4-6 слоев. Горячее извлечение отфильтровывают через фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. Сырье отжимают. После охлаждения объем извлечения доводят 70% спиртом до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, 5 мл 5% раствора алюминия хлорида, приготовленного на 95% спирте этиловом и 0,5 мл разведенной кислоты уксусной и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Приготовление раствора сравнения: в мерную колбу объемом 25 мл вносят 2 мл извлечения, 0,5 мл разведенной кислоты уксусной и доводят 95% спиртом до метки. Через 20 мин снимают спектр поглощения комплекса флавоноидов цветков ромашки с алюминия хлоридом при длине волны 409 ± 2 нм.

Максимум поглощения соответствует 408 ± 2 нм при анализе сырья фирм-производителей «Здоровье» и «Красногорсклексредства». Цветки ромашки производства «Иван-чай» отличаются по флавоноидному составу; максимум поглощения комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом приходится на длину волны 402 ± 2 нм, что может являться следствием различных мест заготовки сырья.

Типичный спектр поглощения флавоноидов цветков ромашки аптечной с алюминия хлоридом представлен на рис.62.

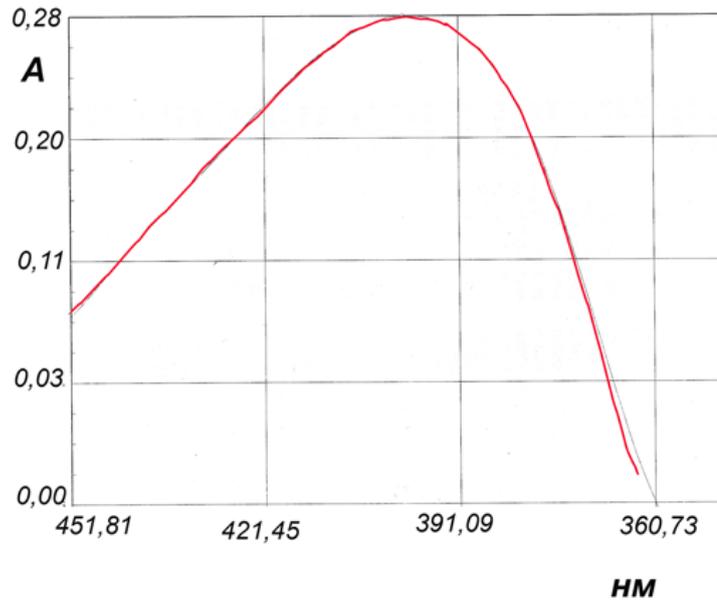


Рис. 62. Спектр поглощения комплекса флавоноидов цветков ромашки с алюминия хлоридом.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100(100 - W)}$$

Где m_0 – масса рутина, г; A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора рутина; m – масса сырья, г; W – влажность – потеря в массе сырья при высушивании сырья, %.

Таблица 73. Результаты анализа цветков ромашки различных серий и производителей по содержанию флавоноидов ($n=5, p=0,95$)

Производитель	№ серии (шифр)	Длина волны, соответствующая максимальному поглощению	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, рассчитанное при 409 нм
«Иван-чай»	1	403	1,71±0,03
	2	402	1,66±0,02
	3	402	1,69±0,03
ООО «Красногорсклексредства»	1	406	1,76±0,02
	2	408	1,73±0,01
	3	409	1,70±0,04
ЗАО «Здоровье»	1	408	1,76±0,02
	2	409	1,77±0,02
	3	409	1,84±0,03

Таблица 74. Статистические характеристики методики определения суммы флавоноидов в цветках ромашки аптечной ($n=5, p=0,95$)

Среднее арифметическое $X_{ср}$	Стандартное отклонение S	Доверительная вероятность P	Дисперсия, S^2	Доверительный интервал Δx	Относительная погрешность $\varepsilon \%$
1,76	0,02	95	0,00043	0,00058	1,2

4.1.7. Определение суммы флавоноидов в листьях крапивы и препаратах

Согласно данным литературы листья крапивы двудомной содержат флавоноиды: рутин, цинарозид, гиперозид, лютеолин, кверцетин, кемпферол-3-глюкозид, а цветки: 3-О-глюкозид кемпферола, 3-О-глюкозид изорамнетин, 3-О-рутинозид изорамнетина, изокверцитрин, 3-О-неогеперозид изорамнетина, 3-О-рутинозид кемпферола, рутин [23,61,62,63].

В связи с тем, что флавоноиды повышают усваиваемость кальция, обуславливающего кровоостанавливающее действие препаратов крапивы [34], актуальной проблемой является разработка методик количественного анализа флавоноидов в сырье и препаратах крапивы.

При разработке методики определения суммы флавоноидов в листьях крапивы подбирали оптимальные условия, такие как соотношение сырья и экстрагента, концентрация экстрагента (спирта этилового), время экстракции; учитывали кинетику образования комплекса с алюминия хлоридом и соотношение участников реакции комплексообразования (количество экстракта и раствора алюминия хлорида). При попытке получить комплекс с алюминия хлоридом происходило выпадение осадка и проведение фотометрического анализа было невозможно. Добавление большего количества кислоты для подавления гидролиза, изменение соотношения воды и спирта в реакционной смеси и замена спиртового раствора алюминия хлорида на сухое вещество, результата не дали. Причиной выпадения осадка и нестойкости комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом служила буферная емкость соединений, входящих в состав листьев крапивы. Начальное значение рН водного извлечения крапивы составляет $7,12 \pm 0,06$ [66,70]. В слабощелочной среде происходил гидролиз алюминия хлорида и диссоциация самих флавоноидов. Решением данной проблемы стало добавление в реакционную среду ацетатного буфера.

Результаты разработки методики представлены в табл. 75, 76, 77.

Таблица 75. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из листьев крапивы двудомной ($n=5, p=0,95$)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстрагент			
40	1:20	20	0,82 ± 0,02
50			0,87 ± 0,01
60			0,92 ± 0,03
70			1,02 ± 0,01
80			1,03 ± 0,02
Соотношение сырье : экстрагент			
70	1:30	20	0,93 ± 0,02
	1:40		1,04 ± 0,01
	1:50		1,06 ± 0,03
	1:60		1,12 ± 0,04
Время экстрагирования			
50	1:50	20	1,08 ± 0,01
		30	1,12 ± 0,03
		40	1,11 ± 0,02
		50	1,09 ± 0,04

Таблица 76. Влияние соотношения объема извлечения и раствора алюминия хлорида на полноту образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом ($n=5, p=0,95$)

Объем 2% раствора алюминия хлорида (объем извлечения 2 мл)	0,5 мл	1 мл	2 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,03±0,02	1,11±0,03	1,12±0,04

Таблица 77. Влияние времени на полноту образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом ($n=5, p=0,95$)

Время, мин	5	10	15	20	30	50
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,62±0,04	0,95±0,02	1,01±0,03	1,05±0,01	1,09±0,01	1,07±0,01

Учитывая, что максимум поглощения приходится на длину волны 372 ± 2 нм (рис.63), проводить пересчет суммы флавоноидов листьев крапивы, рекомендовано на более близкий по положению максимума поглощения флавоноид, присутствующий в сырье - лютеолин. Анализ данных, представленных в табл. 75, 76, 77 позволил предложить следующую методику для анализа суммы флавоноидов в листьях крапивы двудомной.

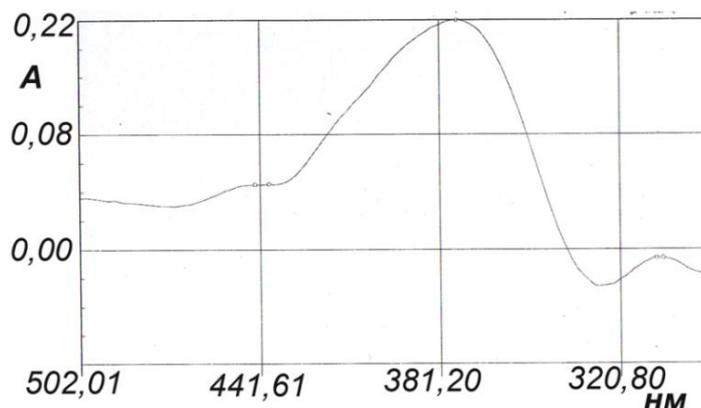


Рис.63. Спектр поглощения комплекса флавоноидов листьев крапивы с алюминия хлоридом.

Методика. Около 2 г (точная навеска) листьев крапивы, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм,

помещают в колбу со шлифом объемом 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта этилового. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, извлечение фильтруют через ватный тампон в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение доводят 70% спиртом этиловым до метки, фильтруют в плоскодонную колбу через бумажный складчатый фильтр (раствор А), первые 5 мл фильтрата отбрасывают.

В мерную колбу объемом 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 1 мл 8% спиртового раствора натрия ацетата, 1 мл 30% кислоты уксусной, доводят объем до метки 70% спиртом этиловым и перемешивают (испытуемый раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 372 ± 2 нм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл 30% кислоты уксусной, 2 мл раствора А, 1 мл 8% спиртового раствора натрия ацетата, доведенных до метки 70% спиртом этиловым в мерной колбе объемом 25 мл. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора комплекса ГСО лютеолина с алюминия хлоридом.

Приготовление раствора комплекса лютеолина с алюминия хлоридом.
Точную навеску ГСО лютеолина (около 0,01 г), предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 60°C , растворяют в мерной колбе объемом 100 мл в 60 мл 70% спирта этилового (раствор А). Аликвоту раствора А, равную 5 мл, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 0,5 мл разбавленной кислоты уксусной, 5 мл 2% раствора алюминия хлорида, перемешивают. Через 30 мин снимают спектр поглощения на фоне раствора сравнения, состоящего из 5 мл раствора А, 0,5 мл разбавленной кислоты уксусной, доведенных в мерной колбе вместимостью 50 мл 70 % спиртом этиловым до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 5 \cdot 100 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; W – потеря в массе сырья при высушивании, %; m — масса сырья, г; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО лютеолина; m_0 – масса ГСО лютеолина, г;

Результаты определения содержания суммы флавоноидов в листьях крапивы двудомной приведены в табл. 78.

Таблица 78. Содержание суммы флавоноидов в листьях ($n=5, p=0,95$)

Сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин, %	Дисперсия S^2	Среднее квадратическое отклонение S	Доверительный интервал $\pm\Delta X$	Относительная ошибка, %
1,10	0,00038	0,02	0,00054	1,8

Определение суммы флавоноидов в настое и жидком экстракте листьев крапивы двудомной

Настой листьев крапивы двудомной готовили согласно методике ОФС ГФ XI «Настои и отвары» [19]. Объем настоя составил 100 мл.

Жидкий экстракт листьев крапивы (1:1), полученный методом дробной мацерации, отвечал требованиям нормативной документации.

Подбор оптимальных условий анализа суммы флавоноидов в настое и жидком экстракте крапивы позволил разработать методику определения. Анализ длин волн, соответствующих максимумам поглощения настоя и жидкого экстракта (табл. 79) позволяют использовать в первом случае в качестве референсного стандарта лютеолин, а во втором – рутин. Спектр поглощения суммы флавоноидов настоя листьев крапивы с алюминия хлоридом представлен на рис.64.

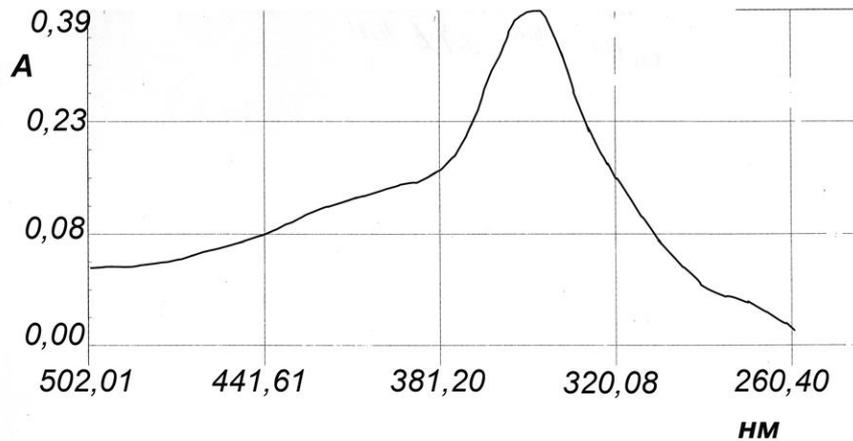


Рис. 64. Спектр поглощения комплекса флавоноидов настоя листьев крапивы с алюминия хлоридом.

Методика.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл настоя или 2 мл жидкого экстракта, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 1 мл 8% спиртового раствора натрия ацетата, 1 мл 30% раствора кислоты уксусной, доводят объем до метки 70% спиртом этиловым и перемешивают (испытуемый раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл настоя или 2 мл жидкого экстракта, доведенного до метки 70% спиртом этиловым в мерной колбе объемом 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в настое в мг/мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 1000}{A_0 \cdot m \cdot 5 \cdot 100 \cdot V \cdot 25}$$

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в жидком экстракте в мг/мл (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1000}{A_0 \cdot m \cdot V \cdot 25}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса настоя (или жидкого экстракта),

определенная пикнометрически, г; m_{σ} – масса ГСО рутина, г; V – объем настоя или жидкого экстракта, взятого для анализа, мл.

Результаты определения содержания флавоноидов и длины волн, соответствующие максимумам поглощения, в настое и жидком экстракте листьев крапивы двудомной приведены в табл. 79.

Таблица 79. Содержание суммы флавоноидов в лекарственных формах листьев крапивы ($n=5$, $p=0,95$)

Лекарственная форма, $\lambda_{\text{макс}}$.	Количественное содержание, мг/мл	S^2	S	$\pm\Delta X$	ϵ , %
Настой, 354 нм	0,049	0,0000038	0,002	5,46665E-05	3,9
Жидкий экстракт 1:1, 414 нм	0,000175	9,72E-08	0,000312	6,18E-06	0,354460

Таким образом, установлено, что при определении содержания суммы флавоноидов в сырье и лекарственных формах крапивы двудомной необходимо учитывать особенности, связанные со слабощелочным значением pH извлечений и буферной емкостью соединений, входящих в химический состав крапивы [61,63]. Для получения устойчивого комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом необходимо добавлять ацетатный буфер для поддержания кислой реакции среды [63].

4.1.8. Определение суммы флавоноидов в цветках ноготков и препаратах

Флавоноиды являются второй группой БАС, обеспечивающих противовоспалительное действие препаратов ноготков [6], что позволяет рассматривать возможность стандартизации сырья по содержанию этой группы БАС. Согласно литературных данных цветки ноготков содержат кверцетин, рутин, кемпферол-3-глюкозид, 3-О-глюкозид изорамнетин, 3-О-рутинозид изорамнетина [56].

Подбор оптимальных условий при разработке методики определения суммы флавоноидов в цветках ноготков проводили по аналогичной схеме

(оптимизировали соотношение сырья и экстрагента, концентрацию экстрагента – спирта этилового, время экстракции, исследовали кинетику образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом, соотношение участников реакции комплексообразования – количество экстракта и раствора алюминия хлорида).

Анализ спектра поглощения комплекса флавоноидов ноготков с алюминия хлоридом показал, что длина волны, соответствующая максимуму поглощения, приходится на 412 ± 2 нм, что позволяет использовать в качестве стандарта рутин (рис. 65). Результаты представлены в табл. 80 –83.

Таблица 80. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из цветков ноготков ($n=5, p=0,95$)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин
Экстрагент			
40	1:50	20	0,88±0,02
50			0,97±0,01
60			1,12±0,03
70			1,18±0,01
80			1,18±0,02
Соотношение сырье : экстрагент			
70	1:20	20	0,85±0,01
	1:30		0,94±0,02
	1:40		1,25±0,01
	1:50		1,31±0,03
	1:60		1,32±0,04
Время экстрагирования			
50	1:50	20	0,89±0,01
		30	1,10±0,03
		40	1,11 ±0,02
		50	1,31±0,04
		60	1,45±0,03

Так как эффективность экстракции флавоноидов ноготков в течение 1 часа постоянно повышалась, а проводить извлечение дольше при серийном анализе нерационально, была проведена многократная экстракция 1 г сырья порциями спирта по 50 мл (табл. 80). Как показали экспериментальные данные, трехкратная экстракция не дает существенного увеличения

экстрагируемых флавоноидов, поэтому более рационально использовать двукратную экстракцию.

Таблица 81. Влияние кратности экстракции на эффективность извлечения флавоноидов цветков ноготков ($n=5, p=0,95$)

Кратность экстракции	1	2	3
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,45±0,03	1,51±0,02	1,54±0,03

Таблица 82. Влияние соотношение объема извлечения и раствора алюминия хлорида на полноту образования комплекса ($n=5, p=0,95$)

Объем 2% раствора алюминия хлорида (объем извлечения 1 мл)	0,5 мл	1 мл	2 мл	3 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,37±0,02	1,44±0,03	1,53±0,04	1,54±0,03

Таблица 83. Влияние времени на полноту образования комплекса ($n=5, p=0,95$)

Время, мин	15	20	30	50
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,32±0,03	1,46±0,01	1,54±0,03	1,53±0,01

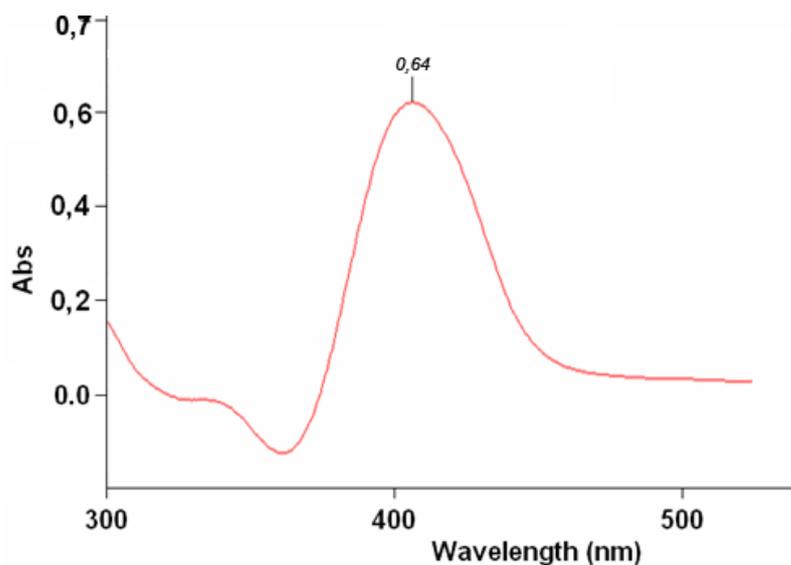


Рис. 65. Спектр поглощения комплекса флавоноидов цветков ноготков с алюминия хлоридом.

Анализ полученных данных позволил предложить методику для определения в цветках ноготков суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

Методика. 1 г цветков ноготков, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм (точная навеска), помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта этилового и нагревают, соединив с обратным холодильником на плитке с закрытой спиралью, поддерживая слабое кипение в течение 30 мин. Затем экстракт сливают через ватно-марличный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр. Сырье заливают новой порцией 70% спирта этилового, равной 50 мл, и экстрагируют при тех же условиях еще 30 мин. Извлечение фильтруют в ту же мерную колбу через ватно-марлевый фильтр, фильтр отжимают. Объем извлечения в мерной колбе доводят до 100 мл 70% спиртом этиловым и тщательно перемешивают (раствор А).

1 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доводят спиртом до метки и перемешивают. Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов цветков календулы с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 412 ± 2 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1 мл извлечения, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят 70% спиртом этиловым до метки.

Содержание в цветках календулы суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (X) в % рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - W)}$$

Где A —оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 —оптическая плотность раствора ГСО рутин; m — масса сырья, г; m_0 — масса ГСО рутин, г; W — влажность сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 84.

Таблица 84. Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в цветках календулы ($n=5, p=0,95$)

X_{cp}	S	S^2	$\pm\Delta x$	$\varepsilon \%$
1,53	0,038	0,0054	0,001	2,5

Определение суммы флавоноидов в настойке цветков календулы

Предварительно были получены обзорные спектры поглощения настойки календулы и настойки с алюминия хлоридом (рис.66). Появление на спектре Б выраженного максимума поглощения при 270–273 нм позволяет предположить значительное содержание флавоноидов в настойке [22,39].

В ходе исследования были подобраны оптимальные условия для определения в настойке календулы суммы флавоноидов в пересчете на рутин (соотношение объема аликвоты настойки и раствора алюминия хлорида; время реакции комплексообразования), которые легли в основу методики.

Длина волны, соответствующая максимуму поглощения комплекса флавоноидов настойки календулы с алюминия хлоридом позволяет проводить пересчет содержания суммы флавоноидов на рутин (рис.67).

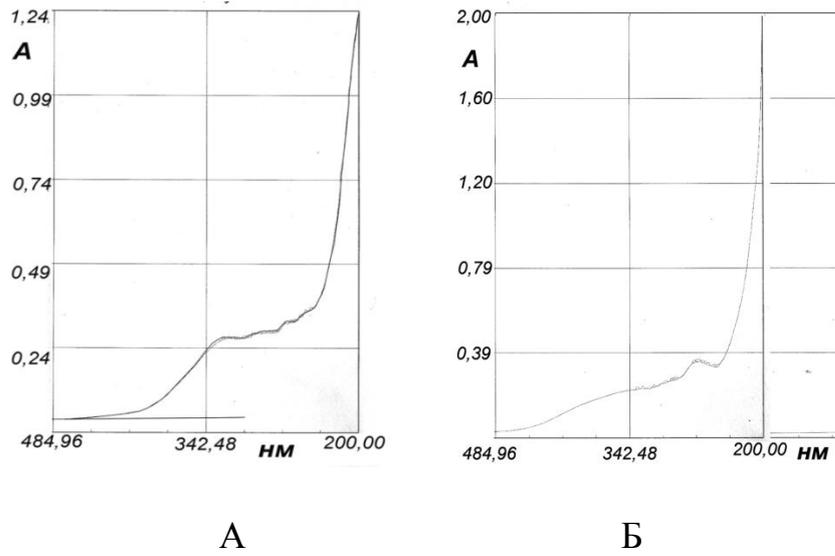


Рис.66. Спектры поглощения настойки цветков календулы. А – спектр поглощения настойки календулы; Б – спектр поглощения настойки с добавлением раствора алюминия хлорида.

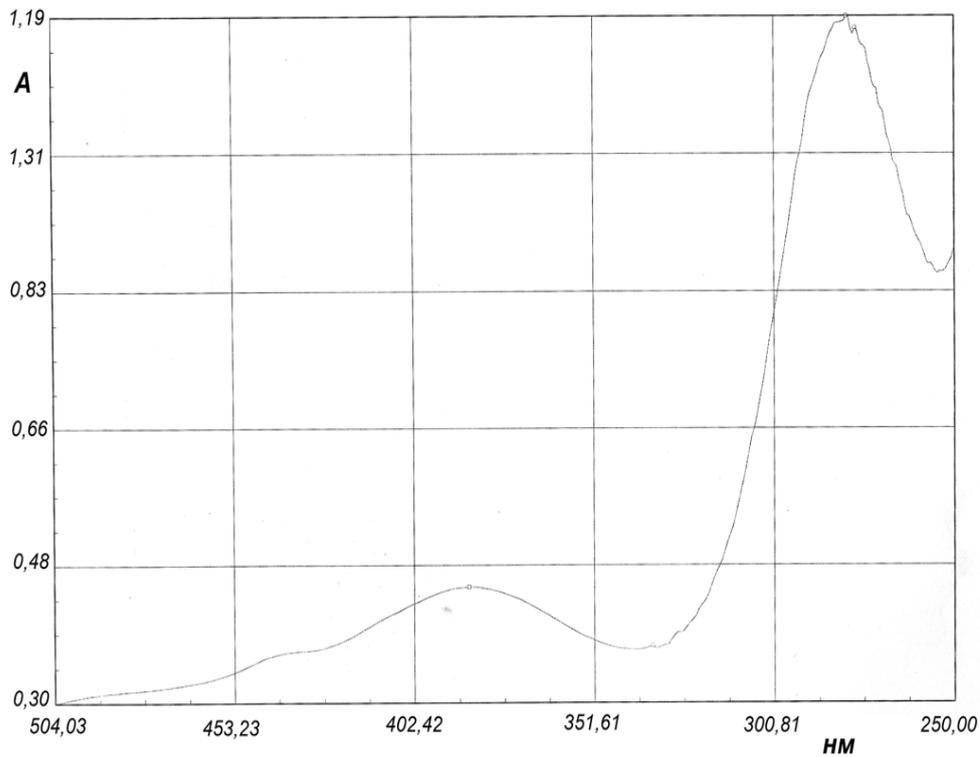


Рис.67. Спектр поглощения комплекса флавоноидов настойки цветков календулы с алюминия хлоридом.

Методика. 0,5 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доводят объем раствора 70% спиртом этиловым до метки, перемешивают. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 408 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 0,5 мл настойки, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят 70% спиртом этиловым до метки.

Содержание в настойке календулы суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) в мг/мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000 \cdot 1}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 0,5},$$

Где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m_0 – масса ГСО рутин, г.

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 85.

Таблица 85. Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в настойке цветков календулы ($n=5$, $p=0,95$)

$X_{\text{ср}}$	S	S^2	$\pm\Delta x$	$\varepsilon \%$
0,20	0,007	0,00005	0,0002	3,5

4.2. Спектрофотометрия в анализе антраценпроизводных

Почти все фотометрические методы анализа производных антрацена основаны на реакции Борнтрегера. Принцип ее заключается в том, что при растворении окисленных форм антраценпроизводных в щелочах образуются соединения красного цвета, а восстановленных форм – желтого. Реакция является положительной для 1,8-диоксиантрохинонов. Антроны, антранолы, оксантроны, диантронил и их гликозиды не дают красной окраски, но образуют ее после гидролиза и окисления. Поэтому в ходе определения

полнота прохождения гидролиза является существенным фактором, влияющим на точность анализа [40]. При этом следует учесть легкость гидролиза в водных растворах гликозидов, особенно биозида глюкофрангулина, а последнего – до франгулаэмолина, что сказывается на воспроизводимости результатов.

