

На правах рукописи

ЖДАНОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
РАЗЛИЧНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2021

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент **Браславский Валерий Борисович**

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

Марахова Анна Игоревна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Институт биохимической технологии и нанотехнологии, профессор.

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

Защита состоится «___» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2021/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ведущую роль в развитии отечественного фармацевтического рынка, обеспечив стремительное и разностороннее развитие, сыграли Федеральная целевая программа развития фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации и Стратегия лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года (Куркин В.А. и др. 2014, 2016; Саканян Е.И. и др. 2018).

Кроме того, развитию отечественной фармацевтической промышленности посодействовали экономические санкции, введенные Евросоюзом, США и их сторонниками в отношении нашей страны в 2014 г. Ограничительные меры привели к более жестким и глобальным требованиям государственной политики в области лекарственного обеспечения и нашли отражение в проекте Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2030 года.

Ключевыми направлениями вышеуказанных документов являются создание отечественных, конкурентоспособных лекарственных препаратов и увеличение их экспорта на зарубежные рынки, обеспечение качества, эффективности и безопасности, что является актуальной проблемой национальной безопасности России, особенно в современных условиях.

Сегодня выпускается и находится на различных этапах разработки огромное количество лекарственных средств (ЛС). Наряду с синтетическими ЛС, значительное место на фармацевтическом рынке занимают изготовленные на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС): лекарственные растительные препараты (ЛРП) и лекарственные средства растительного происхождения (ЛСРП) – фитопрепараты. Это связано с тем, что фитопрепараты сочетают в себе достаточно высокую активность, биологическую доступность, широту терапевтического воздействия с относительной безопасностью и достаточно мягким воздействием на организм пациента. Именно поэтому они показаны к применению при беременности и лактации, в педиатрии и гериатрии, а также для лечения многих хронических заболеваний, при которых реабилитация больных обычно занимает длительное время (Киселева Т.Л. и др. 2009; Марахова А.И. и др. 2018).

Основным юридическим документом в России, предъявляющим требования к качеству ЛРС и препаратов на его основе, является Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания. Несмотря на достижения современного комплекса наук, лежащих в основе фармакопейных химических, физических и физико-химических методов анализа, позволяющих с высокой специфичностью установить химический состав, в некоторых фармакопейных статьях (ФС) на ЛРС до сих пор используются только общегрупповые реактивы (качественные реакции) для подтверждения наличия основных групп биологически активных веществ (БАВ) (подтверждения подлинности), а количественно определяют сумму экстрактивных веществ.

Начиная с ГФ СССР XI издания, для подтверждения наличия основных групп БАВ в ЛРС, активно используется метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ), что несомненно является рывком в аналитической практике и обладает очевидными преимуществами над пробирочными реакциями, и, в настоящее время, в ГФ РФ XIV издания, практически для каждого вида ЛРС, подтверждение основных групп БАВ проводят методом ТСХ. Однако для этих целей перспективными являются такие методы, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях.

Крайне важным разделом ФС, предъявляющим требования к безопасности и эффективности ЛРС, является раздел «Испытания» с рядом числовых показателей. Первым и одним из наиболее важных показателей данного раздела является «Влажность». Определение влажности ЛРС в фармацевтической практике проводят классическим термогравиметрическим

(ТГ) воздушно-тепловым (ВТ) способом высушивания в сушильном шкафу (СШ), но известны и другие весьма перспективные способы определения влагосодержания, применяющиеся в пищевой, сельскохозяйственной, парфюмерно-косметической промышленности и др.

Таким образом, широкий арсенал современного оборудования и методов анализа позволяют с высокой точностью, специфичностью и скоростью оценить качество ЛРС и препаратов на его основе, что особенно актуально в рутинной аналитической практике. В первую очередь это должно найти отражение в ГФ РФ. В настоящее время крайне актуальным вопросом является использование современных и научно обоснованных подходов к контролю качества и стандартизации ЛРС и препаратов на его основе (Самылина И.А., Куркин В.А. и др. 2016; Баландина И.А., 2004).

Степень разработанности. Исследования в области стандартизации и контроля качества ЛРС широко представлены в работах современных отечественных учёных (Самылина И.А., Моисеев Д.В. и др. 2020; Самылина И.А. и др. 2017; Саканян Е.И. и др. 2018-2020; Куркин В.А., Браславский В.Б. и др. 2019-2021).

Безопасность ЛРС и ЛРП тесно связана с разделом ФС «Испытания» ГФ РФ XIV издания для каждого вида ЛРС. Не менее важным испытанием, наряду с определением тяжелых металлов и мышьяка, радионуклидов, посторонних примесей и др., является оценка влажности ЛРС и ЛРП. Согласно общей фармакопейной статье (ОФС) – ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ РФ XIV издания, определение влажности проводят классическим способом с использованием СШ. Данная ОФС допускает использование современных автоматических инфракрасных термогравиметрических (ИК ТГ) анализаторов влажности (влагомеров), но при этом выдвигает ряд требований к разработке методик.

Известны методики определения влажности с применением автоматических ИК ТГ влагомеров, использующиеся в различных отраслях промышленности. Недостатком является тот факт, что они не разработаны для оценки качества именно ЛРС, использующегося в фармации и медицине. Способ ИК ТГ имеет ряд явных преимуществ перед ВТ способом, однако до сих пор не внедрен в мировую фармацевтическую практику.

Целью диссертационного исследования является разработка новых и совершенствование существующих методических подходов и методик анализа отдельных показателей качества некоторых видов лекарственного растительного сырья различных морфологических групп.

Задачи исследования:

Для достижения данной цели решали следующие задачи:

1. Оценка возможности применения ИК ТГ способа в фармакопейном анализе для определения влажности ЛРС различных морфологических групп с использованием автоматических анализаторов.

2. Определение оптимальных параметров подготовки проб отдельных видов воздушно-сухого ЛРС различных морфологических групп (корни, коры, листья, плоды, семена, травы, цветки) и разработка методик определения влажности ИК ТГ способом с использованием автоматического анализатора с керамическим нагревательным элементом.

3. Проведение сравнительной метрологической оценки характеристик фармакопейной методики и разработанных методик определения влажности ИК ТГ способом.

4. Разработка и совершенствование методических подходов к контролю подлинности шиповника плодов методами спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.

5. Научное обоснование методических подходов к контролю качества и стандартизации пижмы обыкновенной цветков.

6. Научное обоснование методических подходов к контролю качества и стандартизации зверобоя травы.

7. Научное обоснование рекомендаций по внесению изменений и дополнений в ОФС по отбору проб и ОФС по определению влажности, а также в частные ФС на изученные виды ЛРС.

Научная новизна. Впервые изучена сравнительная возможность определения влажности ИК ТГ способом воздушно-сухого ЛРС 23 фармакопейных видов 7 различных морфологических групп: алтея корни (*Althaeae radices*), аниса обыкновенного плоды (*Anisi vulgaris fructus*), берёзы листья (*Betulae folia*), девясила высокого корневища и корни (*Inulae helenii rhizomata et radices*), дуба кора (*Quercus cortex*), душицы обыкновенной трава (*Origanum vulgare herba*), зверобоя трава (*Hyperici herba*), календулы лекарственной цветки (*Calendulae officinalis flores*), кориандра посевного плоды (*Coriandri sativi fructus*), крушины ольховидной кора (*Frangulae alni cortex*), липы цветки (*Tiliae flores*), льна посевного семена (*Lini usitatissimi semina*), мяты перечной листья (*Menthae piperitae folia*), пижмы обыкновенной цветки (*Tanacetum vulgare flores*), подорожника большого листья (*Plantaginis majoris folia*), расторопши пятнистой плоды (*Silybi mariani fructus*), ромашки аптечной цветки (*Chamomillae recutita flores*), солодки корни (*Glycyrrhizae radices*), тмина обыкновенного плоды (*Cari carvi fructus*), укропа пахучего плоды (*Anethi graveolentis fructus*), фенхеля обыкновенного плоды (*Foeniculi vulgaris fructus*), шиповника плоды (*Rosae fructus*), эхинацеи пурпурной трава (*Echinaceae purpureae herba*).

Впервые определены и научно обоснованы оптимальные параметры подготовки анализируемых проб (степень измельчения и масса навески) для 23 видов воздушно-сухого ЛРС 7 различных морфологических групп и разработаны перспективные для включения в ГФ РФ методики определения влажности ИК ТГ способом с использованием автоматического анализатора с керамическим нагревательным элементом.