Некоторые виды лекарственного растительного сырья (листья алоэ и сенны) содержат С-гликозиды, в которых углеводный фрагмент соединяется с агликоном при помощи С–С связи. Из этих соединений сахарные компоненты количественно не отщепляются ни в кислотах, ни в щелочах. Так как проведение реакции Борнтрегера предполагает полное расщепление эмодинантрона до агликонов и последующее окисление до алоэ-эмолина, то применяются другие активные окислители, например, железа (III) хлорид. Таким образом, реакция Борнтрегера не дает исчерпывающих сведений ни о содержании суммы антрахинонов, ни о количественном содержании каждого из антрахинонов в отдельности. В табл. 86 приведены обобщающие сведения о методиках количественного анализе сырья, стандартизирующегося по содержанию антрахинонпроизводных.

Таблица 86. Количественный анализ некоторых видов сырья, содержащего антраценпроизводные (по ГФХІ).

Наименование сырья	Название показателя, по которому нормируется содержание действующих веществ	Условия проведения гидролиза О-гликозидов	Экстрагент	Окисление восстановленных форм	Реактив для получения окрашенных солей	Собственно количественный анализ	Стандарт	Опосредованный стандарт
Кора крушины	Производных антрацена в пересчете на истизин не менее 4,5%	кислота уксусная ледяная	эфир	кислород воздуха при нагревании	щелочно – аммиачный раствор	Фотоэлектроколориметрия (540 нм)	истизин	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$
Корневища и корни марены	Связанных производных антрацена не менее 3%	кислоты уксусная ледяная и HCl	эфир	пергидроль	натрия гидроксид+ щелочно – аммиачный раствор	Фотоэлектроколориметрия (530 нм)	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	_____
Листья сенны	Суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту не менее 1,35%	Нагревание, кислота серная	водой гликозиды, затем эфиром агликоны	железа (III) хлорид в присутствии натрия гидрокарбоната;	щелочно – аммиачный раствор	Спектрофотометрия (523 нм)	хризофановая кислота	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$
Корни ревеня	Производных антрацена в пересчете на истизин не менее 2%	кислота уксусная ледяная	эфир	кислород воздуха при нагревании	щелочно – аммиачный раствор	фотоэлектроколориметрия (530 нм)	истизин	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$

При количественном анализе всех представленных видов сырья, стандартом выступает истизин, не содержащийся в растении, либо хризофановая кислота. Во всех случаях используется калибровочный график, построенный по растворам неорганического соединения – $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, которое является опосредованным или реальным (корневища и корни марены) стандартом. Практически во всех методиках анализа используют фотоэлектроколориметрию, хотя спектрофотометрия – более точный метод, позволяющий установить более точное значение длины волны, чем обозначенное светофильтром [46,48]. Следует также отметить, что анализ антраценпроизводных очень длителен и трудоемок, что затрудняет его использование при серийном анализе. Все вышесказанное указывает на необходимость системного пересмотра и модификации методик определения антраценпроизводных в ЛРС.

4.2.1. Определение антраценпроизводных в коре крушины

Исследования проводились на промышленном образце коры крушины ломкой с использованием методики ГФ XI изд. (ст.2 «Кора крушины»).

Спектрофотометрический анализ растворов аквакомплекса $[Co(H_2O)_6]Cl_2$, образующегося при приготовлении растворов $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, показал, что максимум поглощения соответствует длине волны 510 ± 2 нм (рис. 68).

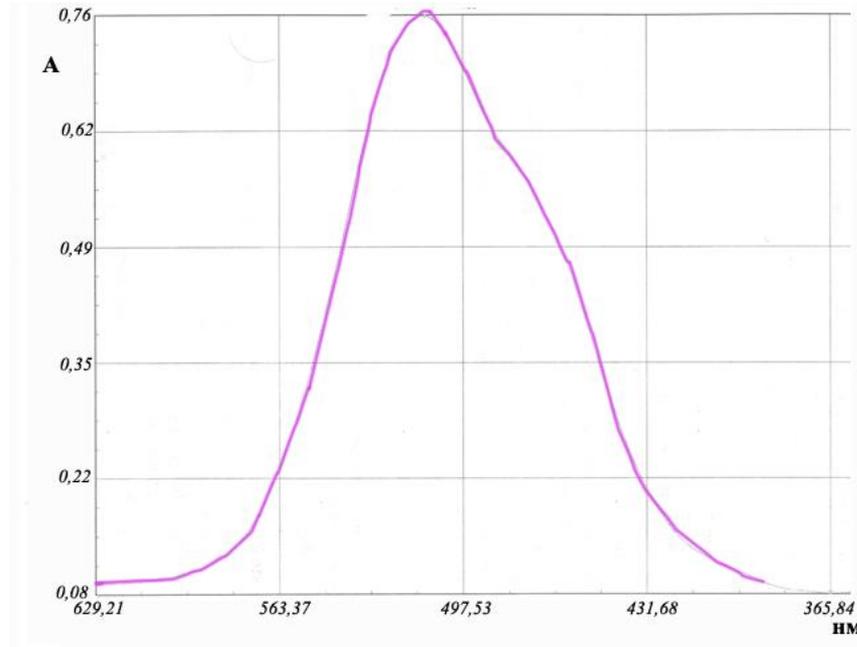


Рис.68. Абсорбционный спектр раствора $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}([\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_2)$ с концентрацией 0,02 М

Максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора антрахинонов коры крушины соответствует 526 ± 2 нм, что на 16 нм больше, чем у раствора кобальта хлорида (рис. 69). В связи с этим возникает закономерный вопрос о правомерности выбора данного опосредованного стандарта. Изучить спектральные характеристики истизина не удалось, т.к. это вещество в продаже не встречается.

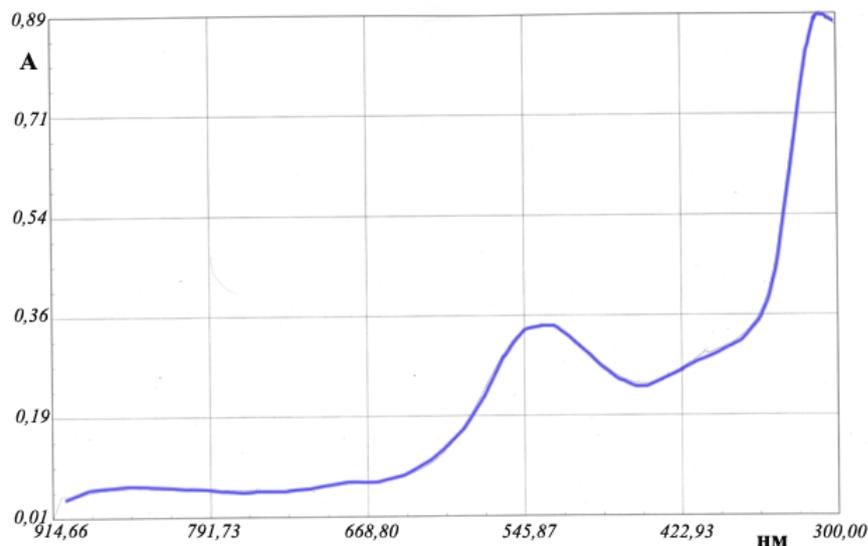


Рис.69. Абсорбционный спектр солевых форм антраценпроизводных коры крушины

Европейская фармакопея приводит сведения о спектральных характеристиках франгулина А и глюкофрангулина А (табл. 87).

Таблица 87. Спектральные характеристики франгулина А и глюкофрангулина А

Соединение	Длина волны, соответствующая максимальному поглощению	Удельный коэффициент поглощения
Франгулин А	524 нм	180
Глюкофрангулин А	515 нм	204

Длина волны франгулина А, соответствующая максимуму поглощения, позволяет использовать это соединение в качестве стандарта. Расчет содержания суммы антраценпроизводных в коре крушины в пересчете на франгулин А дает возможность судить о доброкачественности сырья - сумма антраценпроизводных составляет $8,4 \pm 0,4\%$ (при $n=5$, $p=0,95$).

4.2.2. Определение антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе

ЛРС, содержащее антраценпроизводные, широко используется в сборах (слабительных, противогеморроидальных и др.). Возможность использования спектрофотометрии при определении антраценпроизводных в сборе изучалась на примере противогеморроидального сбора, в состав которого входит 5 компонентов: сенны листья – 20%; крушины кора – 20%; тысячелистника трава – 20%; кориандра плоды – 20%; солодки корни – 20%.

По НД сенна стандартизуется по сумме агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту (не менее 1,35%), а крушина – по производным антрацена в пересчете на истизин (не менее 4,5%). Методы анализа листьев сенны и коры крушины по определению действующих веществ существенно различаются друг от друга на первых трех стадиях по типу экстрагента и по добавляемым реактивам (табл. 86).

Количественное определение содержания производных антрацена в сборе в пересчете на истизин, согласно НД предприятия одной из фирм-производителей, рекомендуется проводить по фармакопейной методике (ГФ XI изд., ст.2). То есть предполагается использовать методику анализа коры крушины, за тем лишь отличием, что масса навески сбора берется около 0,3 г. НД регламентирует содержание действующих веществ в сборе не менее 1,3%, измеряя оптическую плотность окрашенного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны около 540 нм.

Если предположить, что предлагаемым способом удастся уловить все антраценпроизводные, то минимальный вклад коры крушины составит $4,5 \cdot 0,2 = 0,9\%$, а листьев сенны – $1,35 \cdot 0,2 = 0,27\%$, в сумме - 1,17%, что меньше заявленной нормы. Однако, очевидно, что по предлагаемой методике, антраценпроизводные сенны вносить вклад практически не будут, о чем свидетельствуют данные анализа (табл.88).

Спектрофотометрический анализ окрашенных солей антраценпроизводных противогеморроидального сбора выявил наличие максимума поглощения при 516 ± 2 нм (рис. 70). Эта длина волны близка к максимуму поглощения глюкофрангулина А. Так как интервал между максимумом дифференциальной кривой и длинноволновой полосой стандартного образца не превышает полуширины полосы поглощения стандартного образца, длину волны 515 ± 2 нм можно использовать в качестве аналитической.

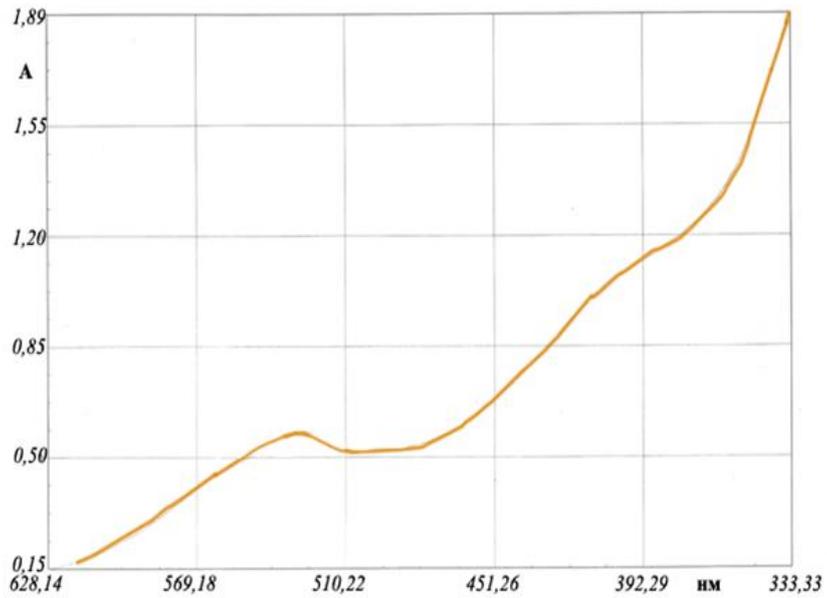


Рис.70. Абсорбционный спектр солей антраценпроизводных

Если провести расчет с использованием удельного показателя поглощения глюкофрангулина A , и вместо числового показателя «производных антрацена в пересчете на истизин не менее 1,3%» ввести «производных антрацена в пересчете на глюкофрангулин A не менее 1,3 %», то сырье можно считать доброкачественным (табл.88). Такая возможность оправдана еще и близким значением длины волны в максимуме поглощения глюкофрангулина A и солей антраценпроизводных противогеморриoidalного сбора.

Таблица 88. Содержание антраценпроизводных в противогеморроидальном сборе ($n=5, p=0,95$)

Методика анализа	Числовой показатель, нормирующий содержание действующих веществ	Расчетная формула	Содержание антраценпроизводных в пересчете на абсолютно сухое сырье, %
Методика ФСП	Производных антрацена в пересчете на истизин не менее 1,35%	$X = \frac{C \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}$ где С – содержание производных антрацена в пересчете на истизин в 1 мл колориметрируемого раствора, г; m- масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.	1,11±0,08
Модифицированная методика ФСП	Производных антрацена в пересчете на глюкофрангулин А не менее 1,35%	$X = \frac{A \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{\varepsilon_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot m \cdot (100 - W)}$ где А – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 515 нм; $\varepsilon_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения глюкофрангулина А при 515 нм; W – потеря в массе сырья при высушивании, %; m – масса сырья, г.	1,94±0,06

Таким образом, проведенные исследования показывают, что при анализе сборов ЛРС необходимо снимать спектр в диапазоне длин волн, а не ориентироваться на максимум поглощения одного из компонентов. Присутствие различного по составу растительного сырья может влиять на длину волны, а, следовательно, и на выбор стандарта, как отмечено в представленном случае.

4.3. Методологические аспекты разработки методики спектрофотометрического определения биологически активных соединений в лекарственном растительном сырье и препаратах

Анализ нормативной документации и научной литературы, а также собственные исследования позволили сформулировать ряд правил,

способствующих рациональной разработке спектрофотометрической методики с хорошей воспроизводимостью и точностью.

При выборе условий экстракции нужно руководствоваться, в первую очередь, физико-химическими свойствами анализируемых соединений, их растворимостью в воде и органических растворителях.

Если в сырье агликоны и гликозиды присутствуют в равных количествах, то для анализа общего содержания БАС рациональны химические модификации на этапе экстракции, например, проведение гидролиза. Это реализуется в методиках анализа флавоноидов, антоцианов, антраценпроизводных.

В случаях, когда трудно подобрать достаточно селективный экстрагент по отношению к аналиту, возможно осуществление очистки до этапа экстракции путем удаления мешающих соединений из сырья (фор-экстракция).

Эффективность экстракции БАС из ЛРС зависит от различных факторов, требующих оптимизации: соотношения сырья и экстрагента, времени и кратности экстракции, температуры, измельченности сырья и др. В процессе разработки методики, используемой для стандартизации ЛРС, следует учитывать, что она должна быть объективной и подходить для серийного анализа.

Экстрагент, используемый в разрабатываемой методике, должен отвечать следующим требованиям: быть химически индифферентным по отношению к извлекаемым соединениям, обладать хорошей растворимостью экстрагируемого вещества, быть экологически чистым и нетоксичным.

Если очистка от сопутствующих соединений проводится после экстрагирования суммы соединений, то можно выделить две принципиально различающиеся схемы: отделение мешающих и сопутствующих веществ (анализируемые соединения остаются в экстракте); выделение анализируемых соединений из извлечения. Первый вид очистки часто осуществляется несколькими путями:

➤ Использование колоночной хроматографии, в качестве адсорбента чаще всего используют алюминия оксид, силикагель, полиамид. Элюирование проводят растворителем, селективным для определяемой группы БАС. Далее работают с элюентом (мешающие соединения остаются на сорбенте колонки).

➤ Применение экстракции жидкость – жидкость (Ж/Ж), которая проводится с помощью несмешивающейся с экстрагентом жидкости. Добавляемая жидкость должна иметь сродство к мешающим соединениям и не растворять анализируемые соединения.

➤ Смена растворителя: к извлечению из ЛРС добавляется жидкость, в которой не растворяются мешающие соединения (например, добавление к водному экстракту из ЛРС 95% спирта приводит к осаждению полисахаридов, что можно использовать в том случае, если они являются «мешающими» соединениями).

Для осуществления второго способа очистки - выделения анализируемых соединений - возможно применение одного из следующих способов:

- Осаждение. В этом случае дальше работают с осадком;
- Экстракции жидкость – жидкость;
- Смены растворителя. Хорошие результаты дает выпаривание на роторном растворителе под вакуумом и дальнейшее растворение осадка;
- Использование тонкослойной хроматографии. Метод позволяет разделять БАС, и при дальнейшем элюировании зон адсорбции, можно анализировать индивидуальные соединения. Метод трудоемкий и длительный, поэтому в настоящее время применяется редко.

После проведения очистки переходят к выбору метода спектрофотометрического анализа. Он может быть прямым, в случае если анализируемые соединения преобладают в химическом составе ЛРС и максимум их поглощения не перекрывается максимумами поглощения других оптически активных соединений. Прямой спектрофотометрией

определяют, например, фенолкарбоновые кислоты в УФ-области спектра; хлорофилл и каротиноиды в видимой области.

Если максимум поглощения анализируемых соединений находится в неспецифической области спектра и сливается с поглощением других соединений, то можно применять метод дифференциальной спектрофотометрии, заключающейся в том, что в кювете сравнения присутствуют все соединения, что и в рабочей, за исключением окрашенного комплекса.

Важным этапом в количественном определении является правильный выбор стандартного образца. В качестве стандартного образца должно использоваться вещество, реально присутствующее в ЛРС, желательно доминирующее в анализируемой группе соединений. По спектральным характеристикам стандартный образец должен быть близок к анализируемым БАС, то есть иметь максимумы и, желательно, минимумы при тех же длинах волн. Вещество может выступать в качестве стандартного образца, если интервал между максимумом дифференциальной кривой и длинноволновой полосой стандартного образца не превышает полуширины полосы поглощения стандартного образца [Ловцева Е.А., 1993.]. Для того чтобы правильно выбрать стандартный образец и аналитическую длину волны, нужно проанализировать спектр поглощения исследуемых веществ в широком диапазоне длин волн.

Обязательным условием является наличие линейной зависимости между концентрацией стандартного образца и значением оптической плотности (соблюдение закона Бугера–Ламберта–Бера). График должен быть построен не менее чем по пяти точкам и исходить из точки начала отсчета координат. Пересечение графиком оси ординат свидетельствует о систематической ошибке. В ряде случаев наблюдается ситуация, когда коэффициент поглощения перестает быть постоянным, а возрастает или уменьшается с ростом концентрации, то говорят о положительных (в первом случае) или отрицательных (во втором случае) отклонениях от закона

Бугера–Ламберта–Бера. Наиболее часто встречающиеся причины отклонения от этого закона можно разделить на три группы:

1. Причины, связанные с физико-химическими свойствами анализируемого вещества или всего раствора;
2. Инструментальные причины, обусловленные особенностями данного спектрофотометра;
3. Причины, связанные с анизотропией изучаемого вещества.

К физико-химическим причинам относится, прежде всего, несоответствие подставляемого в уравнение значения концентрации, истинной концентрации вещества в растворе. Это может быть вызвано реакциями диссоциации, ассоциации или химического взаимодействия растворенного вещества с растворителем и т.п. (если молярные показатели поглощения продуктов этих реакций отличаются от молярных показателей поглощения исходных веществ). Если константы этих процессов и молярные показатели поглощения продуктов (например, ассоциатов) известны, то отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера могут быть устранены подстановкой в уравнение $A = \lg \frac{I_0}{I_{\text{погл.}}} = \epsilon cl$ истинных значений концентрации и молярного показателя поглощения. Часто удается подобрать интервал концентраций, в котором явления ассоциации и диссоциации не наблюдаются и отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера отсутствуют.

Другой физико-химической причиной отклонения от закона является флуоресценция анализируемого вещества. Попадание испускаемого раствором флуоресцентного потока на фотоэлемент приводит к увеличению интенсивности прошедшего через раствор света, что, естественно, снижает экспериментально определяемую оптическую плотность. Вследствие частичной реабсорбции флуоресцентного света наблюдаемые отклонения будут зависеть от длины кюветы. При прочих равных условиях, отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера вследствие флуоресценции будут

возрастать с увеличением оптической плотности, и уменьшаться с ростом концентрации растворенного вещества.

Очевидной инструментальной причиной кажущихся отклонений от закона Бугера–Ламберта–Бера может быть нелинейная зависимость показаний прибора от интенсивности светового потока. Это явление можно легко обнаружить по результатам измерения пропускания, например, растворов хорошо изученных стандартных веществ.

Наиболее частой инструментальной причиной кажущихся отклонений от закона Бугера–Ламберта–Бера является немонахроматичность падающего на образец светового потока.

Третья группа отклонений от закона Бугера–Ламберта–Бера связана с делением поглощающего вещества в объеме анализируемого объекта. Так, для оптически анизотропных молекул поглощение неполяризованного света зависит от их упорядоченности. Отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера могут проявляться из-за неравномерного распределения поглощающего вещества в пучке света (кювете).

Если спектр поглощения имеет два максимума, для которых соблюдается закон Бугера–Ламберта–Бера, прерогатива принадлежит более высокому (выше чувствительность), более пологому (меньше ошибка метода), расположенному в области больших длин волн (меньше влияние сопутствующих соединений) пику.

Обычно в качестве стандарта используют субстанцию с высокой степенью чистоты (98–99,9%). Однако в фармакогностическом анализе в качестве референсного образца может быть использован стандартизированный экстракт с установленными характеристиками. Это практикуется в случае, когда невозможно выделить индивидуальное чистое соединение или в случае большой вариабельности состава анализируемых соединений. Далее подбирают условия пробоподготовки, такие как разведение (если для анализа берут аликвоту извлечения из ЛРС), соотношение объемов аликвоты извлечения и раствора

комплексообразователя, оптимальное время образования окрашенного комплекса (последние два параметра относятся к дифференциальной спектрофотометрии). Разведение должно подбираться таким образом, чтобы оптическая плотность была в диапазоне от 0,2 до 1. Относительная погрешность спектрофотометрического измерения резко возрастает при разведении меньше 0,2 и лишь медленно увеличивается при разведении больше 1,5.

На следующем этапе проводят тестирование разработанной методики. В связи с тем, что методика будет использоваться в серийном анализе, то ее апробацию необходимо проводить на разных сериях промышленных образцов ЛРС и препаратов. Это позволяет установить реальные нормы качества и избегать в будущем необходимости коррекции методики, вызванной различиями в химическом составе сырья от разных поставщиков.

Заключительным этапом является валидация разработанной методики, включающая доказательство специфичности, линейности, прецизионности, правильности, диапазона применения. Установление этих характеристик для методик определения БАС в ЛРС имеет свои особенности, которые были рассмотрены в главе 3. Все вышеизложенное позволило составить схему алгоритма разработки спектрофотометрической методики количественного определения фенольных соединений в ЛРС (рис. 71).

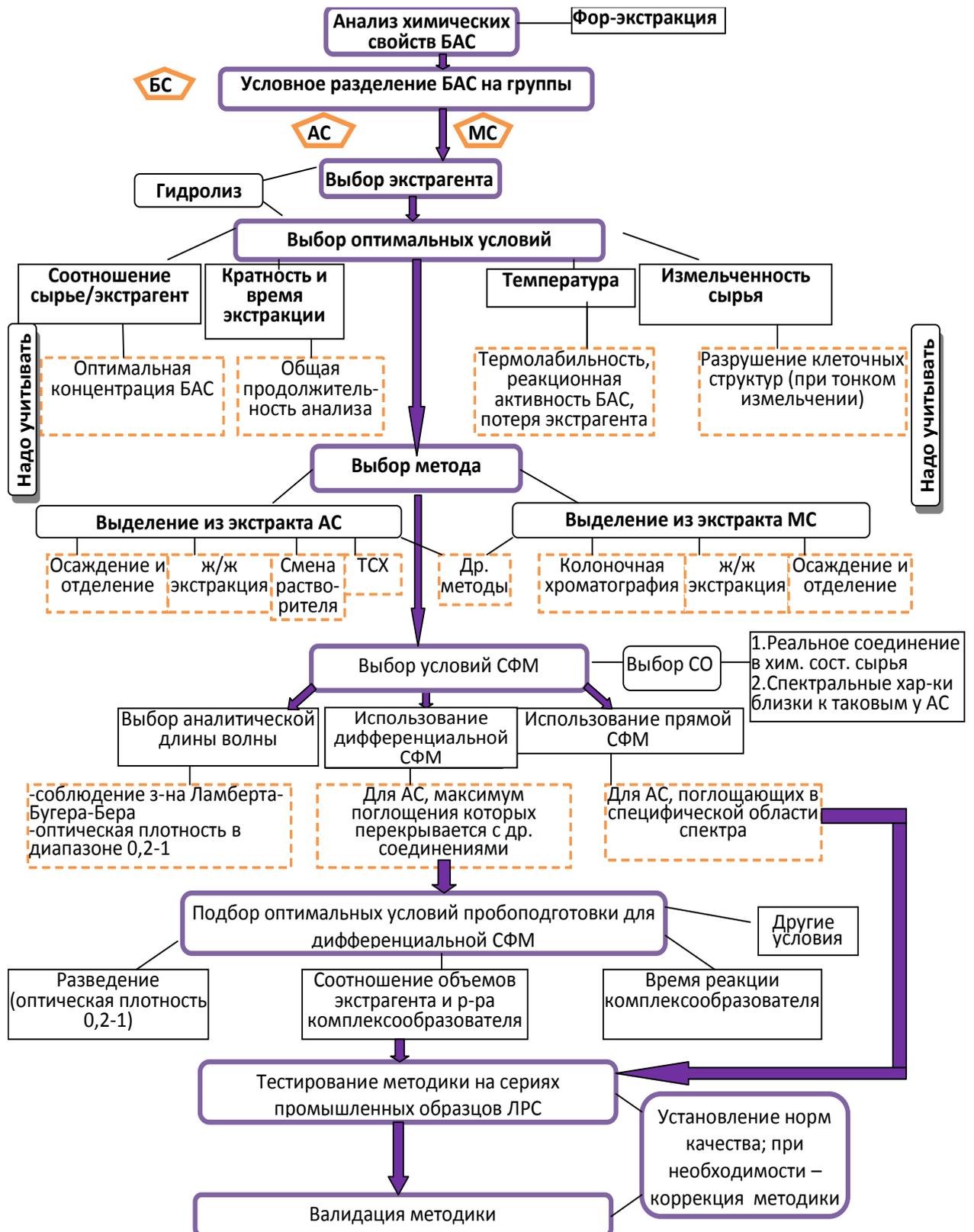


Рис. 71. Схема алгоритма разработки методики спектрофотометрического определения БАС в ЛРС.