Впервые разработана методика качественного анализа аскорбиновой кислоты в водных извлечениях воздушно-сухих плодов шиповника методом спектрофотометрии с предварительной твердофазной экстракцией на полиамиде. Усовершенствована методика определения основных групп БАВ в плодах шиповника методом ТСХ, позволяющая одновременно подтвердить наличие аскорбиновой кислоты и флавоноидов. Определена возможность использования метода ВЭЖХ для качественного обнаружения аскорбиновой кислоты в водных извлечениях из плодов шиповника.

Научно обоснованы методические подходы к контролю качества и стандартизации пижмы обыкновенной цветков и зверобоя травы. Уточнён нижний предел содержания флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной в пересчете на цинарозид (не менее 1,7 %) и предложен нижний предел содержания антраценпроизводных в пересчете на гиперин в траве зверобоя (не менее 0,1 %).

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена патентами Российской Федерации на изобретение: № 2695662 «Способ определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья плодов расторопши пятнистой» (регистрационный № 2019112566, от 24.04.2019 г., решение о выдаче патента 25.07.2019 г.) (приложение № 2) и № 2725133 «Способ определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья плодов эфиромасличных растений семейства Сельдерейных» (регистрационный № 2019145632, от 30.12.2019 г., решение о выдаче патента 30.06.2020 г.) (приложение № 3).

Теоретическая и практическая значимость работы. Для 23 фармакопейных видов воздушно-сухого ЛРС 7 различных морфологических групп (корни (*Radices*), коры (*Cortex*), листья (*Folia*), плоды (*Fructus*), семена (*Semina*), травы (*Herbae*), цветки (*Flores*) определены оптимальные параметры подготовки проб (степень измельчения и масса навески) и разработаны методики определения ведущего числового показателя качества для воздушно-сухого ЛРС –

«Влажность» ИК ТГ способом с использованием автоматического анализатора с керамическим нагревательным элементом. Предложены методические подходы к предварительному отбору параметров подготовки пробы ЛРС для определения влажности ИК ТГ способом с целью проведения более детальных серийных экспериментов с последующей математической обработкой полученных данных и установлением оптимальных значений степени измельчения и массы навески.

Проведена сравнительная оценка способов определения влажности воздушно-сухого ЛРС различных морфологических групп: ВТ (фармакопейным) и ИК ТГ. Показаны достоинства и перспективность ИК ТГ способа для внедрения в фармацевтическую практику.

Показана целесообразность определения аскорбиновой кислоты только для плодов шиповника, используемых для получения высоковитаминных лекарственных препаратов. Обосновано введение нового числового показателя при определении ведущих групп БАВ – наличие веществ флавоноидной природы. Предложены методические подходы к идентификации аскорбиновой кислоты в водных извлечениях плодов шиповника методами спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Доказана объективность оценки количественного содержания флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной в пересчете на цинарозид. Предложен числовой показатель минимального содержания флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной – не менее 1,7 %.

Научно обоснована целесообразность определения суммы антраценпроизводных в пересчете на гиперин в ЛРС зверобоя наряду с флавоноидами, а также предложен нижний предел их содержания – не менее 0,1 %. Установлено, что ярко-красный цвет водно-спиртовых извлечений зверобоя травы может служить визуальным признаком соответствия данного ЛРС требованиям ФС.

Впервые разработаны методические подходы к пробоподготовке ЛРС и подготовлены предложения по внесению изменений и дополнений в ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», а также отдельные параметры для различных морфологических групп и видов воздушно-сухого ЛРС в ФС ГФ РФ XIV.

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в учебном и научном процессах ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России на кафедрах: фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, химии Института фармации, фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, управления и экономики фармации, в производственных процессах ЗАО «Самаралектравы», ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», ООО «Лекарь» и рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (акты внедрения, приложение 4).

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основана на изучении и системном обобщении литературных источников в области контроля качества и стандартизации ЛРС, оценки актуальности работы и степени разработанности темы исследования. Учитывая поставленную цель и задачи, разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования. Разработана методология подбора оптимальных параметров подготовки пробы ЛРС для определения влажности ИК ТГ способом с использованием автоматических анализаторов.