(сокращения: БС – балластные соединения, МС – мешающие соединения, АС – анализируемые соединения, ж/ж – жидкость-жидкостная, ТСХ – тонкослойная хроматография).

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 4:

1. Разработаны спектрофотометрические методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках ноготков 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 крапивы; количественного определения суммы антраценпроизводных в сборе противогеморроидальном.
2. Показано, что спектрофотометрическое определение флавоноидов, основанное на измерении оптической плотности окрашенного комплекса с алюминия хлоридом, дает хорошо воспроизводимые результаты и может применяться в «сквозной» стандартизации в цепочке «сырье - настой - водно-спиртовые извлечения» за исключением тех случаев, когда флавоноидный состав ЛРС представлен по большей части агликонами, не переходящими в воду (травя пустырника).
3. Количественное содержание суммы антраценпроизводных в коре крушины целесообразно проводить в пересчете на реально присутствующее в сырье соединение – франгулин А, что делает определение антраценпроизводных в сырье более точным.
4. При анализе сборов ЛРС необходимо снимать спектр в диапазоне длин волн, а не ориентироваться на максимум поглощения одного из компонентов. Различный химический состав отдельных видов ЛРС влияет на длину волны, а, следовательно, и на выбор стандарта.
5. При наличии разницы между максимумом поглощения стандартного образца и анализируемой пробы более, чем на 2 нм, нужно брать реальный максимум аналита. Использование реального максимума возможно, если интервал между максимумом дифференциальной кривой и длинноволновой полосой стандартного образца не превышает полуширины полосы поглощения стандартного образца.
6. На основании собственных исследований и анализа литературных данных составлен подход к разработке методик спектрофотометрического

определения БАС в ЛРС с учетом принципа «сквозной» стандартизации и анализа компонентов метаболома растения.

ГЛАВА 5. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С УЧЕТОМ ЕГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И ПРИНЦИПА «СКВОЗНОЙ» СТАНДАРТИЗАЦИИ

Повышение безопасности и качества лекарственных средств, в том числе и растительного происхождения, может быть достигнуто при качественном увеличении эффективности научных и производственных систем путем алгоритмизации теоретического и практического базиса, необходимого для разработки достоверных методик анализа БАС в ЛРС, учитывая современные тенденции развития фармацевтической отрасли. Предлагаемые методики анализа для стандартизации ЛРС должны быть объективны, отвечать требованиям экспрессивности, экономичности, достаточной точности и селективности.

Актуальным направлением современной систематизации в стандартизации ЛРС является разработка универсальных «сквозных» методик, позволяющих контролировать содержание действующей группы БАС и в сырье, и в его лекарственных формах [171,172]. Подтверждением необходимости учитывать особенности химического состава ЛРС является интерес международного фармакопейного комитета к этой проблеме (Совещание Мировых Фармакопей в рамках Юбилейного 100-летнего Конгресса FIP, 3-8 октября 2013 г., Дублине). При разработке методики стандартизации ЛРС необходимо обратить внимание на пути его использования. Выбор анализируемой фракции БАС зависит от того, какие препараты получают из ЛРС.

При разработке методики количественного определения любой группы БАС в ЛРС и суммарных экстракционных растительных препаратах, нужно

принимать во внимание, что они содержат неопределенные количества известных и неизвестных соединений.

Для корректного выбора методики стандартизации сырья по содержанию БАС, необходимо изучить химический состав метаболома растения с позиции физико-химических свойств составляющих его компонентов.

Ошибки в определении анализируемой группы БАС вызваны, чаще всего, наличием «мешающих» сопутствующих соединений, присутствующих в значимых количествах. Под «значимыми количествами» сопутствующих соединений следует понимать их концентрации, имеющие тот же порядок, что и концентрации соединений анализируемой группы.

На основании полученных экспериментальных данных, выявленных закономерностей, анализа НД и обобщении литературных материалов был разработан алгоритм унификации методик титриметрического и спектрофотометрического анализа ЛРС с учетом принципа «сквозной» стандартизации (рис.72).

Так же были сформулированы подходы к выбору метода определения анализируемой группы БАС и разработке конкретной методики для стандартизации ЛРС, учитывающие особенности сочетания и химических свойств БАС в извлечениях.

Анализируемая группа - органические кислоты.

В ЛРС эта группа БАС представлена алифатическими органическими кислотами и фенолкарбоновыми кислотами. В ЛРС возможно количественное определение отдельно каждой группы кислот, как и суммарное определение.

ЛРС, содержащее преимущественно алифатические органические кислоты.

Для определения алифатических органических кислот используется титриметрический метод. При разработке методики количественного определения, следует учитывать, что кислоты могут находиться в ЛРС как в свободном, так и в связанном виде, и их содержание в разных видах ЛРС

сильно колеблется, на что указывает значение рН водного извлечения (Сорокина А.А., 2003 г.).

Если реакция среды водного извлечения из ЛРС меньше 5,6 (свободных органических кислот в ЛРС много), следует обратить внимание на интенсивность окраски извлечения и способность к пенообразованию. При слабой окраске и хорошем пенообразовании (плоды шиповника, рябины, калины) возможно алкалиметрическое титрование с использованием смеси индикаторов (методика ГФ XI изд. - определение свободных органических кислот в плодах шиповника). Также для таких видов ЛРС возможно потенциметрическое детектирование окончания титрования и обратное кислотнo-основное титрования. В последнем случае будет определяться сумма свободных и связанных органических кислот.

Если при взбалтывании водного извлечения из ЛРС пена отсутствует или неустойчива и/или экстракт интенсивно окрашен (плоды черной смородины, листья шалфея и др.), можно рекомендовать потенциметрию. Числовой показатель, устанавливаемый при стандартизации ЛРС, - «сумма свободных и связанных органических кислот в пересчете на...».

Для ЛРС, рН водных извлечений которых больше 5,6-5,7, т.е. свободных органических кислот мало (корневища с корнями диоскореи, трава донника, листья крапивы), стандартизовать ЛРС по сумме свободных органических кислот не рационально в виду малого количества этих БАС. Обратным кислотнo-основным титрованием с потенциметрическим детектированием конечной точки титрования удастся определить сумму свободных и связанных органических кислот.

ЛРС, содержащее преимущественно фенолкарбоновые кислоты.

В отличие от алифатических, фенолкарбоновые кислоты (ФКК) обладают оптической активностью, в связи с чем, основным методом их количественного определения является спектрофотометрия. Частая ошибка, которая возникает при анализе ФКК – завышенный результат из-за неспецифичности длины волны поглощения. ФКК поглощают в диапазоне

255-295 нм, в этой же области проявляют оптическую активность флаваноны (275-290 нм), флавоны (240-270 нм), флавонолы (240-270 нм), фенолоспирты (270-285 нм).

Избежать влияния фенолоспиртов можно добавлением щелочного буфера, тогда максимум их поглощения сместится в сторону больших длин волн на 40-60 нм.

Если в сырье в значимых количествах присутствуют флавоноиды, то определение суммы ФКК возможно, либо путем варьирования рН добавлением буферного раствора, либо отделением флавоноидов на этапе экстракции. На основании разницы в константах кислотности ФКК и флавоноидов возможно их разделение с помощью буферных растворов или, наоборот, совместное определение (цветки пижмы и препараты на их основе). В случае совместного определения (обычно в щелочных буферах) определяемый числовой показатель - «содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в пересчете на соответствующий стандартный образец». Экстракционно-спектрофотометрическое определение будет заключаться в экстрагировании ФКК из буферного раствора, например, с рН=2, этилацетатом. При этом флавоноиды остаются в растворе (цветки василька). Для каждого конкретного ЛРС рН буферного раствора необходимо подбирать индивидуально, в зависимости от преобладания тех или иных флавоноидов и ФКК. Для предварительного анализа условий проведения экстракции можно использовать, например, программу ACD-labs.

Если флавоноиды содержатся в небольших количествах (на порядок меньше, чем содержание анализируемой группы БАС), то их влиянием можно пренебречь. Также практически не оказывают влияние на количественное определение ФКК антоцианы (плоды малины).

ЛРС, содержащее приблизительно одинаковое количество алифатических органических кислот и фенолкарбоновых кислот.

Для этой группы ЛРС (листья мяты перечной, трава мелиссы, чабреца, душицы, цветки бессмертника и др.) титриметрически можно установить

только сумму алифатических и фенолкарбоновых кислот, поскольку в их константах кислотности нет достаточного (на три –четыре порядка и больше) различия. Для индикации конца титрования можно использовать как потенциометрию, так и смесь индикаторов (методика ГФ). Считаем, что предпочтение следует отдать потенциометрии как более объективному и точному методу.

Анализируемая группа - дубильные вещества

Для определения содержания в ЛРС дубильных веществ используется титриметрический метод. В ЛРС содержатся две группы дубильных веществ – гидролизуемые и конденсированные, в качестве сопутствующих групп БАС могут присутствовать ФКК и флавоноиды, содержание которых в разных видах ЛРС различно. Это необходимо учитывать при разработке методики количественного определения. В ГФ XI изд. применяется окислительно-восстановительное титрование. Применение индикатора – индигосульфокислоты для установления точки эквивалентности является недостатком методики. Индикатор сам окисляется, его окраска не меняется при перетитровании раствора; появление золотисто-желтого окрашивания трудно определить в интенсивно окрашенных извлечениях. Для избежания подобных проблем можно использовать потенциометрическое титрование (см. гл.3).

При выборе детекции окончания титрования дубильных веществ в ЛРС (использование индикатора или потенциометрии) необходимо учитывать начальный окислительно-восстановительный (ОВ) потенциал водного извлечения. Водное извлечение рационально получать в связи с тем, что в него хорошо переходят дубильные вещества.

ЛРС, содержащее значимые количества ФКК.

Экспериментально нами было установлено, что если начальный ОВ потенциал водного извлечения больше 700 мВ по отношению к хлорсеребряному электроду (трава донника лекарственного), то скачок титрования будет слабо выражен, поэтому рациональнее проводить

титрование с индигосульфокислотой в качестве индикатора (методика ГФ XI изд.). Содержание дубильных веществ в таких видах ЛРС очень низкое и стандартизация по данной группе БАС не целесообразна.

Если исходный ОВ потенциал водного извлечения меньше 700 мВ, то для количественного определения дубильных веществ можно использовать и потенциометрическое титрование, и применение индикатора. На дифференциальной кривой потенциометрического титрования может возникнуть один (как правило) или два скачка титрования. Наличие одного скачка титрования, при потенциале, близком к таковому при скачке титрования раствора танина, чаще всего, обусловлено существенным преобладанием в ЛРС гидролизуемых дубильных веществ, тогда пересчет суммы соединений можно проводить на танин.

Два скачка титрования проявляются, когда содержание гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ в ЛРС сопоставимо (корневища змеевика). Первый скачок (при меньшем объеме израсходованного титранта) относится к гидролизуемым (пересчет содержания дубильных веществ в ЛРС производится на танин), а второй – к конденсированным дубильным веществам (пересчет содержания дубильных веществ в ЛРС производится, например, на катехин).

ЛРС, содержащее незначительные количества ФКК

При определении дубильных веществ в ЛРС, содержащем менее 1% ФКК, возможно применение спектрофотометрии. Если предварительно проводится гидролиз, то определяемый показатель - «содержание суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую». Если гидролиз не проводится, то можно определить содержание свободной кислоты галловой и суммы дубильных веществ в пересчете на танин.

Если ОВ потенциал водного извлечения из ЛРС больше 700 мВ, скачок титрования будет слабо выражен, целесообразнее использовать методику ГФ (перманганатометрическое титрование с индикатором индигосульфокислотой). Если ОВ потенциал меньше 700 мВ, то лучше

проводить титрование с потенциометрическим детектированием конечной точки титрования. Здесь также возможно появление 2 скачков титрования, интерпретацию которых см. выше.

ЛРС, содержащее кроме дубильных веществ в значимых количествах флавоноиды.

Поглощение флавоноидов в коротковолновой области перекрываются с таковыми у дубильных веществ, поэтому для определения дубильных веществ в ЛРС, содержащем значительные количества флавоноидов, лучше использовать окислительно-восстановительное титрование. Детектором конечной точки титрования может быть как индикатор, так и изменение потенциала, если исходный ОВ потенциал меньше 700 мВ.

Если ЛРС содержит незначительные количества флавоноидов и ФКК, для определения дубильных веществ чаще всего используют как спектрофотометрию (определение свободной галловой кислоты, суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую, суммы дубильных веществ в пересчете на танин), так и титриметрию. При высоком содержании дубильных веществ более точное определение конечной точки титрования дает потенциометрический метод.

Анализируемая группа - флавоноиды

При определении в ЛРС суммы флавоноидов наиболее точные результаты дает дифференциальная спектрофотометрия. Чаще всего получают окрашенный комплекс с алюминия хлоридом. Чтобы реакция шла в соотношении 1:1 необходимо добавлять кислоту уксусную или хлористоводородную, чтобы разрушить комплекс по кольцу В при наличии в нем двух соседствующих гидроксильных групп. При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в ЛРС, следует учитывать содержание в нем органических кислот и полисахаридов.

При разработке методик определения суммы флавоноидов в водных извлечениях из ЛРС и препаратах, полученных с использованием этилового спирта низких концентраций (трава душицы, листья крапивы) серьезной

проблемой может стать большое количество полисахаридов в их извлечении. Одним из решений этой проблемы может стать их удаление из извлечения путем осаждения 95% спиртом этиловым.

Содержание в ЛРС существенных количеств ФКК, фенолоспиртов, дубильных веществ, не требует их удаления из анализируемого извлечения. Влияние ФКК (при рН извлечения из ЛРС меньше 6,5) можно устранить путем создания кислой среды добавлением буферного раствора до рН 2-4.

Если рН извлечения имеет значение больше 6,5 (листья крапивы), то даже добавление кислоты не устранил диссоциацию флавоноидов и быстрый гидролиз алюминия хлорида, в результате чего образуется осадок и спектрофотометрическое определение становится недоступным. Выходом из этой ситуации может стать использование ацетатного буфера.

При незначительном присутствии в ЛРС ФКК, фенолоспиртов и дубильных веществ возможно применение прямой спектрофотометрии.

На основании вышеизложенного, были предложены пошаговые блок-схемы (рис. 73-73), которые определяют последовательность операций при разработке методики анализа для стандартизации ЛРС, учитывающие особенности сочетания БАС и их химические свойства.

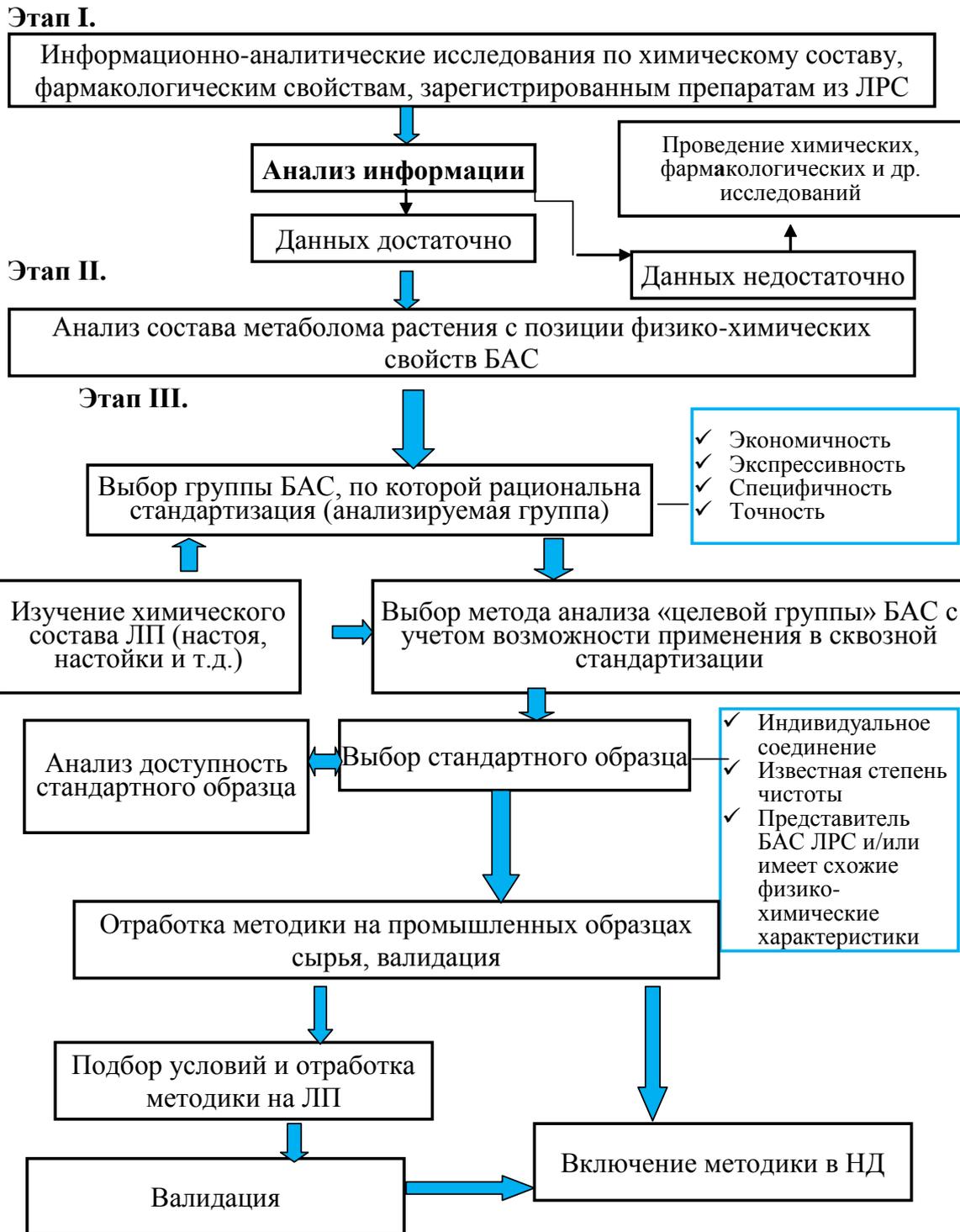


Рис. 72. Алгоритм разработки методики количественного определения БАС в ЛРС и препаратах на его основе с учетом принципа «сквозной» стандартизации.

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 5

1. На основании собственных экспериментальных и литературных данных выявлены закономерности влияния алифатических органических кислот, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ и флавоноидов на определение отдельных групп перечисленных БАС при их совместном присутствии в ЛРС.
2. Составлен общий алгоритм разработки методики количественного определения БАС в ЛРС и препаратах на его основе с учетом принципа «сквозной» стандартизации.
3. Предложены схемы алгоритмов разработки методик количественного определения в ЛРС органических кислот, дубильных веществ и флавоноидов с учетом химического состава сырья.



Рис.73. Схема выбора метода количественного анализа органических кислот для стандартизации ЛРС.

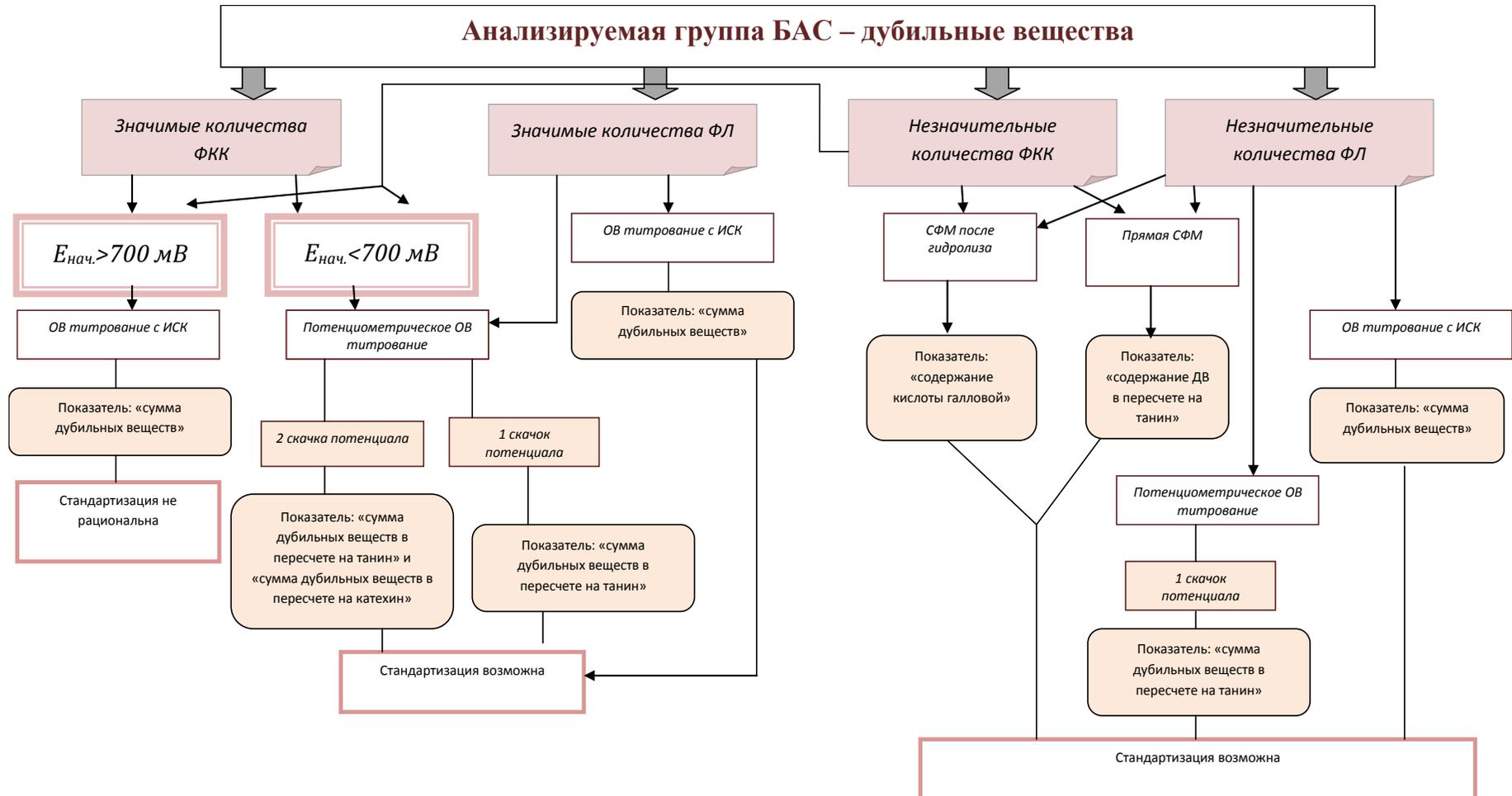


Рис.74. Схема выбора метода количественного анализа дубильных веществ в ЛРС.



Рис.75. Схема выбора метода количественного анализа флавоноидов в ЛРС.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭКСТРАКЦИЮ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

6.1. Изучение влияния ультразвука на эффективность экстракции флавоноидов

В настоящее время большое значение уделяется вопросам интенсификации процесса экстракции под воздействием различных физических и химических факторов. Одним из наиболее часто используемых, в том числе на предприятиях и заводах методом получения настоек, является экстракция под действием ультразвука. Как уже отмечалось, в литературе представлены разнообразные данные об эффективности ультразвукового воздействия, но информации о вкладе термической составляющей, неизбежно сопровождающей этот процесс, приводится недостаточно. Поэтому интересным представляется выяснить значимость температурного фактора и самого ультразвукового воздействия на процесс экстракции. В качестве объекта исследования были выбраны воздушно – высушенные цветки бессмертника песчаного, поскольку они содержат достаточно большое количество флавоноидов.

Для изучения влияния ультразвука на эффективность экстракции флавоноидов из цветков бессмертника были поставлены опыты при комнатной температуре с постоянным мониторингом изменения температуры в ходе экстракции и при 0⁰С.

6.1.1. Изучение влияния УЗ на эффективность экстракции флавоноидов из цветков бессмертника при комнатной температуре

Навеску сырья, массой около 1 г (точная навеска), помещали в мерный стакан вместимостью 200 мл, добавляли 50 мл воды. Стакан помещали в УЗ-ванну, заполненную водой. Рабочая частота составила 35 кГц.

Продолжительность экстракции - 20 минут при температуре 26-30°C. Изменение температуры в процессе экстракции отражено в табл.89.

Таблица 89. Изменение температуры при ультразвуковой экстракции

Время, мин	1	2	11	16	20
t, °C	26	30	30	30	30

Параллельно проводился контрольный опыт. Навеску сырья, массой 1 г (точная навеска), помещали в мерный стакан вместимостью 200 мл, добавляли 50 мл воды. Экстракция проводилась 20 минут при температуре + 26-30°C.

Затем оба извлечения фильтровали через марлевый фильтр в мерные колбы вместимостью 50 мл, сырье выжимали и доводили до метки водой дистиллированной.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 5 мл извлечения, 5 мл 2% раствора алюминия хлорида, добавляли 2 капли кислоты уксусной разведенной, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 5 мл извлечения, 2 капель разбавленной уксусной кислоты, доведенных в мерной колбе вместимостью 25 мл до метки 95% спиртом этиловым.

Для выяснения оптимального времени для комплексообразования был проведен анализ зависимости оптической плотности анализируемого раствора от времени. Данные представлены в табл.90.

Таблица 90. Зависимость изменения оптической плотности раствора от времени

Время от начала реакции с $AlCl_3$, мин	Оптическая плотность
15	0,28
25	0,37
30	0,42
40	0,41
50	0,42
60	0,43
70	0,42

Так как максимальное значение оптической плотности устанавливается через 30 мин, а затем не изменяется в течение 40 мин, то измерения проводили на спектрофотометре спустя 30 минут после приготовления в интервале длин волн 300 – 450 нм (рис.76). Спектр поглощения комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом, полученный при анализе извлечения холостого опыта, представлен на рис. 77.

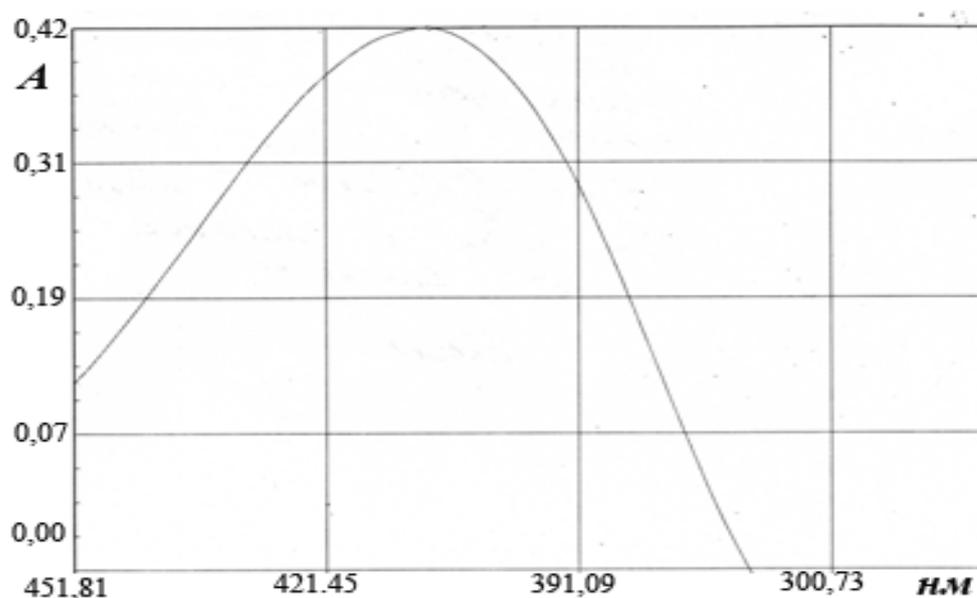


Рис. 76. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов цветков бессмертника с алюминия хлоридом при извлечении УЗ (комнатная температура).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье проводили по формуле:

$$X(\%) = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 5 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с $AlCl_3$; m – масса сырья, г; m_0 – масса рутина, г; W – влажность, %.

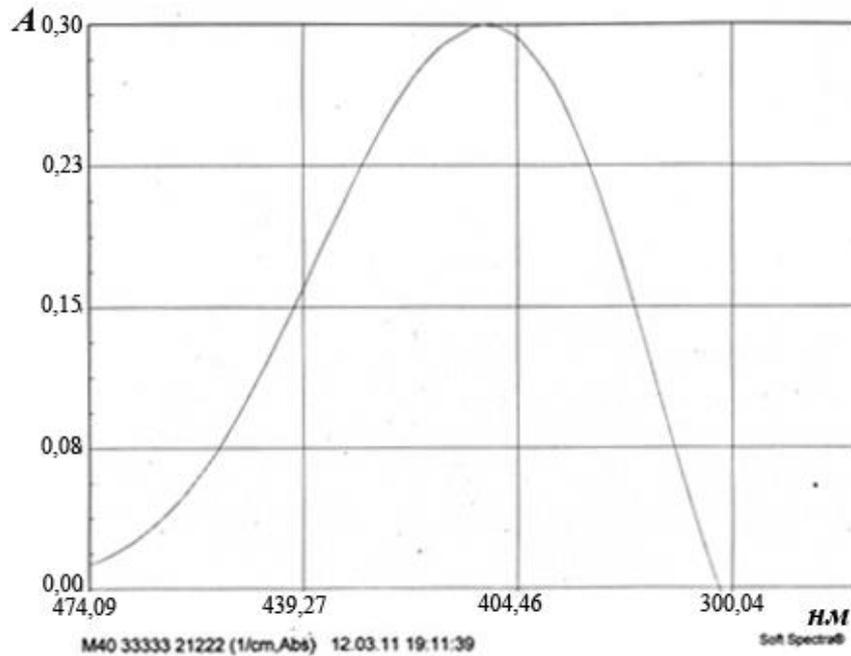


Рис. 77. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов извлечения при комнатной температуре из цветков бессмертника с алюминия хлоридом (контрольный опыт, без УЗ).

Данные по содержанию суммы флавоноидов в экстракте цветков бессмертника, полученном при воздействии ультразвука и при холостом опыте, представлены в табл. 94.

Также были проанализированы обзорные спектры двух экстрактов (полученного под действием УЗ и в холостом опыте) для выявления возможных различий в химическом составе.

Для получения обзорного спектра в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2 мл извлечения, доводили объем раствора до метки водой. В качестве раствора сравнения использовалась вода (рис.78).

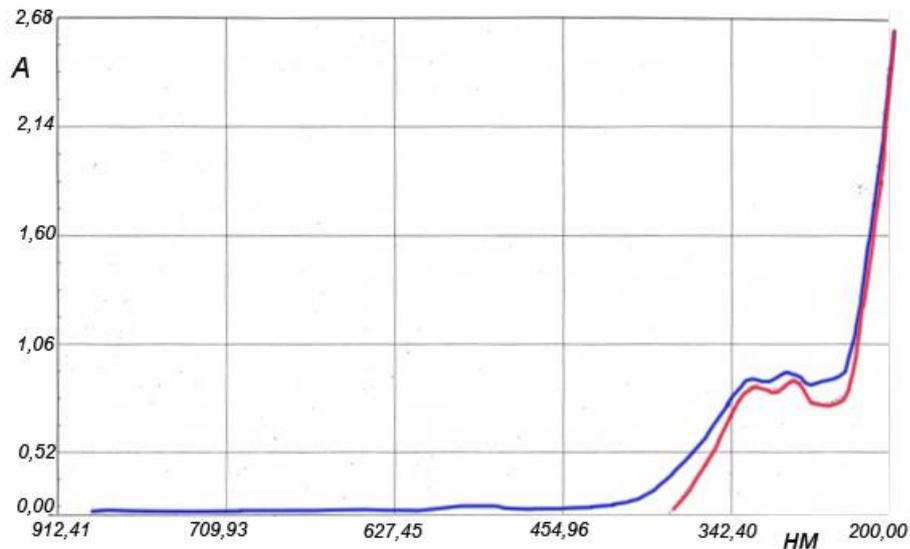


Рис.78. Обзорный абсорбционный спектр поглощения экстрактов из цветков бессмертника (синий – при воздействии УЗ; красный – контрольный опыт).

Из обзорных абсорбционных спектров видно, что экстракты различны по количеству извлекаемых соединений. Наличие минимумов и максимумов поглощения при одних и тех же длинах волн дает возможность предположить идентичность качественного состава извлечений.

6.1.2. Изучение влияния УЗ на эффективность экстракции флавоноидов из цветков бессмертника при температуре 0-4°C

Навеску цветков бессмертника массой около 1 г (точная навеска) помещали в мерный стакан вместимостью 200 мл, добавляли 50 мл воды, охлажденной до 0°C. Стакан помещали в УЗ-ванну, заполненную водой, дробленным льдом и снегом. Во время экстракции проводился мониторинг температуры (табл.91), при повышении температуры добавляли новые порции льда и снега. Время экстракции составляло 20 минут. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, сырье выжимали.

Таблица 91. Мониторинг температуры при холодной экстракции

Время, мин	0	2	5	17	20
t °C	+2	+4	+4	+4	+4

Анализ извлечений.

Приготовление рабочего раствора. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 10 мл извлечения, 5 мл 2% раствора алюминия хлорида, добавляли 2 капли разведенной кислоты уксусной, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым (рис.79).

Приготовление раствора сравнения. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 10 мл извлечения, 2 капли разбавленной уксусной кислоты, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым.

Оптическую плотность раствора измеряли через 30 мин на спектрофотометре в интервале длин волн 450-300 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье при холодной экстракции проводили по формуле:

$$X(\%) = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 10 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом; m – масса сырья, г; m_0 – масса рутина, г; W – влажность, %.

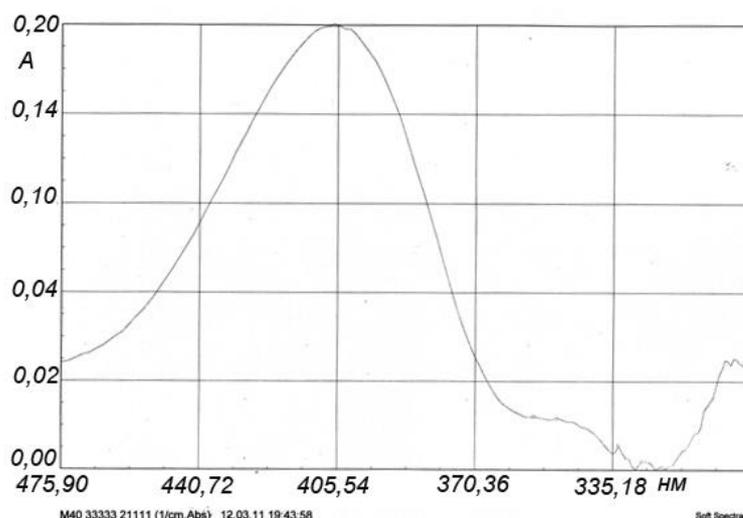


Рис. 79. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов холодного извлечения из цветков бессмертника с алюминия хлоридом.

Параллельно проводили контрольный опыт. Навеску массой около 1 г помещали в мерный стакан вместимостью 200 мл, добавляли 50 мл воды, охлажденной до 0°C. Стакан помещали в емкость без УЗ, заполненную дробленным льдом и снегом. Во время экстракции проводился мониторинг температуры (табл.92), при повышении температуры добавляли новые порции льда и снега. Время экстракции составляло 20 минут (рис.80).

Приготовление рабочего раствора. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 15 мл извлечения, 5 мл 2% раствора алюминия хлорида, добавляли 2 капли разведенной кислоты уксусной, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым.

Приготовление раствора сравнения. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 15 мл извлечения, 2 капли разбавленной уксусной кислоты, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым.

Оптическую плотность раствора измеряли через 30 мин на спектрофотометре в интервале длин волн 450-300 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Таблица 92. Мониторинг температуры при контрольном опыте

Время, мин	0	2	5	17	20
t °C	+2	+4	+4	+4	+3

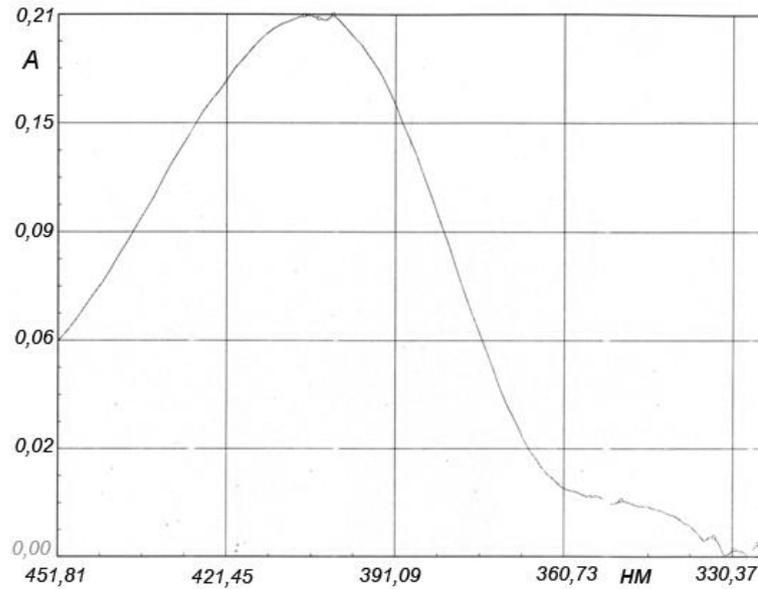


Рис. 80. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов холодного извлечения из цветков бессмертника с алюминия хлоридом (контрольный опыт).

Для получения обзорного спектра в колбу вместимостью 25 мл помещали 2 мл извлечения, довели объем раствора до метки водой. В качестве раствора сравнения использовалась вода (рис. 81 и 82-контрольный опыт).

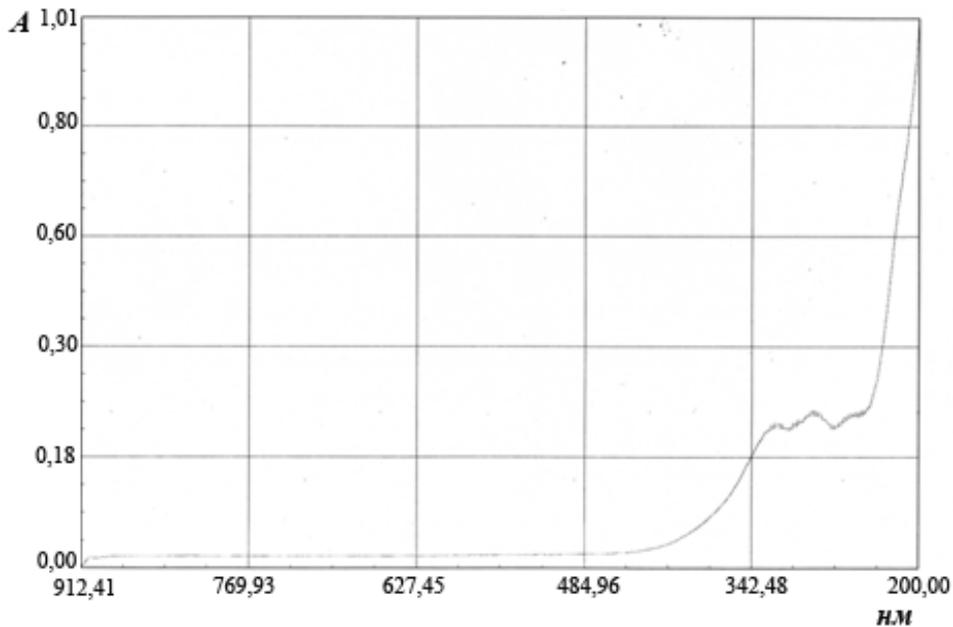


Рис. 81. Обзорный абсорбционный спектр холодного извлечения из цветков бессмертника.

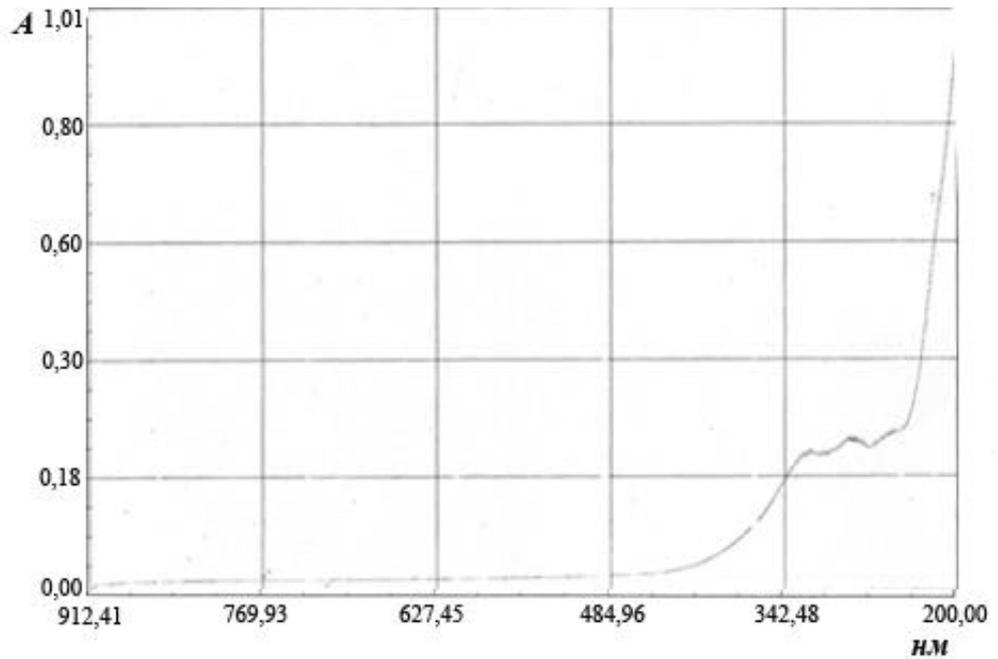


Рис. 82. Обзорный абсорбционный спектр холодного извлечения из цветков бессмертника (контрольный опыт).

Таблица 93. Содержание суммы флавоноидов в экстрактах цветков бессмертника ($n=5$; $p=0,95$)

Вид экстракта	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %	λ_{\max} , нм
С УЗ при комн. t	$0,47 \pm 0,02$	409
Без УЗ при комн. t(к.о)	$0,33 \pm 0,03$	409
УЗ при $t = 0-4^{\circ}\text{C}$	$0,28 \pm 0,01$	407
Без УЗ при $t = 0-4^{\circ}\text{C}$ (к.о.)	$0,078 \pm 0,003$	408

6.2. Изучение влияния электрического поля на экстракцию флавоноидов и дубильных веществ

6.2.1. Изучение влияния электрического поля на экстракцию флавоноидов

В литературе присутствуют данные по 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.

Поэтому важным является поиск новых способов экстракции, позволяющих проводить извлечение без существенного повышения температуры.

Одним из вариантов может быть экстракция под действием электрического низковольтного напряжения с применением в качестве экстрагента воды дистиллированной, что обеспечивает минимальное образование тока в экстракционной системе.

Для этого метода было сконструировано экстракционное устройство (рис.83). Установка представляет собой экстракционный сосуд цилиндрической формы из стекла или нержавеющей стали, оснащенный патрубками для подачи и слива экстрагента. В сосуд 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 электродов и их площадью составило 1:500.

Между двумя электродами зажимали навеску измельченного ЛРС, распределенного тонким слоем (1-10 см), помещенную в проницаемую бумажно-волоконистую мембрану, равную по размерам площади электродов. Пластинки электродов скрепляли между собой четырьмя пластиковыми зажимами, регулирующими толщину слоя сырья.

В экстракционный сосуд заливали воду дистиллированную до полного покрытия электродов.

К внешним контактам электродов подводили напряжение от генератора или стабилизатора, подключенного к сети через цифровой таймер. На таймере устанавливалось время работы мешалки и время подачи напряжения на электроды. Подобное подключение электрической цепи позволило включать и отключать подачу напряжения и приводить в движение лопастную мешалку одновременно или по отдельности.

Реакционная система перемешивалась мешалкой с целью облегчения процесса диффузии БАС в раствор.

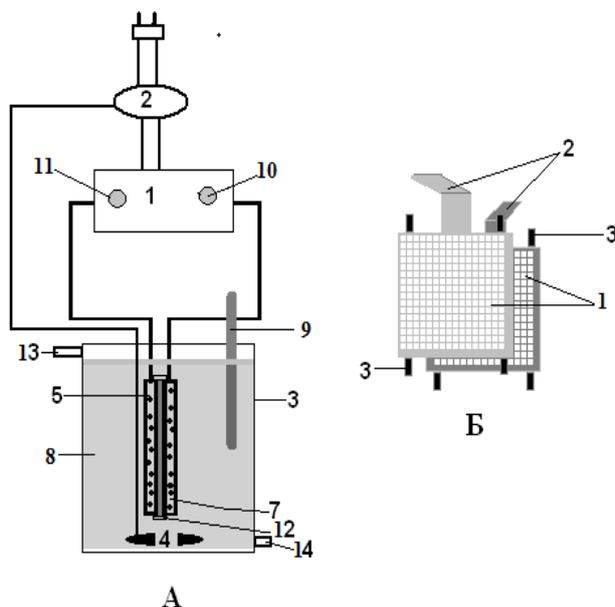


Рис. 83. Схема экстракционной установки.

Поскольку электропроводность дистиллированной воды практически равна нулю, то и ток (I) равен нулю, то есть в соответствии с законом Джоуля - Ленца процесс экстракции не сопровождался разогревом раствора (температура – 25^0 С). Движущей силой экстракции в том случае является «раскачивание» молекул БАС, содержащихся в ЛРС и энергия вращения диполей воды.

Методика проведения эксперимента:

Между двумя сетчатыми электродами из нержавеющей стали помещали навеску измельченных цветков бессмертника массой около 1 г (точная навеска), в фильтр-пакете. Приливали 150 мл воды дистиллированной и оставляли настаиваться при комнатной температуре в течении 30 минут при перемешивании с помощью магнитной мешалки. Затем к внешним контактам электродов подводили напряжение от генератора. В эксперименте использовали постоянный ток с различным напряжением (табл.

94; рис.85), и переменный ток, напряжением 4В, с различной частотой (табл. 95; рис.86).

Длительность воздействия электрического тока составляла 30 минут. Для сравнения результатов, ставили контрольный опыт без воздействия электрического тока. Раствор перемешивался магнитной мешалкой с целью облегчения процесса диффузии БАС в раствор на протяжении всего эксперимента.

Анализ полученных извлечений проводили по содержанию флавоноидов в пересчете на рутин и дубильных веществ в пересчете на танин.

Для анализа суммы флавоноидов в колбу вместимостью 25 мл помещали 2 мл полученного извлечения, добавляли 2 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, 5 капель кислоты уксусной разведенной, доводили до метки 70% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 10 мл извлечения, 5 капель кислоты уксусной разведенной и 70% спирта этилового до 25 мл. Затем спустя 30 минут измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре.

Данные по длинам волн, соответствующим максимумам поглощения флавоноидов с алюминия хлоридом, полученные при анализе извлечений с применением постоянного и переменного напряжения представлены в табл. 96. Содержание флавоноидов в % в экстракте в пересчете на рутин определяли по формуле:

$$X = \frac{c_{\text{рут.}} \cdot A \cdot V_{\text{м.к.}} \cdot V_{\text{экстр.}} \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 2 \cdot m_{\text{с.}} \cdot (100 - W)},$$

где $c_{\text{рут.}}$ - концентрация раствора комплекса рутина с алюминия хлоридом, г/мл; A - оптическая плотность рабочего раствора; A_0 - оптическая плотность раствора сравнения; $V_{\text{экстр.}}$ - объем экстракта, мл; $m_{\text{с.}}$ - масса сырья, г.

Раствор ГСО рутин готовили следующим образом:

Около 0,02 г (точная навеска) стандартного образца рутин (ФС 42-2508-87), в пересчете на сухое вещество, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 85 мл 70% спирта этилового и нагревали на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждали, доводили объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивали (раствор А).

Аликвоту раствора А, равную 1 мл, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом и 2 капли кислоты уксусной. Объем раствора доводили тем же спиртом до метки и оставляли на 30 мин. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 409 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора рутин, 2 капель разведенной кислоты уксусной, доведенных 70% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Полученные данные по определению содержания суммы флавоноидов при экстракции под действием постоянного и переменного тока представлены в табл. 94 и 95 и рис. 84 и 85 соответственно.

Таблица 94. Зависимость эффективности экстракции флавоноидов цветков бессмертника песчаного под воздействием постоянного электрического тока от напряжения ($n=5$; $p=0,95$)

Напряжение, В	0	1,5	3	4,5	6	7,5	9	12
Сумма флавоноидов %	0,221 ±0,002	0,291 ±0,003	0,194 ±0,002	0,177 ±0,05	0,162 ±0,004	0,210 ±0,002	0,291 ±0,003	0,194 ±0,004

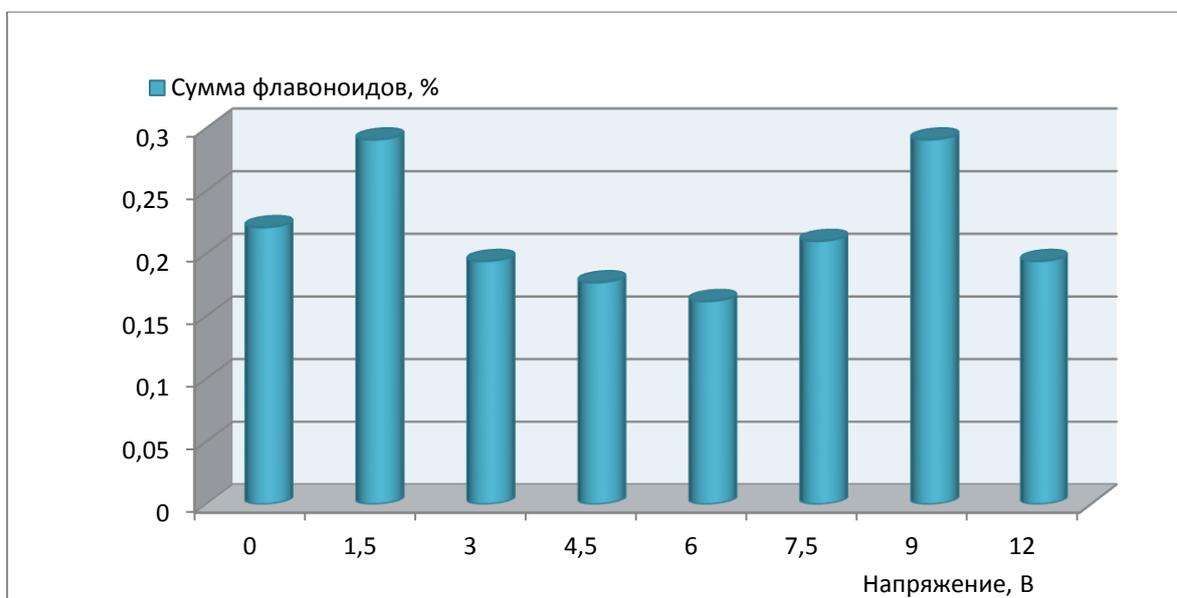


Рис. 84. Диаграмма зависимости эффективности экстракции флавоноидов от величины напряжения.

Анализируя полученные данные можно отметить, что изменение величины напряжения в исследуемом интервале не способствует существенному повышению эффективности экстракции флавоноидов из ЛРС, напротив при значениях напряжения 3;4,5;6;12 В извлекается меньшее количество флавоноидов, чем в контрольном опыте без воздействия напряжения. Особенно малое количество обнаружено при воздействии напряжения 6 В.

Таблица 95. Зависимость эффективности экстракции флавоноидов цветков бессмертника песчаного от частоты переменного электрического тока ($n=5$; $p=0,95$)

Частота, Гц	10^{-3}	$3,16 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$3,16 \cdot 10^{-2}$	10^{-1}	1	3,16	10
Сумма флавоноидов, сырье, %	0,31 $\pm 0,02$	0,24 $\pm 0,01$	0,26 $\pm 0,02$	0,61 $\pm 0,03$	0,47 $\pm 0,02$	0,36 $\pm 0,02$	0,45 $\pm 0,01$	0,53 $\pm 0,03$
Частота, Гц	10^2	$3,16 \cdot 10^2$	10^3	$3,16 \cdot 10^3$	10^4	$3,16 \cdot 10^4$	10^5	настой*
Сумма флавоноидов, %	0,61 $\pm 0,03$	0,45 $\pm 0,02$	0,26 $\pm 0,01$	0,84 $\pm 0,03$	0,60 $\pm 0,02$	0,50 $\pm 0,02$	0,32 $\pm 0,01$	0,44 $\pm 0,02$

*настой, полученный по методике ГФ; пересчет суммы флавоноидов на рутин.

Анализ данных таблицы 6 показывает, что изменение частоты оказывает существенное влияние на эффективность экстракции флавоноидов. Минимальные значения обнаружены при частотах $3,16 \cdot 10^{-3}, 10^{-2}, 10^3$; максимальные – при частотах $3,16 \cdot 10^{-2}, 10^2, 10^4$. Наиболее эффективна экстракция флавоноидов при частоте $3,16 \cdot 10^3$.

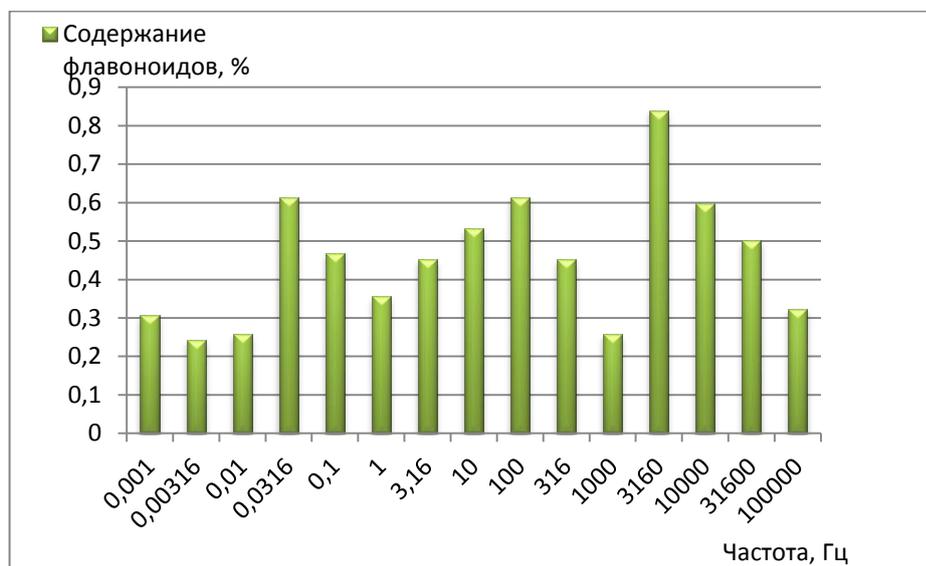


Рис. 85. Диаграмма зависимости эффективности экстракции флавоноидов от напряжения различной частоты.

Таблица 96. Зависимость длины волны, соответствующей максимумам поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом при различных условиях экстракции

Частота (f), Гц	10^{-3}	$3,16 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$3,16 \cdot 10^{-2}$	10^{-1}	1	3,16	10
$\lambda_{\text{макс.}}$, нм	410	404	406	404	408	406	406	408
Частота, Гц	10^2	$3,16 \cdot 10^2$	10^3	$3,16 \cdot 10^3$	10^4	$3,16 \cdot 10^4$	10^5	0(контроль)
$\lambda_{\text{макс.}}$, нм	406	404	406	407	405	408	405	408
Напряжение, В (f=0)	1	1,5	3	4,5	6	7,5	9	23
$\lambda_{\text{макс.}}$, нм	407	407	407	407	411	408	408	408

Анализ длин волн, соответствующих максимумам поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом при различных условиях экстракции, позволяет косвенно судить о различиях в качественном составе флавоноидов в экстрактах, когда длина волны не укладывается в интервал 408 ± 2 нм.

Наиболее полную экстракцию флавоноидов можно достичь, используя переменный ток, напряжением 4В, с частотой $3,16 \cdot 10^3$ Гц.

6.2.2. Изучение влияния электрического напряжения на экстракцию дубильных веществ

Извлечения из цветков бессмертника получали по методике, описанной в п. 6.2.1. Для анализа дубильных веществ пипеткой отбирали 20 мл полученного извлечения в коническую колбу вместимостью 500 мл, прибавляли 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до золотисто - желтого окрашивания.

Параллельно проводили контрольный опыт.

1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание дубильных веществ (X) в процентах в пересчете на абсолютное сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot 150 \cdot 100}{20 \cdot (100 - W)},$$

где V - объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, мл; V_1 - объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 0,004157 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) (в пересчете на танин), г; m - масса сырья г; W - потеря в массе при высушивании сырья, %; 150 - общий объем извлечения, мл; 20 - объем извлечения, взятого для титрования, мл.

Влияние постоянного напряжения различной величины напряжения представлено в табл. 97, рис. 86, переменного напряжения, равного 4В, с различной частотой – в табл. 98, рис. 87.

Таблица 97. Зависимость эффективности экстракции дубильных веществ цветков бессмертника песчаного от напряжения при экстракции под воздействием постоянного электрического напряжения ($n=5$; $p=0,95$)

Напряжение, В	0	1,5	3	4,5	6	7,5	9	12
Сумма дубильных веществ в пересчете на танин, %	0,249	0,998	1,048	1,122	1,372	1,497	1,871	1,871

Данные таблицы 102 показывают, что с увеличением напряжения возрастает эффективность экстракции дубильных веществ, а, при значении 9-12 В не изменяется. Повышение напряжения существенно интенсифицирует процесс экстракции по сравнению с контрольным опытом.

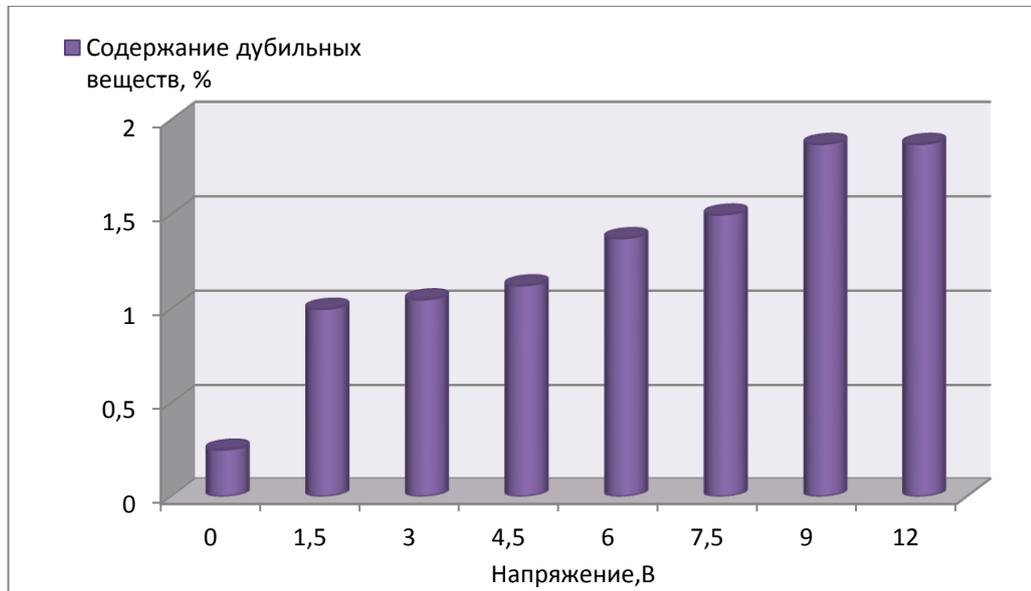


Рис.86. Диаграмма зависимости эффективности экстракции дубильных веществ от величины напряжения.

Таблица 98. Зависимость эффективности экстракции дубильных веществ от частоты переменного электрического напряжения на примере цветков бессмертника песчаного ($n=5$; $p=0,95$)

Частота, Гц	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1	10
Сумма дубильных веществ в пересчете на танин, %	$1,87 \pm 0,02$	$1,87 \pm 0,02$	$1,96 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,02$
Частота, Гц	10^2	10^3	10^4	10^5	
Сумма дубильных веществ в извлечении в пересчете на танин, %	$1,78 \pm 0,01$	$1,25 \pm 0,02$	$1,81 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,03$	

Анализ результатов, представленных в табл. 98 показывает, что изменение частоты в рамках одного и того же значения напряжения влияет на экстракцию дубильных веществ. Наибольшее количество экстрагируется при частоте 10^{-1} Гц, наименьшее – при 10^3 Гц.

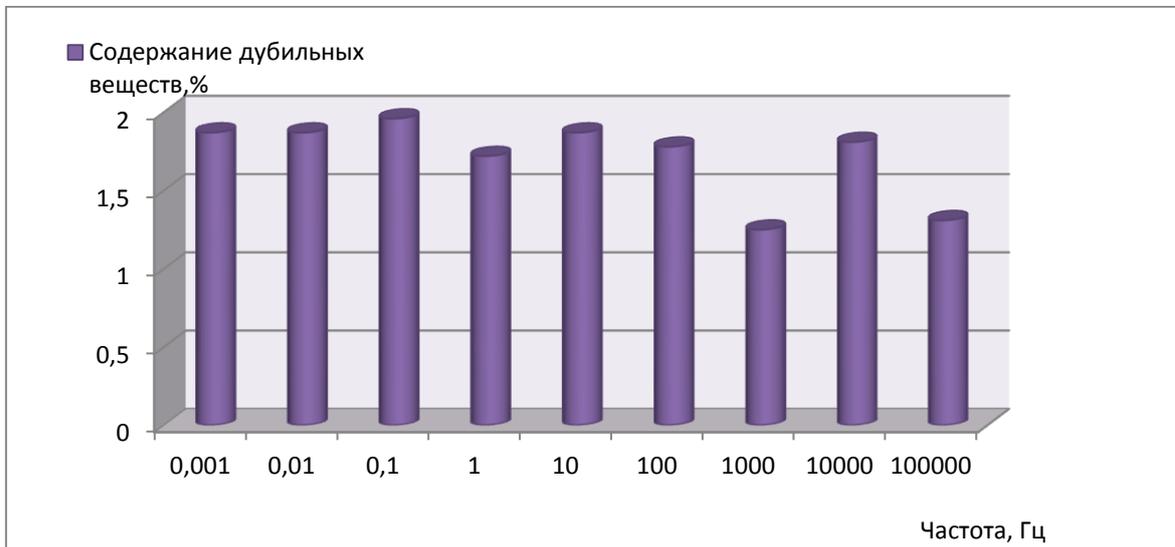


Рис. 87. Диаграмма зависимости эффективности экстракции дубильных веществ от частоты.

6.2.3. Использование электрического поля для отдельной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья

Результаты исследований, приведенные в параграфах 3.2.1 и 3.2.2. показали различное влияние постоянного и переменного напряжения различных частот и мощностей на экстракцию флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья. Анализ данных позволил 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 9В, а затем переменного напряжения амплитудой 4В и частотой $3,16 \cdot 10^{-2}$ Гц, предварительно обновив порцию экстрагента. Дубильные вещества необходимо выделять первыми в виду их более высокой растворимости в воде, нежели у флавоноидов.

В качестве объектов исследования было выбрано измельченное воздушно – сухое лекарственное растительное сырье: цветки ромашки аптечной и цветки бессмертника песчаного.

Точную навеску измельченного сырья массой около 1,5 г помещали в пакет из проницаемой бумажно – волокнистой бумаги, который зажимали между двумя сетчатыми электродами из нержавеющей стали. Электроды с навеской погружали в стакан с дистиллированной водой объемом 150 мл. К внешним контактам электродов подводили напряжение 9 В от генератора постоянного напряжения. Раствор перемешивали магнитной мешалкой. Экстракцию проводили в течение 30 мин. При этом в извлечение переходила сумма дубильных веществ.

Затем, воду, содержащую сумму дубильных веществ, сливали, в стакан наливали такой же объем воды дистиллированной. К внешним контактам электродов подводили напряжение от генератора переменного напряжения 4В, частотой $3,16 \cdot 10^{-2}$ Гц. Раствор перемешивали магнитной мешалкой в течение 30 мин. При этом в воду экстрагировались флавоноиды.

Для сравнения получали также контрольный экстракт, без наложения электрического поля при перемешивании экстрагента в течение 1 ч.

Количественное содержание флавоноидов дубильных веществ в экстрактах цветков бессмертника и цветков ромашки указано в табл. 99 и 100 соответственно.

Таблица 99. Количественное содержание флавоноидов дубильных веществ в экстрактах цветков бессмертника ($n=5$; $p=0,95$)

Показатель	Экстракт, полученный при постоянном напряжении	Экстракт, полученный при переменном напряжении	Контрольный опыт (без напряжения)
Содержание дубильных веществ в извлечении в пересчете на танин, %	1,87±0,03	не обнаружено	0,25±0,01
Содержание флавоноидов в извлечении в пересчете на рутин, %	0,12±0,02	0,82±0,03	0,22±0,01

Таблица 100. Количественное содержание флавоноидов и дубильных веществ в экстрактах цветков ромашки ($n=5$; $p=0,95$)

Показатель	Экстракт, полученный при постоянном напряжении	Экстракт, полученный при переменном напряжении	Контрольный опыт (без напряжения)
Содержание дубильных веществ в извлечении в пересчете на танин, %	1,18±0,02	не обнаружено	0,22±0,01
Содержание флавоноидов в извлечении в пересчете на рутин, %	0,03±0,001	0,23±0,02	0,06±0,002

Анализ данных таблиц 100 и 101 показывает возможность применения метода отдельной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья в целях проведения очистки при количественном определении этих групп соединений.

6.3. Исследования по влиянию значения рН экстрагента на эффективность экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья

Для сравнительного изучения влияния рН экстрагентов на переход флавоноидов анализировали настои, полученные согласно Инструкции по применению. Навеску сырья массой около 3 г (точная навеска) помещали в посуду, покрытую эмалью, объемом 500 мл, заливали 200 мл экстрагента, доведенного до кипения, и проводили экстракцию на водяной бане в течение 15 минут, после чего настаивали 45 минут при комнатной температуре, затем фильтровали через ватно–марлевый фильтр. В качестве экстрагента использовалась вода, а также буферные растворы, состав которых указан в таблице 101.

Таблица 101. Экстрагенты, используемые для получения настоев.

Буферный раствор	рН	Состав раствора
калий тетраоксалат	1,68	$\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
фосфатный	5,07	$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$
фосфатный	6,86	$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$
фосфатный	7,24	$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$
натрий тетраборнокислый	9,18	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

Для сравнения характера экстрагируемых соединений снимали обзорные абсорбционные спектры полученных настоев. Затем анализировали абсорбционные спектры настоев с добавлением 2% спиртового раствора алюминия хлорида. В качестве раствора сравнения использовали раствор, аналогичный рабочему, но без добавления настоя. При сравнении электронного спектра водного извлечения с алюминия хлоридом со спектром водного извлечения, снятого на фоне экстрагента, заметен небольшой гипохромный сдвиг, что свидетельствует о вкладе в характер кривой поглощения комплекса фенольных соединений.

Также анализировали дифференциальные абсорбционные спектры комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом. В мерную колбу

вместимостью 25 мл переносили аликвоту настоя, равной 10 мл, приливали 10 мл 2% этанольного раствора алюминия хлорида, добавляли 0,5 мл разведенной кислоты уксусной и доводили до метки спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали смесь 10 мл извлечения, 10 мл раствора 96% спирта этилового и 0,5 мл разведенной кислоты уксусной, доведенную до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Зависимость эффективности экстракции флавоноидов от pH изучалась на примере настоев сырья мелиссы, чабреца, мяты перечной, душицы и шалфея лекарственного. Полученные абсорбционные спектры на примере травы душицы представлены на рис.88.

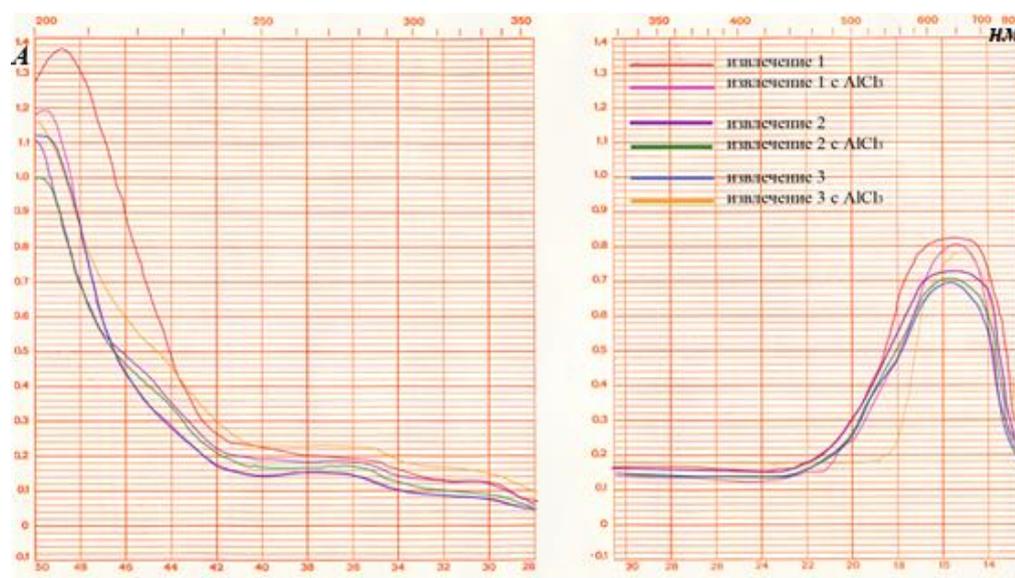


Рис.88. Спектры поглощения настоев травы душицы (разведение 1:250): *извлечение 1* – настой, приготовленный на буферном растворе с $pH=1,68$; *извлечение 2* – настой, приготовленный на буферном растворе с $pH=6,86$; *извлечение 3* - настой, приготовленный на буферном растворе с $pH=9,18$.

При сравнении абсорбционных спектров настоев в отсутствие и присутствии алюминия хлорида, заметно различие как в значениях оптической плотности, так и небольшой гипохромный сдвиг в присутствии алюминия хлорида.

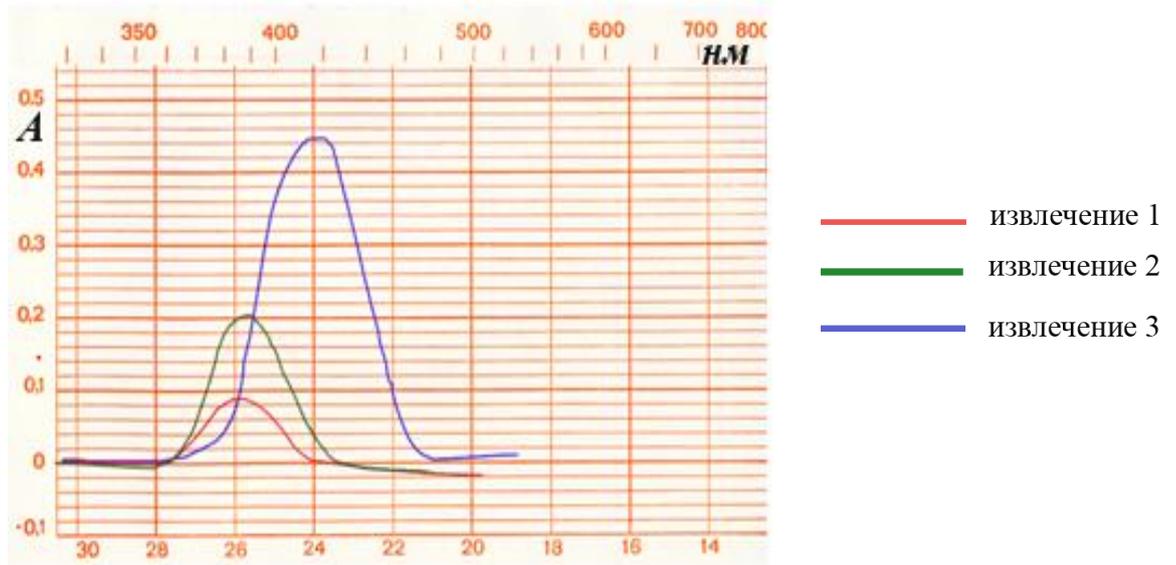


Рис.89. Спектры поглощения комплексов флавоноидов настоев травы душицы с алюминия хлоридом (разведение 1:13)

Данный факт свидетельствует о значительном вкладе фенольных соединений в абсорбционный спектр. Дифференциальные спектры поглощения флавоноидов с алюминия хлоридом представлены на рисунке 89.

Из представленных спектров очевидно, что наиболее эффективная экстракция флавоноидов травы душицы происходит в щелочной среде, наименее существенна - в кислый буферный раствор.

Влияние значения рН на переход суммы флавоноидов в настои на примере травы чабреца представлены на рис. 90.

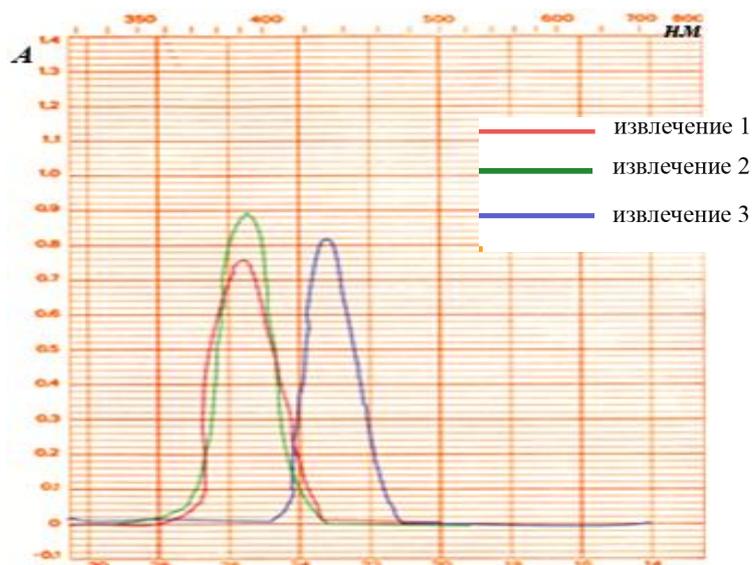


Рис.90. Спектры поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом настоев травы чабреца.

Полученные данные подтверждают, что наиболее эффективно экстракция флавоноидов травы чабреца происходит при $pH=6,86$.

Как видно из дифференциальных спектров поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом, при анализе извлечений со щелочной реакцией среды наблюдается сдвиг максимума поглощения в сторону более длинных волн. Для выяснения причины этого явления, был проведен модельный опыт на примере рутина. Точные навески рутина массой по 0,01 г помещали в колбы и растворяли в 100 мл буферных растворов, нагретых до кипения, со следующими значениями pH : 1,68; 9,18; 6,86. Затем получали комплекс рутина с алюминия хлоридом и через 30 минут снимали спектры поглощения. Спектры поглощения комплексов рутина с алюминия хлоридом при разных значениях pH растворителя представлены на рисунке 91.

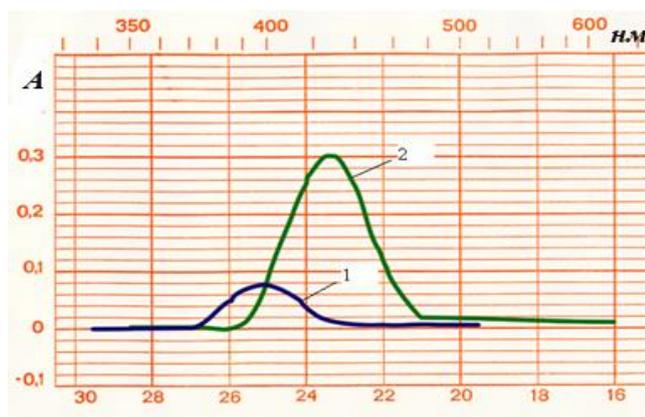


Рис. 91. Спектры поглощения комплексов рутина с алюминия хлоридом при разных значениях рН: *спектр 1 – раствор рутина в буфере с рН=6,86, спектр 2- раствор рутина с рН=9,18.*

Максимум поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом в кислой среде не наблюдался, что подтверждает весьма малую растворимость рутина в кислой среде. Наибольшее количество рутина обнаружено в растворе с рН равным 9,18. Примечательно наличие сдвига, аналогичного обнаруженному при анализе флавоноидов в настоях, в длинноволновую область по сравнению с нейтральной средой. Обнаруженные закономерности дают возможность предположить, что химическая форма флавоноидов зависит от рН среды, что оказывает влияние на спектральные характеристики. Это следует учитывать при разработке методик дифференциальной спектрофотометрии при стандартизации ЛРС по сумме флавоноидов. При добавлении кислоты в анализируемый раствор, нужно аналогично поступать и с раствором сравнения, и с раствором, содержащим стандартный образец. В противном случае могут возникнуть значительные расхождения в значениях длин волн, соответствующих максимумам поглощения.

В связи с выявленной корреляцией между эффективностью экстракции флавоноидов и рН экстрагента эта зависимость была рассмотрена в более широком диапазоне рН. Содержание суммы флавоноидов в настоях объектов исследования в зависимости от рН представлено на рисунке 92.

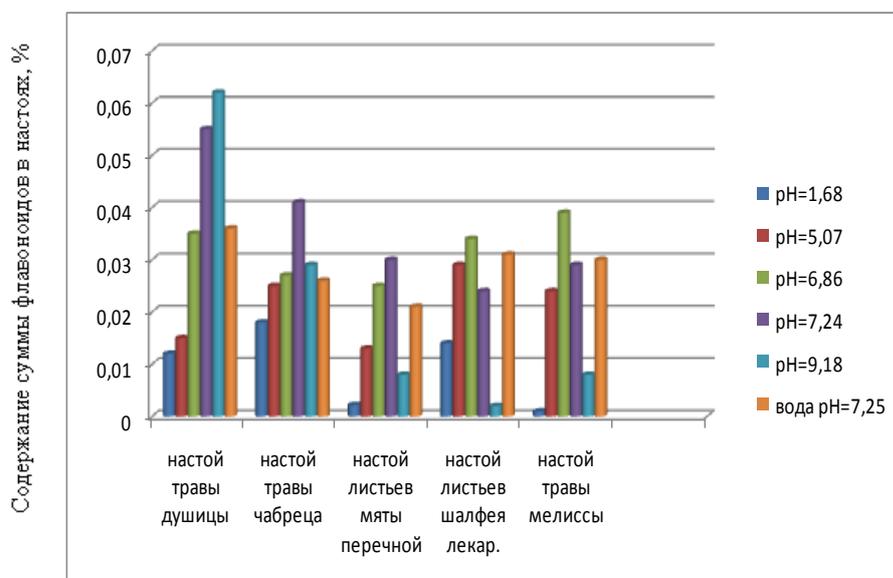


Рис. 92. Содержание суммы флавоноидов в настоях при различных значениях рН в пересчете на рутин.

Полученные данные показывают, что эффективность экстракции флавоноидов травы душицы возрастает с увеличением рН.

Эффективность экстракции флавоноидов травы чабреца и листьев мяты перечной носит экстремальный характер. Наилучшим образом они экстрагируются в буферный раствор с рН=7,24, затем выход флавоноидов снижается. В случае настоев травы мелиссы и листьев шалфея лекарственного наибольшее количество флавоноидов обнаруживаются при экстракции буферным раствором с рН=6,86. При более щелочных значениях рН среды эффективность экстракции снижается.

Для проверки идентичности состава экстрагируемых веществ из ЛРС в буферные растворы и воду, были получены спектры поглощения настоев при всех указанных в таблице значениях рН, а также при использовании в качестве экстрагента воды. На рисунке 93 представлены абсорбционные спектры настоев чабреца. Спектры настоев, приготовленных на воде и с использованием буферных растворов практически идентичны по положению максимумов поглощения, но разнятся по величине оптических плотностей. Этот факт свидетельствует о том, что вещества, извлекаемые в различные

экстрагенты одинаковы, различается только эффективность экстракции и, возможно, степень ионизации молекул.

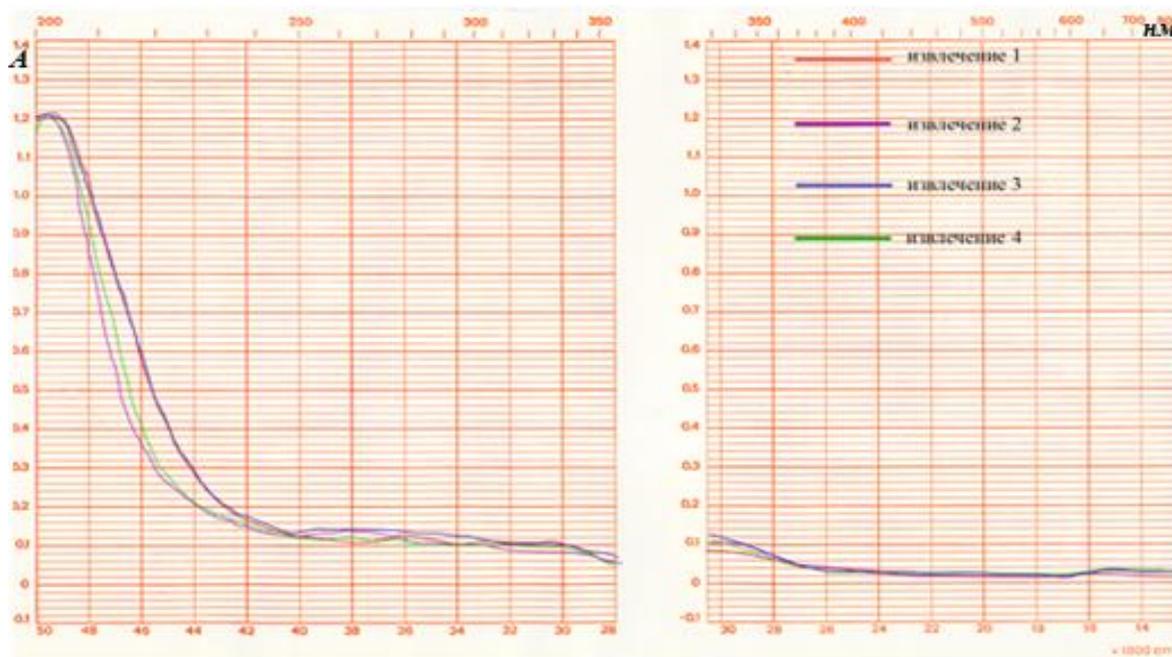


Рис. 93. Спектры поглощения настоев травы чабреца: *извлечение 1* – настой, приготовленный на буферном растворе с $pH=1,68$; *извлечение 2* – настой, приготовленный на буферном растворе с $pH=6,86$; *извлечение 3* – настой, приготовленный на буферном растворе с $pH=9,18$; *извлечение 4* – настой, приготовленный с использованием воды.

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 6:

1. Изучено влияние термического фактора, ультразвука, электромагнитного поля на экстракцию флавоноидов цветков бессмертника. Обнаружено, что влияние термической составляющей на переход флавоноидов существенно (эффективность экстракции флавоноидов без УЗ при комнатной температуре больше, чем при температуре 0-4°C: 0,330 и 0,078% соответственно). Однако и вклад ультразвуковой составляющей экстракции немало значим.
3. При сравнении обзорных спектров УЗ извлечения при температуре 30°C и 0-4 °C можно отметить схожие максимумы и минимумы поглощения, что позволяет предположить идентичный качественный состав экстрактов.
4. Длины волн, при которых наблюдается максимум поглощения, укладываются в интервал 409 ± 2 нм для спектров всех извлечений, что

говорит о том, что экстрагируются одни и те же соединения. При тестируемых условиях претерпеваемые изменения (если таковые вообще имеются), минимальны.

5. Проведено систематическое изучение влияния постоянного и переменного электрического напряжения на эффективность экстракции флавоноидов и дубильных веществ. Установлено, что оптимальной частотой для экстракции флавоноидов является $3 \cdot 10^3$ Гц напряжением 5В, для дубильных веществ использование постоянного тока при напряжении 9В.
6. Показана принципиальная возможность отдельной экстракции флавоноидов и дубильных веществ под действием электрического напряжения. Подобраны параметры, обеспечивающие возможность отдельной экстракции перечисленных БАС.
7. Изучено влияние на рН экстрагента на процесс экстракции флавоноидов в настои. Показано, что флавоноиды травы чабреца и листьев мяты перечной лучше переходят в экстрагент с рН=7,24; флавоноиды листьев шалфея лекарственного и травы мелиссы – в экстрагент с рН=6,86. Флавоноиды травы душицы более эффективно экстрагируются в раствор с рН=9,18.

ОБЩИЕ 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 nipponской, 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 потенциометрического титрования в анализе сырья, содержащем как большие, так и малые количества дубильных веществ. Методики потенциометрического 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 потенциометрического 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 потенциометрического 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 потенциометрического 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования

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.

Показана возможность применения прямой потенциометрии и потенциометрического титрования для количественного анализа БАС ЛРС. Разработаны и валидированы методики определения дубильных веществ и органических кислот методом потенциометрического титрования. Методика апробирована на 30 видах сырья и 45 лекарственных растительных препаратах. Разработаны методики определения кальция и магния методом индикаторного титрования и прямой потенциометрии.

Предложен алгоритм разработки методик спектрофотометрического анализа лекарственного растительного сырья, который реализован при разработке методик спектрофотометрического определения флавоноидов для 5 видов лекарственного растительного сырья 5 жидких лекарственных форм, препарата «Доппельгерц Нервотоник». Усовершенствована методика спектрофотометрического определения антраценпроизводных в коре крушины и противогеморроидальном сборе.

Проведено системное изучение влияния электрического напряжения различных частот на экстракцию дубильных веществ и флавоноидов. Установлены условия отдельного выделения дубильных веществ и флавоноидов.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулина, С.Г. Новые аспекты применения гальваностатической кулонометрии в фармацевтическом анализе: автореф. дисс. на соиск. учен. степ. док. фарм. наук. – 2012. – С. 12 - 13.
2. Абдуллин, И.Ф. Кулонометрическая оценка антиоксидантной способности экстрактов чая электрогенерированным бромом / И.Ф. Абдуллин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников // Журнал аналитической химии. - 2001. - №6 - С. 627 - 629.
3. Абдуллина, С.Г. Валидационная оценка методики анализа кислоты никотиновой / С.Г. Абдуллина, О.А. Лира, Г.К. Зиятдинова // Фармация. - 2008. - №8. - С. 11 - 13.
4. Абдуллина, С.Г. Валидация методики определения содержания органических кислот в препарате «Холосас» / С.Г. Абдуллина, Н.М.Агапова, Р.Ш.Хазиев [и др.] // Фармация. - 2009. - №.8 - С. 28 - 30.
5. Гальваностатическая кулонометрия в анализе карбоновых кислот / С.Г. Абдуллина, О.А. Лира, Г.К. Зиятдинова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2009. - №6. - С. 87 - 90.
6. Абдуллина, С.Г. Определние органических кислот в плодах рябины обыкновенной / С.Г.Абдуллина, Н.М.Агапова, Р.Ш.Хазиев, С.А.Сидуллина // Фармация. -2011- №11. - С. 17- 19.
7. Авдеева, Е.В. Изучение некоторых фенольных и тритерпеновых соединений, используемых в стандартизации лекарственных растений: дисс. канд. фарм. наук. / Е. В. Авдеева. – Самара, 1996.-159 с.
8. Аврач, А.С. Анализ плодов боярышника, подвергнутых консервированию различными способами, и их водных экстрактов / А. С. Аврач // Приложение к журналу «Сеченовский вестник»: тезисы итоговой всероссийской научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день». – М., 2011. – С.27.

9. Аврач, А. С. Изучение биологически активных веществ плодов боярышника – как сырья для приготовления настоек матричных гомеопатических / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // Сборник материалов XXIV Московской международной гомеопатической конференции «Развитие гомеопатического метода в современной медицине». – М., 2014. – С. 146 – 147.
10. Азарян, Р.А. К вопросу стандартизации травы зверобоя продырявленного / Р.А. Азарян // Фармация. – 1985.- №5. - С. 18-21.
11. Аксенова, Э. Н. Фармацевтический анализ препаратов из группы водорастворимых витаминов современными физико-химическими методами: автореф. дис. канд. фарм. наук. / Э. Н. Аксенова. - М., 1969. - 23с.
12. Аладышева, Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляев, В.А. Береговых // Фармация. - 2008. - №7. - С.9-13.
13. Аносова, О.Г. Совершенствование анализа и технологии настоев и отваров, содержащих флавоноиды / О.Г. Аносова, М.В. Колпакова, Н.И. Манникова [и др.] // Фармация. – 1994. - № 1. – С. 30 - 34.
14. Апрелькова, Н.Ф. Вольтамперометрическое исследование морины/ Н.Ф. Апрелькова, Д.А. Матвеев, Е.А. Арбузова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2010. - №4. – С. 83-86.
15. Арзамасцев, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. -2006. - №4. -С. 8-12.
16. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. М.: Наука, 1965. -176 с.
17. Балабудкин М.А. Роторно-пульсационные аппараты в химико-фармацевтической промышленности. –М.: Медицина, 1983.- 160 с.

18. Баева, В.М. Изучение полифенольного состава водных извлечений травы некоторых видов манжетки / В.М. Баева, А.М. Можайский // Фармация. – 2001. - №5. – С. 25 - 26.
19. Баландина, И.А. Лекарственные растения: справочное пособие / И.А. Баландина, Н.И. Гринкевич, В.А. Ермакова. – М.: Высшая школа, 1991. – С. 152 – 164.
20. Биологически активные вещества растительного происхождения: в 3-х т. / Под ред. Б.Н. Головкина. – М.: Наука, 2001. – Т 1. – 368 с.
21. Буланкин, Д.Г. Определение флавоноидов в сырье и препаратах гинкго двулопастного / Д.Г. Буланкин, В.А. Куркин // Фармация. – 2011. – Т. 59. – №2. – С. 12-14.
22. Бандюкова, В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды / В.А. Бандюкова // Химия природных соединений. - 1983. - № 3. - С. 263 - 273.
23. Бандюкова, В.А. Изучение кинетики экстракции флавоноидов из растительного сырья / В.А. Бандюкова, Л.В. Лигай // Химия природных соединений. - 1987.- №5. - С.665-667.
24. Бандюкова, В.А. Исследование химии флавоноидных соединений и закономерности их распределения в растениях: автореф. дисс. д-ра биол. наук / В.А. Бандюкова. – Ереван, 1975. – 41 с.
25. 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.
26. Баурин, П.В. Разработка метода холодной водной экстракции дубильных веществ и других БАС из лекарственного растительного сырья / П.В. Баурин, А.А. Коничев, Н.Н. Федоровский [и др.] // Первая Российская конференция по медицинской химии с международным участием: материалы конференции - М., 2013. - С. 201.

27. Беликов, В.В. Количественное определение основных действующих веществ у видов *Nuregicum* L. / В.В. Беликов, Т.В. Точкова, Л.В. Шатунова, Н.Т. Колесник, И.И. Баяндина // Растительные ресурсы. - 1990. - Т. 26, вып. 4. - С. 571-578.
28. Беликов, В.В. Унифицированная методика определения флавоноидов для стандартизации фитохимических препаратов / В.В. Беликов // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока: тезисы Всесоюзной конференции. – Томск, 1989.- С. 21-22.
29. Березовская, Н.Н. Влияние биофлавоноидов на ферментативное окисление аскорбиновой кислоты и адреналина в животных тканях / Н.Н. Березовская // Биохимия. - 1964. - Т.29. - №1. - С. 30.
30. Биохимия природных соединений / под ред. Дж. Харборна. – М.: «МИР», 1968. – 532 с.
31. Блинова, О.Л. Разработка рациональных методик идентификации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов подземных органов: автореф. дисс. канд. фарм. наук / О.Л. Блинова. – Пермь, 2000. - 15 с.
32. Болтабекова, З.В. Фармакогностическое исследование по стандартизации новых лекарственных средств на основе травы мелиссы лекарственной: дисс. канд. фарм. наук / З.В. Болтабекова. - М., 2003. – 122 с.
33. Борщевский, Г.И. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения суммарных препаратов в варианте калибровочного графика / Г.И. Борщевский, А.И. Гризодуб, В.Л. Шевина // Фармаком. – 2013. - № 3. – С.24-33.
34. Браиловская, В.А. Фотоколориметрическое определение арбутина в листьях толокнянки / В.А. Браиловская, Г.И. Лукьянчикова // Фармация. - 1972. -№3.-С. 31-33.

35. Браславский, В.Б. Стандартизация сырья и препаратов тополя и прополиса / В.Б. Браславский, В.А. Куркин // Фармация. – 2009. – Т. 57, № 4. – С. 53 – 56.
36. Будников, Г.К. Определение некоторых жирорастворимых антиоксидантов методами кулонометрии и вольтамперометрии / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова, Д.М. Гильметдинова // Журнал аналитической химии. -2004. - Т.59. - С. 736 - 741.
37. Будников, Г.К. Основы современного электрохимического анализа / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев // Лаборатория знаний. - М: Бином, 2003. – 592 с.
38. Булатов, М.И. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин.- 2-е изд., перераб. и доп. -Л.: Химия, Ленингр. отд., 1968. - 384с.
39. Валидация аналитических методик: ОФС 42-0113-09.
40. Васильев, Г.В. Фенолкарбоновые кислоты / Г.В. Васильев // Химия природных соединений. – 2008. - №5 – С. 512 - 513.
41. Васильева, А.П. Изучение динамики содержания дубильных веществ в отваре коры дуба при хранении / А.П. Васильева // Молодёжный инновационный вестник. - 2012. - Т. 1, №1. - С. 199 - 200.
42. Вишневский, О.В. К вопросу разработки методов определения качества настоев и отваров в условиях межбольничных аптек / О.В. Вишневский, Н.Л. Флейн, Д.В. Прошунина // Тезисы докладов 5-го съезда фармацевтов БССР. - Ч. 1. – Минск, 1989. - С. 188 - 189.
43. ВФС 42-3472-99. Сироп калины / Фармакопейный государственный комитет. введ. 08.10.99. - М., 1999. - 4 с.
44. Выделение и анализ природных биологически активных соединений / Е.А. Краснов [и др.] - Томск: изд-во ТГУ, 1987. – 184 с.

45. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. – Новосибирск: «Наука», 1990. – 333 с.
46. Герасимов, В.Б. Вопросы стандартизации контроля качества лекарственных средств / В.Б. Герасимов, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990.- 328 с.
47. Гершгал, Д.А. Ультразвуковая аппаратура / Д.А. Гершгал, В.М. Фридман. М.: Энергия, 1967. - 300 с.
48. Гордиенко, А.Д. Антиокислительные свойства природных фенолов / А.Д. Гордиенко, Н.Ф. Комиссаренко, В.В. Левченко, [и др.] // Тезисы докладов V всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. - Таллин, 1987. - С. 32 - 34.
49. ГОСТ 6714-74. Плоды рябины обыкновенной. [Текст]. – Введ. 1975 – 07 – 01. – М.: Изд-во стандартов, 1975. – 3 с.
50. Государственная фармакопея Российской Федерации // МЗиСР РФ. - 12-е изд. - М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008.
51. Государственная фармакопея СССР.- 10-е изд. – М.: Медицина, 1968.- 1078с.
52. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., вып. 1,2 – М.: Медицина, 1987, 1990 - 336 с., 400 с.
53. Государственный реестр лекарственных средств. – Т. 1. Официальное издание. – М.: Ремедиум, 2008. – 1398 с.
54. Гризодуб, А.И. Особенности фармакопейных подходов к количественному определению лекарственного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов / А.И. Гризодуб, О.А. Евтифеева, К.И. Проскурина // Фармаком. – 2012. - № 3. – С. 7-30.
55. Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения / Н.И. Гринкевич. М.: Высш. шк., 1991. - 225 с.

56. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. - М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
57. Гринько, Е.Н. Требования Российской и Европейской Фармакопеи к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н.Гринько // Фармация. - 2010. - №5. - С. 49 - 53.
58. Губен-Вейль. Методы органической химии. - М.: Химия / Губен-Вейль, 1967. - 416 с.
59. Данилова, Н.А. Количественное определение дубильных веществ щавеля конского методом спектрофотометрии в сравнении с методом перманганатометрии / Н.А. Данилова, Д.М. Попов // Вестник ВГУ. - 2004. - №2. - С. 179 - 182.
60. Дэгли, С. Метаболические пути / С. Дэгли, Д. Никольсон; пер. с англ. М.: Мир, 1973. С. 145 - 147.
61. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки / О.В. Евдокимова // Традиционная медицина. – 2011. – №1 (24). – С. 50–53.
62. Евдокимова, О.В. Получение водных извлечений из фасованного ЛРС / О.В. Евдокимова// Российские аптеки. -2003.-№10. - С.57-58.
63. Евдокимова, О.В. Разработка показателей качества для биологически активных добавок к пище в виде фиточаев / О.В. Евдокимова, Е.В. Яковлева, М.В. Кашникова // Материалы IX Международного съезда "Фитофарм 2005" и конференции молодых ученых Европейского Фитохимического Общества "Растение и Здоровье".- Санкт-Петербург, 22-25 июня 2005 г.- СПб: НИИХ СПбГУ, 2005. - С.325-327.
64. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях крапивы / О.В. Евдокимова, П.А. Стряпушкин, М.В. Кашникова // Материалы X Международного съезда "Фитофарм 2006", Санкт-Петербург, 27-30 июня 2006 г. СПб: НИИХ СПбГУ, 2006: 574.- С.71-75

65. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве душицы/ О.В. Евдокимова // Материалы научной программы XIII Международной специализированной выставки "Аптека 2006".- Москва.- 2006. - С. 35-37.
66. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного содержания свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в плодах рябины / О.В. Евдокимова // Достижения, проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики: Материалы региональной научно-практической конференции, посвященной 40-летию фармацевтического факультета КГМУ/ Под ред. А.И.Лазарева.- Курск: КГМУ, 2006.- 496 с. - С.205-207.
67. Евдокимова, О.В. Разработка ФС "Крапивы листья" для Государственной Фармакопеи XII издания / О.В.Евдокимова, П.А. Стяпушкин // Матер. XIV Росс.нац. конгресса "Человек и лекарство", Москва, 2007. - С.820.
68. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках ноготков / О.В. Евдокимова // Матер. XV Росс.нац. конгресса "Человек и лекарство", Москва, 2008. - С.537.
69. Ермаков, А.И. Определение суммарного содержания дубильных веществ. Методы биологического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В.Арасимович. Л.: Агропромиздат, 1987. 456с.
70. Жукова, О.Л. Фитохимическое изучение сабельника болотного, сухого экстракта на его основе и их стандартизация: автореф. дисс. канд. фарм. наук / О.Л. Жукова - М., - 2007.
71. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения / М.Н. Запрометов. М.: Наука, 1996. -46 с.

72. Запрометов, С.В. Выделение и анализ природных БАВ / С.В. Запрометов, Е.Е. Сироткина, Е.А. Краснов. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1987. – 184с.
73. Захаров, В.П. Лекарственные вещества из растений и способы их производства / В.П. Захаров, И.И. Либизов, Х.А. Асланов. -Ташкент: Изд-во ФАН, 1980.- 452 с.
74. Зеликсон, Ю.И. Изготовление настоев и отваров / Ю.И. Зеликсон, Т.С. Кондратьев // Фармация. - 1997. - Т. 46. - № 6. - С. 42 - 43.
75. Избранные лекции по фармакогнозии: учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов / под ред. Г.И. Олешко. - Изд. 3-е, переработ. и доп. – Пермь, 2006. - 305 с.
76. Исламбеков, Ш.Ю. Растительные дубильные вещества / Ш.Ю. Исламбеков, С.М. Каримджанов, А.К. Мавлянов // Химия природных соединений. -1990. - №3. - С. 29 - 30.
77. Кавторадзе, Н.Ш. Химические компоненты *Urticadioica*, произрастающей в Грузии / Н.Ш. Кавторадзе, М.Д. Алания, Дж. Н. Анем // Химия природных соединений. – 2001. - № 3. – С. 244.
78. Казуб, В.Т. Кинетика и основы аппаратурного оформления процессов электроразрядного экстрагирования биологически активных соединений: дис. д-ра техн. наук: 05.17.08 / В.Т. Казуб; Пятигорская гос. фарм. акад. - Пятигорск., 2002. - 345 с.
79. Кемертелидзе, Э.П. Количественное определение танина / Э.П. Кемертелидзе, П.А. Явич, А.Г. Сарабунович // Фармация. - 1984. - №4. - С.34 - 37.
80. Киселева, Т. А. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах боярышника / Т. А. Киселева, И. А. Самылина // Фармация. – 1987. – Т. 36, №5. – С. 30 – 32.
81. Кемертелидзе, Э.П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения / Э.П.

- Кемертелидзе, В.П. Георгиевский. Тбилиси: Мецниереба, 1976.- С. 224 -227.
82. Л.Г. Ковалева, А.М. Сампиев. Исследование фенольных соединений плодов софоры японской // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. URL: www.science-education.ru/113-10791 (дата обращения: 30.06.2014).
83. Ковалева, Т.Ю. Изучение биологически – активных веществ урологического сбора / Т.Ю. Ковалева, И.А. Самылина, А.А. Сорокина [и др.] // Тезисы докладов 8-го Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - М., 2001. - С. 330.
84. Ковалева, Т.Ю. Совершенствование методов контроля качества листьев толокнянки обыкновенной и лекарственных препаратов на ее основе./ Т.Ю. Ковалева, И.А. Самылина, В.А. Ермакова // Традиционная медицина. – 2012. - № 5. – С. 241 - 243.
85. Ковалева, Т.Ю. Требования отечественной и зарубежных фармакопей по стандартизации листьев толокнянки обыкновенной / Т.Ю. Ковалева // Фармация. – 2011. - № 5. – С. 53 – 56.
86. Когет, Т.А. УФ – спектрофотометрические методы анализа некоторых лекарственных средств, производных α - и γ - пирона: автореф. канд. дисс. фарм. наук / Т.А. Когет. - Киев, 1974. -12 с.
87. Куркин, В.А. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* (L.) Moench / В.А. Куркин, Авдеева О.И., Авлеева Е.В [и др.] // Растит. ресурсы. - 1998. - Т. 34. - Вып. 2. - С. 81 - 85.
88. Колпакова, М.В. К вопросу пересмотра фармакопейной статьи «настои и отвары» / М.В. Колпакова, Е.А. Приступа, Д.М. Попов // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: научные труды НИИФ.- Т. XXXVIII. -Ч.1.: М., 1999.- С. 206 - 217.
89. Комисарчук, А.А. Методы идентификации и оптимизации процесса извлечения БАВ в технологии настоев и отваров / А.А. Комисарчук //

- Тезисы докладов 4-го съезда фармацевтов, фармакологов и токсикологов СССР. - 1983. - С. 54 - 55.
90. Коничев, А.С. Традиционные и современные методы экстракции биологически - активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки /А.С. Коничев, Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова [и др.] // Вестник Московского областного университета. –2010. -№5. –С.55-59.
91. Кошечкин, Д.В. Крапива (*Urtica*) / Д.В. Кошечкин // Гомеопатия и фитотерапия. – 1997. - № 2. – С. 50 – 53.
92. Кузьменко, А.Н. Определение карбоновых кислот в лекарственных растениях методом ион-эксклюзивной хроматографии / А.И. Кузьменко, В.А. Попков // Вопросы биологической, медицинской; и фармацевтической химии. - 2007. - №4. - С. 8 - 10.
93. Куркина, А.В. Актуальные вопросы химической стандартизации лекарственных растений, содержащих флавоноиды / А.В. Куркина // Фармация. – 2012. – Т, 60, №7.- С.44-48.
94. Куркина, А.В. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на основе флавоноидов / А.В. Куркина // Традиционная медицина. – 2011. – № 5 (28). - С. 232-239.
95. Куркина, А.В. Актуальные аспекты стандартизации эфиромасличного лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды // Традиционная медицина. - 2010. – № 3 (22). – С. 176-179.
96. Куркина, А.В. Методика определения суммы флавоноидов в цветках пижмы / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // Фармация.- 2010. – №3.- С 21-24.
97. Куркина, А.В. Новые подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды 1. Пижма обыкновенная / А.В. Куркина // 65-я Межрегиональная конференция по фармации и фармакологии«Разработка, исследование и маркетинг

- новой фармацевтической продукции». – Вып. 66.- Пятигорск, 2011.- С. 134-137.
98. Куркина, А.В. Перспективные направления в области стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды / А.В. Куркина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов 67-ой межрегиональной конференции по фармации и фармакологии. – Пятигорск, 2012. - Вып. 67. – С. 60-62.
99. Куркина, А.В. Современная стандартизация как методологическая основа рационального использования ресурсов лекарственных растений, содержащих флавоноиды / А.В. Куркина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.- № 1-9. – Т. 14. – 2012. – С.2253-2256.
100. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные и слабительных препаратов на их основе / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, И.К. Петрухина [и др.] // Фундаментальные исследования. - №2 (7).- 2015. – С.1424-1431.
101. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего фенольные соединения / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, В.Б. Браславский [и др.] // Тезисы докладов XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - М., 2009. - С. 690.
102. Куркин, В.А. Вопросы стандартизации сырья и препаратов зверобоя / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Фармация. - 2007. - № 4. - С. 12-14.
103. Куркин, В.А. Исследование экстрактов прополиса и почек тополя бальзамического методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Г.Г. Запесочная // Журнал физической химии. - 1994. - Т. 68, № 10. - С. 1816 - 1818.

104. Куркин, В.А. Количественное определение суммы антраценпроизводных в лекарственном препарате «Крушины сироп» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал.- Т.48.- №7.- 2014.- С. 41-43.
105. Куркин, В.А. Определение флавоноидов в траве чистотела большого / В.А. Куркин, Е.С. Артамонова // Фармация. - 2007. - № 5. - С. 10-12.
106. Куркин, В.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Лух» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков // Фундаментальные исследования. - №6 (ч.6).- 2014.- 1237-1241.
107. Куркин В.А. Фенилпропаноиды некоторых лекарственных растений и перспективы создания препаратов на их основе // автореф. дис. д-ра фарм. наук / В.А. Куркин. - Москва, 1991. - 45 с.
108. Лекарственные растения государственной фармакопеи / под ред. И. А. Самылиной, В.А. Северцева. М.: Анми, 2003.- 538 с.
109. Лекарственные растительные средства/ под ред. А.П. Арзамасцева, И.А. Самылиной. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. - 288 с.
110. Лекарственные средства: в 2 т.14 изд. / М.Д. Машковский; перераб., испр. и доп. М.: Новая Волна, 2001.- 540 с.
111. Лисовская, С.Б. Изучение флавоноидного состава водного извлечения травы мелиссы лекарственной методом ВЭЖХ / С.Б. Лисовская, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский [и др.] // «Современные вопросы теории и практики лекарствоведения»: тезисы докладов. - Ярославль, 2007. - С. 191 - 193.
112. 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.

113. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. — М.: Химия, 1971. - 367 с.
114. Киселева, Т. А. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах боярышника / Т. А. Киселева, И. А. Самылина // Фармация. — 1987. — Т. 36, №5. — С. 30 – 32.
115. Марахова, А.И. Изучение зависимости эффективности экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья от pH / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты». - Самара, 2011. - С. 41 - 45.
116. Марахова, А.И. Изучение флавоноидного состава травы мелиссы лекарственной и ее водных извлечений / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский [и др.] // Тезисы итоговой студенческой конференции с международным участием «Татьянин день». - М., 2008. — С. 37 - 38.
117. Марахова, А.И. Инновационный способ экстракции природных биологически активных соединений / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, И.А. Самылина [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2014. - №4(9). - С. 54 - 57.
118. 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.
119. 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 - 45.

120. Марахова А.И. Применение физико-химических методов в анализе настоев из сырья лекарственных растений семейства Яснотковых: автореф. дис. канд. фарм. наук / А.И.Марахова; Пермская государственная фармацевтическая академия. - Пермь, 2009.
121. Марахова, А.И. Определение флавоноидов травы мелиссы лекарственной / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина // Фармация. - 2007. - №3. - С. 10 - 11.
122. Марахова, А.И. Потенциометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / А.И. Марахова // Фармация. -2013. - №3. - С. 53 - 56.
123. Марахова, А.И. Потенциометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: монография / А.И. Марахова, А.А Сорокина, А.В. Кузнецов, Я.М. Станишевский. - М.: Издательство РУДН, 2015. - 130 с.
124. Марахова, А.И. Разработка методик потенциометрического 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. - Екатеринбург. - 2011. - 3/1. - С. 69-71.
125. Марахова, А.И. Разработка методики потенциометрического определения суммы органических кислот в плодах шиповника / А.И. Марахова, О.А. Супакова, Н.Н. Федоровский [и др.] // Фармация. - №1. - 2013. - С. 24 - 27.
126. 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.

127. Марахова, А.И. Физико–химический анализ фенольных соединений лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова // Фармация. - 2009. - №3. - С. 52 - 55.
128. Маркова, О.М. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения / О.М. Маркова, В.А. Карпенко, А.С. Саушкина, [и др.] // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация.- 2003.- №1.- С. 99 - 100.
129. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. - 14 изд., перераб., испр. и доп. - М.: Новая Волна, 2001. - 540 с/
130. Методика количественного определения суммарного содержания органических кислот в растительном сырье / Д.Н. Олейников [и др.] // Растительные ресурсы. - 2004. - №3. — С. 112.
131. Методологические подходы к использованию спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья [Электронный ресурс] / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, Т.А. Скалзубова [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.
132. Методы количественного определения дубильных веществ / С.М. Мавлянов, Ш.Ю. Исламбеков [и др.] // Структура и функции биологически активных соединений. - Ташкент: Фан, узбекской ССР, 1990. – С. 276 – 281.
133. Минина, С.А. Оптимизация процесса экстрагирования корня женьшеня / С.А. Минина, Л.В. Шигарова, В.А. Вайнштейн // ХФЖ. - 1998. - № 7. - С. 42 - 45.
134. Минина, С.А. Флавоновые гликозиды. Методы выделения, очистки, разделения и анализа / С.А. Минина, Л.Л. Шимонина // Методические разработки. – Ленинград, 1991. – С. 5 - 31.
135. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. -560 с.

136. Михайлова, Е.В. Методы количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.В. Михайлова, А.П. Васильева, Д.М. Мартынова // «Актуальные вопросы современной медицины»: материалы международной заочной научно-практической конференции. — Новосибирск: Изд. «СибАК», 2013. — 176 с.
137. Молчанов Г.И. Ультразвук в фармации. —М: Медицина, 1980.- 176 с.
138. Морохина, С.Л. Флавоноиды седативного сбора «Мевал» / С.Л. Морохина, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Фармация. - №3. - 2011. - С.25-27.
139. Муравьева, Д.А., Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего / Д.А. Муравьева, В.Н. Бубенчикова, В.В. Беликов // Фармакология. 1987. Т.36. С.28-29.
140. Фармацевтические технологии: уч. пособ. / Г.И. Молчанов, М.Л. Кубалова. — 2-е изд. — М.: Альфа-М: ИНФРА. — М, 2013.- 336 с.
141. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / под ред. В.Л. Багировой, В.А. Северцева — СПб.: Спец Лит, 2001. — 223 с.
142. Нго Зиэп, Т.Т. Разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве пустырника спектрофотометрическим методом / Т.Т. Нго Зиэп, Е.В. Жохова // Химия растительного сырья. - 2007. - №4. - С. 73 - 77.
143. Никитина, Л.Е. Физические методы идентификации органических соединений / Л.Е. Никитина, В.В. Племенков. — Казань, 2003. — 92 с.
144. Николаевский, А.Н. Получение антиоксиданта из листьев толокнянки экстракцией под действием постоянного электрического тока / А.Н. Николаевский // Хим.-фарм. журнал. - 2008. - №3. - С. 25 - 27.
145. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Под ред. В.А. Челомбитько. — Пятигорск. — 2007. -136 с.

146. Орлов, В.И. Жидкостная хроматография. Теоретические основы / В.И. Орлов, А.А. Аратсков. Дзержинск: Научно-технологическая компания Синтеко, 1997. 41 с.
147. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / под ред. проф. Береговых В.В. – М.: Издательский дом Русский врач, 2005. – С. 73–97.
148. Отраслевой стандарт. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. 91500.05.001-00. М., 2000.
149. Охрименко, Л.П. Исследование фенольных соединений листьев голубики, брусники, черники, и зимолубки, произрастающих в республики Саха (Якутия) / Л.П. Охрименко, Г.И. Калинкина, С.Е. Дмитрук [и др.] // Химия растительного сырья. 2009: - №3. - С. 109 - 115.
150. Пантюхина, Е.В. Исследования по выбору оптимальных условий экстрагирования биологически активных веществ из травы донника лекарственного / Е.В. Пантюхина [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия химия, биология, фармация.- 2006. – №42.- С.313-345.
151. Применение акустических колебаний в химико-технологических процессах / Б.Г. Новицкий. М.: Химия, 1983. - 192 с.
152. Попов, Д.М. Контроль качества сырья и препаратов пустырника спектрофотометрическим методом / Д.М. Попов, Е.В. Пашинская, Л.И. Коваленко // Фармация. - 1992. - № 4. - С. 27-31.
153. Попов, И.В. Определение танина в сырье и препаратах кровохлебки лекарственной методом ВЭЖХ / И.В.Попов, И.Н.Андреева, М.В.Гаврилин // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. - Том 37. - №7. - С. 24 - 26.
154. Потанина, О.Г. К вопросу совершенствования стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него / О.Г. Потанина, И.А. Самылина //

- Материалы V Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». СПб., 2001. - С. 357 - 360.
155. Практикум по физико-химическим методам анализа: учебное пособие / под ред. О.М. Петрухина.- М., 2006. - 225 с.
156. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Браузе. М.: Химия, 1968. - 312 с.
157. Приказ № 308 МЗ РФ от 21.10.97. «Об утверждении инструкции по изготовлению в аптеке жидких лекарственных форм».
158. Пронченко, Г. Е. Лекарственные растительные средства / под ред. А.П. Арзамасцева, И.А. Самылиной. М: ГЭОТАР – МЕД, 2002. - 171 с.
159. Редико Е.Э. Анализ и стандартизация полифенольного комплекса листьев и плодов черной смородины / дисс. канд. фарм. наук. – 15.00.02. Москва, 2009. – 133 с.
160. Розенблюм, Ю.Н. Изучение химического состава веществ, выделенных из рябины / Ю.Н. Розенблюм, Л.А. Левина // Мед. промышленность СССР. - 1948. №1. С. 26 - 28.
161. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н.В. Юргеля. – М., 2007. – 48 с.
162. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н.В. Юргеля - М., 2007. - 48 с.
163. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство. Р4.1.1672-03.- М. - 2004 г. - С. 94-95.
164. Рыжов, В.М. Исследование возможности вторичной переработки шрота травы тимьяна ползучего как отхода производства лекарственного препарата «Пертуссин» / В.М.Рыжов, В.А.Куркин, Е.В.Степанова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - Т. 14. - 2012. - №1(9). - С. 2285 - 2287.

165. Рябина, Е.И. Потенциометрическое определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.И. Рябина, Е.Е. Зотова, Н.И. Пономарева // Фармация. - 2012. - № 2. - С. 8 - 10.
166. Рябина, Е.И. Сравнение химико-аналитических методов определения танинов и антиоксидантной активности растительного сырья / Е.И. Рябина // Аналитика и контроль. - 2011. - Т.15. №2. - С. 202 - 204.
167. Сальникова, Е.Н. Совершенствование метода стандартизации плодов рябины обыкновенной / Е.Н. Сальникова, Г.И. Калинкина, Тайй Тахири Хатим // Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности. Материалы международной научной конференции. — Томск, 2000. — С. 56 - 58.
168. Самылина, И.А. Исследования по разработке фармакопейного метода определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / И.А. Самылина, Н.П. Антонова, И.П. Рудакова // Фармация. - 2009. - №6. С. 3 - 6.
169. Самылина, И.А. Разработка методов сквозной стандартизации количественного определения суммы флавоноидов в листе малины и в сухом экстракте листа малины / И.А. Самылина, Т.А. Сокольская, В.Н. Давыдова[и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2011. - № 5. - С.4-5.
170. Самылина, И. А. Стандартизация свежего растительного сырья / И. А. Самылина, Т. Л. Киселева // Фармация. - 2007. - № 1. - С. 49 – 51.
171. Самылина, И.А. Лекарственное растительное сырье, проблемы стандартизации / И.А. Самылина // Тезисы докладов Медико-фармацевтического Форума. - М., 2002. - С. 133 - 134.
172. Самылина, И.А. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств / И.А. Самылина // Традиционная медицина и питание: теоретические и

- практические аспекты: материалы I Международного научного конгресса. – М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ, 1994. – С. 254.
173. Сафар, А.С. Флавоноиды как потенциальные противоаллергические соединения / А.С. Сафар, Э.Г. Оганесян // Хим.-фарм. журнал. – 1991. - №2. - С. 4 - 8.
174. Сергунова, Е.В. Исследования по стандартизации плодов шиповника и лекарственных форм на его основе: автореф. дис. на соиск. учен. степ. доцента фарм. наук / Е.В. Сергунова. М., 2002. 56 с.
175. 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.
176. Сергунова, Е.В. Разработка метода потенциометрического титрования суммы органических кислот в плодах шиповника / Е.В. Сергунова, А.И. Марахова, О.А. Супакова //Материалы Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием: «Химическая наука: современные достижения и историческая перспектива». - Казань, 2014. - С. 208 - 211.
177. Синютина, С. Е. Экстракция флавоноидов из лекарственного растительного сырья и изучение их антиоксидантных свойств / С. Е. Синютина, С. В. Романцова, В. Ю. Савельева // Вестник ТГУ. – 2011. – Т.16, вып.1. – С. 345 – 347.
178. Скалозубова, Т.А. Изучение гомеопатических лекарственных форм крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Материалы научн. конференции «Фармообразование-2013». - Воронеж, 2013. - С. 410 - 413.
179. Скалозубова, Т.А. Изучение фенольных соединений листьев крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А.Сорокина // Прикладная аналитическая химия. - 2011. - Т.2. - № 5. - С. 20 - 24.

180. 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». – Пятигорск, 2011. - Вып. 66. - С. 179 - 181.
181. 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 - 230.
182. 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.
183. Скалозубова, Т.А. Титриметрический метод определения биологически активных веществ листьев и настоя крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Малахова, А.А. Сорокина // Прикладная аналитическая химия. - №1. - Т.1. - 2010.
184. Современная органическая химия / Терней А.Н. - М.: Мир, 1981. - Т.1. 873.- С.89.
185. Сорокина А.А. Сравнительный анализ качества настоев из растительного сырья, резанного и фасованного в фильтр-пакеты / А.А. Сорокина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы четвертого международного съезда: сборник научных трудов. – Великий Новгород, 2000.- С. 320 - 322.
186. Сорокина, А.А. Использование спектрофотометрии в анализе промышленных образцов лекарственного растительного сырья / А.А. Сорокина, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский [и др.] // Фармация. - №4. - 2012. - С. 43 - 45.

187. Сорокина, А.А. Изучение вопросов стандартизации водных извлечений / А.А. Сорокина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы II Международного съезда: сборник научных трудов. СПб., 1998. С. 34 - 38.
188. Сорокина, А.А. Изучение вопросов стандартизации водных извлечений / А.А. Сорокина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. Материалы II Международного съезда: сб. науч. тр.- СПб., 1998. - С. 34 - 38.
189. Сорокина, А.А. Изучение физико-химических характеристик настоев и отваров из лекарственного растительного сырья / А.А. Сорокина, И.А. Самылина // Фармация на современном этапе: Труды НИИФ.- Т. XXXIX. -Ч. 2. -М., 2000.- С. 272 - 275.
190. Сорокина, А.А. Определение кальция и магния в листьях и настое крапивы двудомной / А.А. Сорокина, Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова // Фармация. - 2013. - № 2. - С. 5 - 8.
191. 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.
192. Сорокина, А.А. Содержание дубильных веществ в двух видах диоскореи / А.А. Сорокина, Бу Вэй, А.И. Марахова // Фармация. - 2014. - № 1. - С. 14-16.
193. Сорокина, А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев и отваров и сухих экстрактов из ЛРС: дисс. д-ра фарм. наук. / А.А. Сорокина. – М., 2002. – 236 с.
194. 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.: Издательство РУДН, 2015. - 156 с.

195. Спектрофотометрия в анализе сборов [Электронный ресурс] / А.И. Марахова [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.
196. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений / под ред. М.М. Окунцева. Калининград, 1981. - 44 с.
197. Способ количественного определения кальция в жидких экстрактах из лекарственного растительного сырья: пат. 2488818 РФ: МПК G01N33/15 / Марахова А.И. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ; заявл. 28.04.2012; опубл. 27.07.2013.– 4 с.
198. Способ количественного определения кальция и магния в лекарственном растительном сырье: пат. 2466387 РФ: МПК G01N31/16 / Скалозубова Т.А., Марахова А.И., Федоровский Н.Н.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ. – заявл.18.10.2011; опубл. 10.11.2012. – 3 с.
199. Способ количественного определения содержания кальция в жидких экстрактах из лекарственного растительного сырья: пат. RU 2488818 С1: МПК G01N33/15 / Марахова А.И. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ. - № 2012117691/15; заявл. 28.04.2012; опубл. 27.07.2013.- 4 с.
200. Способ кулонометрического определения содержания дубильных веществ в растительном сырье: пат. 2436084 РФ: МПК G01N 33/15 / Абдуллина С.Г. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВО Казанский государственный медицинский университет МЗ РФ. - № 2010113440/15; заявл. 06.04.2010, опубл. 10.12.2011.- 5 с.
201. Способ получения средства, обладающего противоатеросклеротическим, антилитогенным, кардиотоническим, антиаллергическим и иммуномодулирующим действием: пат. 2036657 РФ: А61К35/78 / Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян; заявитель и

- патентообладатель Э.Т. Оганесян, А.В. Симонян. - № 5062008/14; заявл. 11.09.1992; опубл. 09.06.1995.
202. Способ отдельного выделения дубильных веществ и флавоноидов из лекарственного растительного сырья: пат. 2522227 РФ: МПК А61К36/00, В01D11/02 / Марахова А.И. [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; заявл. 28.03.2013; опубл. 10.07.2014; заявл. 28.03.2013; опубл. 10.07.2014. – 5 с.
203. Способ отдельного определения танина и катехинов (в пересчете на галловую кислоту) в чае: пат. 2127878 РФ: МПК G01N 31/16 / Коренман Я.И.; Новикова Н.А.; Нифталиев С.И.; заявитель и патентообладатель Воронежская государственная технологическая академия. - № 97116058/04; заявл. 30.09.1997, опубл. 20.03.1997.
204. Способ холодной водной экстракции флавоноидов из лекарственного растительного сырья: пат. 2453322 РФ: МПК А61К36/00, В01D11/02 / Федоровский Н.Н., Марахова А.И., Сорокина А.А.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ. – заявл.03.12.2010; опубл. 20.06.2012. - 5 с.
205. Съедин А.В. Фармакогностическое изучение рапса обыкновенного: дис. ... канд. фарм. наук. Пятигорская гос. фармацевт. академия, Пятигорск, 2014.
206. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений: ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002. – М.: Госстандарт. – С. 28.
207. Установка для холодной водной экстракции флавоноидов и дубильных веществ из лекарственного растительного сырья: пат. 142485 РФ МПК В01D11/00 / Марахова А.И., Федоровский Н.Н., Сорокина А.А., Самылина И.А.; заявитель и патентообладатель

- ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ; заявл. 10.01.2014; опубл. 27.06.2014.
208. Фалькова М.Т. Циклический инфекционный анализ лекарственного растительного сырья с вскрытие проб в ультразвуковой поле. дисс...канд. хим. Наук. – С-Пб, 2014. – 108 с.
209. Фармацевтические технологии: уч. пособ. / Г.И. Молчанов, М.Л. Кубалова. – 2-е изд. – М.: Альфа-М: ИНФРА. – М, 2013.- 336 с.
210. 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). - С. 75 - 76.
211. 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.
212. 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. - С. 9 - 15.
213. Федоровский, Н.Н. Изучение влияния ультразвукового воздействия на эффективность экстракции флавоноидов бессмертника / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.С. Коницев [и др.] // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы науки фармацевтических ВУЗов: от разработки до коммерциализации». - Пермь, 2011. - С. 250 - 253.
214. Федосеева, Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia*

- crassifolia* (L.) Fritsch.), произрастающего на Алтае / Л.М. Федосеева // Химия растительного сырья. - 2005. №3. - С. 45-50.
215. Фетисова А.Н. Экспериментально-теоретическое обоснование создания лекарственных средств на основе липофильных фракций растительного сырья, сочетающих противовоспалительное и антиоксидантное действие с бактерио- и фунгистатической активностью: дис. ... докт. фарм. наук. ММА им. И.М. Сеченова, Москва, 2009. – 260 с.
216. Физическая и коллоидная химия / под ред. А.П. Беляева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 704 с.
217. Флавоновые гликозиды. Методы выделения, очистки, разделения и анализа: метод. разраб. / под ред. С.А. Мининой, Л.А. Шимолиной. СПб., 1991.- 23 с.
218. Фракционное выделение фенольных соединений из лекарственного растительного сырья под действием электрического напряжения / А.И. Марахова [и др.] // Материалы научн. конференции «Фармобразование-2013». - Воронеж, 2013. - С. 404 - 407.
219. Хаджиева, З.Д. Амперометрическое определение аскорбиновой кислоты в плодах шиповника / З.Д. Хаджиева, А.Ж. Хаджиева // Известия вузов. Северо-кавказский регион. Естественные науки. 2006. - №10. - С. 127 - 130.
220. Цанев, Р.Г. К вопросу о спектрофотометрическом определении / Р.Г. Цанев, Г.Г. Марков // Биохимия. – 1960. – Т. 25. - Вып. 1. – 215 с.
221. Цыдендамбаев, П.Б. Биологические эффекты флавоноидов / П.Б. Цыдендамбаев, Б.С. Хышиктуев, С.М. Николаев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.- 2006.- №6(52).- С. 229 - 233.
222. Чернышева, Н.Н. Кулонометрическое определение аймалина / Н.Н. Чернышева, И.Ф. Абдуллин, Т.И. Абдуллин // Бутлеровские сообщения: Химия и компьютерное моделирование: тез. Поволжской

- конференции по аналитической химии. - Казань, 2002. - Вып. 8. - С 139.
223. Чуешов, В.Н. Промышленная технология лекарств: учеб. / В.Н. Чуешов. - Харьков: НФАУ, 2002. - 716 с.
224. Чукарина, Е.В. Определение арбутина и гидрохинона в листьях толокнянки, брусники и фитопрепаратах, приготовленных на их основе / Е.В. Чукарина, А.М. Власов, К.И. Эллер // Вопросы питания. - 2007. Т. 76. - №3. -С. 8287.
225. Швырев М.В. Интенсификация процессов извлечения биологически активных веществ из растительного сырья при переменном давлении в системе: дис. ... канд. фарм. наук. Санкт-Петербургская гос. Химико-фармац. академия, С-Пб, 2005.- 204 с.
226. Шелудько, О.Н. Оптимизация потенциометрического титрования кислот электрохимически генерированным основанием / О.Н. Шелудько, Н.К. Стрижов, Т.В. Гузик // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. - 2012. - № 1. - С. 64 - 68.
227. Шеремякина, М.И. Определение органических кислот в траве и соке каланхоэ / М.И. Шеремякина // Химико-фармацевтический журнал. 1983. - №9. - С. 1145 – 1147.
228. Шиповник и его использование / Б.Д. Игнатъев. Новосибирск: Наука, 1964. - 322 с.
229. Шматков, Д.А. Определение суммы фенолкарбоновых кислот в корнях лопуха большого (*Arctium lappa*) / Д.А. Шматков, Д.М. Попов // Фармация на современном этапе проблемы и достижения. Научные труды, том XXXIX. - Часть II. - М., 2000. - С. 174 - 178.
230. Шнайдман, Л.О. Биологически активные вещества плодов рябины обыкновенной и перспективы их промышленного использования / Л.О. Шнайдман, И.Н. Кущинская, М.К. Мительман // Раст. ресурсы. - 1971. - Т.7. вып. 1. - С. 68 - 71.

231. Экстрагирование лекарственного сырья / В.Д. Пономарев. - М.,1976. - С. 123 - 125.
232. Яковлева, К.Э. Характеристика растительных фенольных соединений методом циклической вольтамперометрии / К. Э. Яковлева [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 730-739.
233. American Herbal Pharmacopoeia. 1999 г. / Под. ред. Roy Upton Herbalist.
234. An integrated database of flavonoids / T. Kinoshita, et al. // Biofactors. – 2006. – Vol. 26 (3). – P. 179 – 188.
235. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups / Z. Y. Chen [et al.] // Chem. Phys. Lipids. – 1996. – Vol. 79, № 2. – P. 157-163.
236. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals /S. V. Jovanovic [et al.] // Flavonoids in health and disease / S. A. van Acker [et al.]; eds. C. A. Rice-Evans, L. Packer. – New York, 1998. – P. 137-161.
237. A triterpenoid glucoside and phenolic compounds from *Rosa davurica* / Jong Cheol Park [et al.] // Natural product sciences. – 2003. – № 9(1).–P. 31 – 33.
238. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. / Pasteur N., et al. // Journal of food protection. – 1995. – 58. p. 81 – 85.
239. Antiradical activity of hydrolyzed and non-hydrolyzed extracts from *Helichrysi infl orescentia* and its phenolic contents / Z. Sroka, et al. // Zeitschrift für Naturforschung. – 2004. – 59. P. 363 – 367.
240. AOAC. Official Method 2005.02 Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines // Journal of AOAC International. 2005. Vol. 88.N 5. P. 1269.
241. Arnett, E. M. Ionization of group 6 and 7 protonic acids in dimethyl sulfoxide / E. M. Arnett, L. E. Small // J. Am. Chem. Soc. – 1977. – Vol. 99, № 3. – P. 808-816.

242. Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids // Arch. Biochem. Biophys. - 2000.- Vol. 373.- P. 102-109
243. Bate-Smith, E.C. The commoner phenolic constituents of plants and systematic distributor / E.C. Bate-Smith // Sci. Droc. Poy. Dubbin. Soc. 1956 - Vol. 27, N.6 -P. 165.
244. Bate-Smith, E.C. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. Dicotyledons / E.C. Bate-Smith // I. Soc. London: Botany. - 1962. - Vol. 58 - N. 371. - P. 95 - 175.
245. Beasley, T.H. Determination and haracterization of gallotannin by high performance liquid chromatography / T.H. Beasley, H.W. Zeigler, A.D. Dell // Analytical Chemistry. - 1977. - Vol. 49. - №2. - P. 238 – 243.
246. Bisset, N. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis / N. Bisset // CRC Press, Boca Raton. - 1994. - 566 p.
247. Bisset, N.G. Herbal drugs and phytopharmaceuticals, 2nd ed. / Stuttgart,Medpharm Scientifi c Publishers, 2001.
248. Borges G., Degeneve A., Mullen W., etc. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries // J. Agric. Food Chem. 2010. Vol. 58. P. 3901–3909.
249. Brantner, A. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. / A. Brantner, E. Grein // Journal of Ethnopharmacology. - 1994. – p. 35 – 40.
250. British Pharmacopoeia: Volume IV / British Pharmacopoeia Commission. - London, 2009. – 10952 p.
251. Bryant, C.T. A note of differentiation between flavonoid glycoside and their aglicones / C.T. Bryant // J. Amer. Assoc. Sci. Ed., 1950. - Vol. 39 N.8 - P.480-489.

252. Chedeville O., Tosun-Bayraktar A., Porte C. Modeling of fenton reaction for the oxidation of phenol in water // *J. Autom. Methods Manag. Chem.* 2005. V. 2005. P. 31–36.
253. Cheng I.F., Breen K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex // *BioMetals.* - 2000. - Vol. 13. - P. 77-83.
254. Chrysin and (\pm)-taxifolin electrochemical oxidation mechanisms / P. Janeiro [et al.] // *Electroanalysis.* – 2005. – Vol. 17, № 12. – P. 1059-1064.
255. Cosar, G. Antibacterial activity of *Helichrysum* species growing in Turkey / G. Cosar, B. Cubukcu // *Fitoterapia.* – 1990. – 61. – p. 161 – 164.
256. Day, M.W. Frostbite / M.W. Day // *Nursing.* - 2008. - Jan. - Vol. 38 (1). - P.72.
257. Dai J., Mumper R.J. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties // *Molecules.* 2010. Vol. 15. P. 7313-7352.
258. Deutscher Arzneimittel-Codex – German pharmaceutical codex: a supplementary pharmacopoeia to the European and German Pharmacopoeia. Berlin, Federal Union of German Associations of Pharmacists, 2005.
259. Direct inhibition of the Hexose Transporter GLUT1 by Tyrosine Kinase Inhibitors / Juan Carlos Vera, et al. // *Biochemistry.* - 2001. - Vol. 40. - No 3. – P. 777 - 779.
260. Downey M.O., Rochfort S. Simultaneous separation by reversed phase high performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin // *Journal of Chromatography A* 2008. Vol. 1201. P. 43-47.
261. Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis, and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study / H.A. Cohen, et al. // *Arch Pediatr Adolesc Med.* - 2004. - 158(3). P. 217-219.

262. Effects of the acidities of phenols from specific substituent-solvent interactions. Inherent substituent parameters from gas-phase acidities / M. Fujio [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1981. – Vol. 103, № 14. – P. 4017-4029.
263. Electrically assisted extraction of soluble matter from chardonnay grape skins for polyphenol recovery / Nadia Bousetta, et al. // *J. Agric Food Chem.* – 2009. - 57(4). – P. 1491 – 1497.
264. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics / A. Simic [et al.] // *Molecules.* – 2007. – Vol. 12, № 10. – P. 2327-2340.
265. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids / H. P. Hendrickson [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1994. – Vol. 12, № 3. – P. 325-334.
266. Encyclopedia of herbs and their uses / D. Brown // London, Dorling Kindersley, 1995.
267. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals / I. B. Afanas'eva [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 61, № 6. – P. 677-684.
268. European Pharmacopoeia 5.6: Volume IV/ European Pharmacopoeia Commission. – 2005. – 8798 p.
269. European pharmacopoeia, 2nd ed. Strasbourg, Council of Europe, 1995.
270. European pharmacopoeia, 3rd ed. Strasbourg, Council of Europe, 1997.
271. European Pharmacopoeia, 4 ed. (Electronic). - Version 4.8. - 2004.
272. European Pharmacopoeia, 7th ed. Strasbourg, European Directorate for the Quality of Medicines, 2009.
273. Fernandez de Simon B. Low molecular weight phenolic compounds in Spanish oak woods / Fernandez de Simon B., Cadahia E., Garcia-Vallejo M.C. // *J. Agric. Food Chem.* - 1996. - Vol. 44. - №6. - P.1507–1511.
274. Fintelmann, V. Lehrbuch der Phytotherapie / V. Fintelmann, R.F. Weiss // – 11. Aufl. - 2002. – P. 244.

275. Ghaemi, Y. Hydrophobic chromatography with dynamically coated stationary phases. / Y. Ghaemi, R.A. Wall // *J.Chromatogr.* – 1979. - Vol. 174. N1. P. 51 - 59.
276. Harborne, J. B. Comparative biochemistry of the flavonoids / I. Harborne.- London: New York, 1967. - 383 p.
277. Harborne, J. B. The chromatography of the flavonoid pigments / J.B. Harborne // *J. Chrom.* - 1959. - Vol.2. - N.6 - P. 581 - 604.
278. Harborne, J.B. Advances in flavonoids research since 1992 /J.B. Harborne, C.A. Williams // *Phytochemistry.* - 2000, 55. - P. 481 – 504.
279. Herb CD4: Herbal remedies. CD-ROM. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, 2001.
280. Herb CD4: Herbal remedies. CD-ROM. Stuttgart, Medpharm Scientific, 1994.
281. High performance liquid chromatography method for quantitative and qualitative determination of ascorbic acid mixture / Neugebaur M., et al. // *Indian j. Rharm. Sci.* 1990. Vol.52. № 4. P. 182 - 185.
282. High performance liquid chromatography method for quantitative and qualitative determination of ascorbic acid mixture / M. Neugebaur, et al. // *Indian j. Rharm. Sci.* - 1990. - Vol.52. - № 4. - P.182-185.
283. Hudhes Davi Emlyn. Titrometric determination of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenol indophenyl in commercial liquid diets / Hudhes Davi Emlyn // *J. Pharm. Sci.* - 1983. - Vol. 72. - P. 29-34.
284. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids / O. Firuzi [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 56, № 6. – P. 801-807.
285. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey / B. Tepe, et al. // *Food Chemistry.* – 2004. – 90. – p. 685 – 689.
286. In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium*/ E. Czinner, et al. // *Moench. Journal of Ethnopharmacology.* – 2000. – 73. P. 437–443.

287. Inhibition of proinflammatory markers in primary bone marrow derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure activity relationship / M. Comalada, et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 72 (8). – P. 1010 – 1021.
288. Fernandes J.C.B., Kubota L.T. and Neto G.O. Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene–vinylacetate membrane. *Analytica Chimica Acta* 1999; 385 (1-3): 3-12.
289. Janeiro, P. Solid state electrochemical oxidation mechanisms of morin in aqueous media / P. Janeiro, A. M. Oliveira-Brett // *Electroanalysis.* – 2005. – Vol. 17, № 9. – P. 733-738.
290. Janssen, A.M. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods. / A.M. Janssen, J.C. Scheffer, A. Baerheim-Svendson // *Planta medica.* - 1987. – 53. p. 395 – 398.
291. Jian Wang. MALDI-TOF MS Analysis Flavonol Glycosides / Jian Wang, Peter Sporns // *J. Agric. Chem.* - 2000. – 48. - p. 1657-1662.
292. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups / C. G. Heijnen [et al.] // *Toxicol. In Vitro.* – 2001. – Vol. 15, № 1. – P. 3-6.
293. Judzentiene, A. Chemical composition of the essential oils of wild *Helichrysum arenarium* (L.) with differently colored inflorescences from eastern Lithuania / A. Judzentiene, R. Butkiene // *Journal of essential oil Research.* – 2006. – 18. P. 80 – 83.
294. Keskin, M. Frostbite injury due to improper usage of an ice pack / M. Keskin, Z. Tosun, A. Duymaz et al. // *Ann Plast Surg.* - 2005. - Oct. - № 55 (4). - P. 437-438.
295. Kinoshita, T. An integrated database of flavonoids / T. Kinoshita, Z. Lepp, Y. Kawai et al. // *Biofactors.* – 2006. – Vol. 26 (3). – p. 179 – 188.
296. Kurkin, V.A. The new methodological approaches to the standardisation of the some medicinal plants containing flavonoids / V.A. Kurkin, E.V.

- Avdeeva, O.E. Pravdivtseva et. al., // Polyphenols Communications.- 2010.
- C. 548-549.
297. Lei, Z. Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products / Z. Lei, J. Jervis, R.F. Helm // J. Agric., Food Chem. – 2001. – vol. 49. - №3 - P. 1165 - 1168.
298. Lien E.J., Ren S., Bui H.H., Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants // Free Radic. Biol. Med.- 1999.- Vol. 26.- P. 285-294.
299. Low molecular weight polyphenols in cork of *Quercus Suber* / Cande E., et al. // J. Agric. Food Chem. - 1997. - Vol.45. - №7. - P. 2695-2700.
300. Luteolin, a strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme. / Samejima K., et al. // Journal of agricultural and food chemistry. – 1995. – 43. p. 410 – 414.
301. Mabry, T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas // Springer Verlag: Berlin – Heidelberg – New York. – 1970.– 354 p.
302. 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. - P. 153.
303. 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. –Режимдоступа: <http://www.science-sd.com/460-24763>.
304. Meléndez-Hevia, E. The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution / E. Meléndez-Hevia, T. Waddell, M. Cascante // J Mol E. - vol.1996. - 43 (3). - P. 293 – 303.

305. Mikulic-Petkovsek, M. Composition of sugars, organic acids and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species / M. Mikulic-Petkovsek, V. Schmitzer, A. Slatnar, F. Stampar, R. Veberic // *Journal of food science*. – 2012. – №77(10). – P.1064 – 1070.
306. Oliveira-Brett, A. M. Electrochemical oxidation of quercetin / A. M. Oliveira-Brett, M. E. Ghica // *Electroanalysis*. – 2003. – Vol. 15, № 22. – P. 1745-1750.
307. Olszewska, M. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species / M. Olszewska // *Jornal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2008. – № 48(3). – P. 629 – 635.
308. Phytochemical study of phenolic compounds from *Helichrysum* by LC-DAD-MS / E. Czinner, et al. // In: *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. – 2002. – 47. – p. 99 – 109.
309. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants / J. S. Wright [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 123, № 6. – P. 1173-1183.
310. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, World Health Organization, 1998.
311. Quenching of quercetinquinone/quinonemethides by different thiolate scavengers: stability and reversibility of conjugate formation / H. M. Awad [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2003. – Vol. 16, № 7. – P. 822-831.
312. Reactivity of semiquinones with ascorbate and the ascorbate radical as studied by pulse radiolysis / V. Roginsky [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 384, № 1. – P. 74-80.
313. Rios, J.L. Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas* / J.L. Rios, M.C. Recio, A. Villar // *Journal of Ethnopharmacology*. – 1991. – 33. – p. 51 – 55.

314. Robak J., Duniec Z., Rzadkowska-Bodalska H. et al. The effect of some flavonoids on non-enzymatic lipid oxidation and enzymatic oxidation of arachidonic acid // *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*- 1986.- Vol. 38.- P. 483-491.
315. Roberto Gotti. Capillari electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis.* -2011.- №55.- P.775-801.
316. Rossotti F. J. C , Rossotti H. *The Determination of Stability Constants and Other Equilibrium Constants in Solution*, 1961).
317. Sensoy, I. Extraction using moderate electric fields / I. Sensoy, S.K. Sastry // *J. Food Sci.* – 2004. – 69 (1).
318. Schwinn K.E., Davies K.M. *Flavonoids // Plant pigments and their manipulation* / Ed. Davies K. Oxford: Blackwell, 2004. P. 92-149.
319. Slabbert, N. P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols / N. P. Slabbert // *Tetrahedron.* – 1977. – Vol. 33, № 7. – P. 821-824.
320. Stahl, W. *Int. Symp. on Antioxidants and Disease Prevention.* / Stahl W., W. Schwartz, H. Sies // Stockholm, Sweden. – 1993. - P. 23 - 24.
321. Stahl, W. Sies *Int. Symp. on antioxidants and disease prevention* / W. Stahl, W. Schwartz // Stockholm, Sweden. H. - 1993. - P. 23-24.
322. Szadowska, A. *Pharmacology of galenic preparations and flavonoids isolated from Helichrysum arenarium* / A. Szadowska // *Acta Polonica Pharm.* – 1962. – 19. – p. 465 – 479.
323. Takamura K., Ohtsuki S., Kusu F. Development of a new amperometric sensor for probing the total acid of beverages. *Analytical Sciences* 2001; 17(supplement): 737-739.
324. *The flavonoids/ Advances and Research/* Ed. By J. B. Harbon, T. J. Mabry. – London: Chapman and Hall. – 1982. – 744 p.
325. *The flavonoids/* ed. by J. B. Harbon, T. J. Mabry. – London: Chapman and Hall. 1975. – 1204 p.
326. *The flavonoids: advances and research* / ed. by J. B. Harbon, T. J. Mabry. – London: Chapman and Hall. – 1982. – 744 p.

327. The genus *Sorbus* (Maloideae, Rosaceae) in Europe and in North Africa: morphological analysis and systematic / Aldasoro, J.J., et al. // *Syst. Bot.* - 1998. - 23. - P. 189 – 212.
328. The in vitro effect of *Helichrysi flos* on microsomal lipid peroxidation / E. Czinner, et al. // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2001. – 77. – p. 31 – 35.
329. The new methodological approaches to the standardization of the some medicinal plants containing the flavonoids and phenylpropanoids / V.A. Kurkin, et al. // XXIV International Conference on Polyphenols communications «Polyphenols communication 2008». - Salamanca, 2008. - P. 185 - 186.
330. Traditional medicine Fact sheet N134 December 2008
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>
331. Van den Broucke. Chemical and pharmacological investigation on *Thymi herba* and its liquid extracts. *Plantamedica.* – 1980. – 39. P. 253–254.
332. Van den Broucke. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus serpyllum* / Van den Broucke, J.A. Lemli // *Pharmaceutisch Weekblad, scientific edition.* – 1983. – 5. P. 9 – 14.
333. *Vitamins, nutrition and cancer* / ed. K.N. Prasad. Basel. New York: Karger, 1984. 307 p.
334. Wichl, M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis edition* / M. Wichl. – New York: Health & Fitness, 2004. – 761 p.
335. WHO monographs on selected medicinal plants // World Health Organization. Geneva. – 2002. – Vol. 2. – P. 340 – 351.

Список сокращений

- АОС** - абсорбционная оптическая спектрофотометрия
- БАС** – биологически активные соединения
- ВЭЖХ** – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ-МС** – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором
- ГЖХ** – газожидкостная хроматография
- ГФ** – государственная фармакопея
- ЛРС** – лекарственное растительное сырье
- НД** – нормативный документ
- ОВ** – окислительно-восстановительный
- ОВП** – окислительно-восстановительный потенциал
- ОФС** – общая фармакопейная статья
- ПАВ** – поверхностно - активные вещества
- УЗ**- ультразвук
- ФС** – фармакопейная статья
- ТСХ** – тонкослойная хроматография
- СО** -стандартный образец
- УФ** - ультрафиолетовый

ПРИЛОЖЕНИЕ.
Акты внедрения результатов работы



**Health
здоровье**

Производство лекарственных трав,
сборов и фиточаев

ЗАО Фирма «Здоровье»
143430 Россия, Московская область,
пос. Нахабино, ул. Советская, д. 20 А
Тел. (495) 566-00-14; 566-42-91
www.lektrava.ru, www.kolikam.net
email: sales@lektrava.ru



УТВЕРЖДАЮ

Зам генерального директора по качеству
ЗАО Фирма «Здоровье»

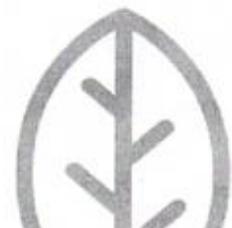
Смирнова М.А.

« 14 » февраля 2014 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
результатов научных достижений**

Настоящим актом удостоверяется, что научные исследования Мараховой Анны Игоревны, полученные при выполнении диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук на тему «Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе» использованы при разработке фармакопейных статей предприятия ЗАО фирмы «Здоровье» «Дуба кора», «Ромашки аптечной цветки», «Сбор противогеморроидальный».

Начальник ОКК
ЗАО Фирма «Здоровье» _____ *Белое* _____ Белоус Т.А.



**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
ЦЕНТР КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ «ЦЕНТР ЭКОФАРМ»**

ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

Адрес: 107553, г.Москва, Большая Черкизовская, д. 24а, стр. 1
Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФМ02. до 27 октября 2016 г.
Телефон: (495) 789-93-52

факс: (495) 789-93-52

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «ЦККЛС «Центр Экофарм»
Хорошаева О.В.
_____ 2013 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных достижений

Настоящим актом удостоверяется, что в испытательной лаборатории ООО «ЦККЛС «Центр Экофарм» апробированы методики:

- потенциометрического титрования органических кислот в лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах на растительной основе («Холосас», сироп плодов шиповника);
- потенциометрического титрования дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных препаратах на растительной основе («Тонзилгон», «Тонзилгон Н»).

Перечисленные методики разработаны Мараховой Анной Игоревной при выполнении диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук на тему «Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе».

Применение перечисленных методик способствует получению точных результатов и автоматизации анализа при использовании автоматических титраторов.

Исполнительный директор



Командиров С.Н.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ
в учебный процесс результатов диссертационной работы
Мараховой Анны Игоревны «Унификация физико-химических методов
анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на
растительной основе»

Настоящий акт подтверждает, что результаты по разработке методик спектрофотометрического и потенциометрического анализа биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе, изложенные в монографиях «Потенциометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе» и «Фотометрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе», обобщающие результаты диссертации «Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе» используются при обучении слушателей факультета непрерывного образования филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» г. Москва по специальности «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Декан факультета непрерывного
образования филиала частного
учреждения образовательной
организации высшего образования
«Медицинский университет «Реавиз» г. Москва
ул. Краснобогатырская, д.2, к.2



О.И. Слюсар



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ (РУДН)

Институт биохимической технологии и нанотехнологии
(ИБХТН)

ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2, Москва, Россия, 117198
<http://nano.rudn.ru>

тел. /факс: +7 (499) 936-85-99
E-mail: nanotechnology-rudn@yandex.ru

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в учебный процесс

Института биохимической технологии и нанотехнологии
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

результатов диссертационной работы

Мараховой Анны Игоревны

на тему: «Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе».

Данным актом удостоверяется факт внедрения результатов научной работы Мараховой Анны Игоревны в учебный процесс Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». Результаты исследований по повышению эффективности экстракции дубильных веществ и флавоноидов из лекарственного растительного сырья с применением ультразвука и электрического напряжения используются в лекционно-практическом курсе дисциплины «Основы фитохимии и технология фитопрепаратов» при обучении студентов в магистратуре по образовательной программе «Инновационные технологии и нанотехнологии в медицине, фармацевтике и биотехнологии» в рамках направления «Химия».

Директор Института
биохимической технологии
и нанотехнологии, руководитель
программы магистратуры
«Инновационные технологии
и нанотехнологии в медицине,
фармацевтике и биотехнологии» д.х.н.



И. Станишевский

УТВЕРЖДАЮ

Проректор

по научно-исследовательской работе

ГБОУ ВПО «Пермская государственная
фармацевтическая академия»

Н.В. Дозморова

«10» марта 2016 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ
в учебный процесс

кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
(614081, г. Пермь, ул. Полевая, д.2)

результатов диссертационной работы
Мараховой Анны Игоревны

на тему: «Унификация физико-химических методов анализа лекарственного
растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе»

Данный акт удостоверяет факт внедрения результатов научной работы Мараховой Анны Игоревны в учебный процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА. Монографии «Потенциметрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе» и «Спектрофотометрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе» используются при обучении студентов интернатуры и при выполнении студентами квалификационных работ.

Заведующий кафедрой фармакогнозии
с курсом ботаники ПГФА, профессор  В.Д. Белоногова

Ответственная за учебно- методическую
работу с интернами по кафедре фарма-
когнозии с курсом ботаники ПГФА, ст.
преподаватель  А.А. Гилева

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М.СЕЧЕНОВА
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ГБОУ ВПО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
к.ф.н.
Т.М.Литвинова

« 09 » сентября 2015г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов докторской диссертации Мараховой Анны Игоревны на тему:

«Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармакогнозии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе заведующего кафедрой фармакогнозии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, д.ф.н., чл.-корр. РАН, профессор Самылиной И.А., заведующего учебной частью к.ф.н., доцента Бобковой Н.В и профессора кафедры, д.ф.н. Гравель И.В. подтверждает использование результатов, полученных Мараховой А.И. в ходе работы над докторской диссертацией «Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе», в лекционно-практическом курсе обучения студентов интернатуры фармацевтического факультета на кафедре фармакогнозии.

Зав. кафедрой фармакогнозии
фармацевтического факультета ГБОУ ВПО
Первый МГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России,
чл.-корр. РАН, профессор, д.ф.н.

 И.А.Самылина

Зав. учебной частью кафедры фармакогнозии
фармацевтического факультета
Первый МГМУ им.И.М.Сеченова,
доцент, к.ф.н.

 Н.В.Бобкова

Профессор кафедры фармакогнозии
фармацевтического факультета
Первый МГМУ им. И.М.Сеченова,
доцент, д.ф.н.

 И.В. Гравель



Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М.СЕЧЕНОВА
Фармацевтический факультет, кафедра фармакогнозии

№ 1 от «28» октября 2015 г.

И.о. генерального директора
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»
Минздрава России
Олефиру Ю.В.
127051, г. Москва, Петровский
бульвар, д.8

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам разработанные сотрудниками кафедры фармакогнозии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова проекты ОФС «Плоды замороженные» и ФС «Шиповника плоды» для рассмотрения вопроса о включении их в ГФ XIII изд.

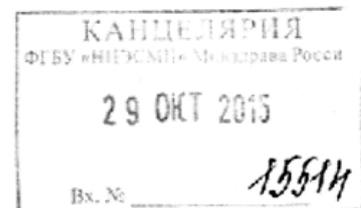
Приложения:

1. Проект ОФС «Плоды замороженные»- 1 экземпляр,
 пояснительная записка - 1 экземпляр
2. Проект «Шиповника плоды» -1 экземпляр,
 пояснительная записка - 1 экземпляр

Зав. кафедрой фармакогнозии
фармацевтического факультета
чл.-корр. РАН, профессор, д.ф.н.

И.А. Самылина

исп. доцент кафедры фармакогнозии,
Сергунова Е.В. (8-499-128-57-66),
Марахова А.И. (8-926-600-65-95)





Министерство здравоохранения Российской Федерации
 Государственное бюджетное образовательное учреждение
 высшего профессионального образования
**ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
 УНИВЕРСИТЕТ имени И.М.СЕЧЕНОВА**
 Фармацевтический факультет, кафедра фармакогнозии

№ 2 от «22» октября 2015 г.

Генеральному директору
 ФГБУ «Научный центр экспертизы
 Средств медицинского применения»
 Минздрава России, д.м.н.
 Ю.В. Олефиру
 127051, г. Москва,
 Петровский бульвар, д.8.

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам проект ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье», разработанный профессором кафедры фармакогнозии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, д.ф.н. А.А. Сорокиной и доцентом института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, к.ф.н. А.И. Мараховой, для рассмотрения вопроса о включении его в ГФ XIII издания

Приложения:

1. Проект ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье» - 1 экземпляр
2. Пояснительная записка - 1 экземпляр

Зав. кафедрой фармакогнозии
 фармацевтического факультета
 чл.-корр. РАН, профессор, д.ф.н.

И.А. Самылина

исп. Марахова А.И. (8-926-600-65-95)