Объектами диссертационного исследования служили фармакопейные виды воздушно-сухого ЛРС различных морфологических групп заготовленные самостоятельно и приобретённые (в виде ЛРП) в аптечных организациях г. Самары в период с 2018 по 2020 гг.

Данное исследование проводили с использованием микроскопии, ТГ, ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях. Математическую обработку экспериментальных данных проводили с применением лицензионного программного обеспечения в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнена согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (№ государственной регистрации АААА-А19-119051490148-7); «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения» (№ государственной регистрации 115042810034).

Положения, выносимые на защиту.

1. Данные по исследованию возможности применения ИК ТГ способа с использованием автоматических анализаторов для определения влажности воздушно-сухого ЛРС различных морфологических групп.

2. Результаты исследований по определению оптимальных параметров подготовки проб и методики определения влажности воздушно-сухого ЛРС способом ИК ТГ с использованием автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом.

3. Результаты сравнительной оценки данных определения влажности воздушно-сухого ЛРС способом ИК ТГ с использованием автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом и ВТ (фармакопейным) способом с использованием СШ.

4. Результаты исследований по совершенствованию методики подтверждения наличия основных групп БАВ методом ТСХ в водных извлечениях плодов шиповника.

5. Результаты исследований по разработке методики качественного обнаружения аскорбиновой кислоты в водных извлечениях воздушно-сухих плодов шиповника методом спектрофотометрии после твердофазной экстракции на полиамиде.

6. Данные по оценке возможности качественного определения аскорбиновой кислоты методом ВЭЖХ.

7. Результаты исследований по обоснованию числового показателя содержания флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной.

8. Результаты исследований по оценке доброкачественности зверобоя травы и обоснованию числового показателя содержания антраценпроизводных в пересчете на гиперидин.

9. Данные по разработке рекомендаций, внесению изменений и дополнений в соответствующие ОФС и ФС.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность диссертационной работы подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием цифровой микроскопии, ТГ, ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях.

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на следующих конференциях: Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2018; 2019; 2020 гг.); III, IV, V Межвузовских научно-практических конференциях с международным участием «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2018; 2019; 2020 гг.); II, III, IV Научно-практических конференциях студентов и молодых ученых «Физика и медицина: создавая будущее» (г. Самара, 2018; 2019; 2020 гг.); IV Международной научно-методической конференции «Гаммермановские чтения» (г. Санкт-Петербург, 2019 г.); V Внутривузовской конференции для аспирантов «The vital problems of medical science and research» (г. Самара, 2019 г.); II Международной научной конференции «Роль

метабономики в совершенствовании биотехнологических средств производства» (г. Москва, 2019 г.); Международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата» (г. Москва, 2019 г.); Международном конгрессе молодых ученых в фармации Drug Research (г. Казань, 2019 г.); Международной научной конференции молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва, 2020 г.); II Научной школе «Кадровый резерв для биофармацевтической и химической промышленности» (г. Москва, 2021 г.).

Публикации. По теме исследования опубликовано 25 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе 2 статьи в международных базах данных, получено 2 патента Российской Федерации на изобретение.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в научно-педагогическом процессе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России на кафедрах: фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, управления и экономики фармации, химии Института фармации; в производственных процессах ЗАО «Самаралектравы» и ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»; в рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (акты внедрения, приложение № 4).

Личный вклад автора. Все описанные в диссертационной работе результаты исследований получены автором лично.

Изучена возможность использования ИК ТГ способа для определения влажности свежего и воздушно-сухого ЛРС различных морфологических групп. Проведены сравнительные исследования по определению влажности ИК ТГ способом с фармакопейным ВТ способом. Проведена математическая обработка полученных экспериментальных данных для каждого вида исследуемого ЛРС. Определены и научно-обоснованы оптимальные параметры подготовки проб ЛРС (степень измельчения и навеска). Разработаны методики определения влажности для 23 видов воздушно-сухого ЛРС 7 морфологических групп ИК ТГ способом с использованием автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом.

В процессе исследований по разработке ИК ТГ методик определения влажности автором обнаружены и обсуждены актуальные аспекты контроля качества и стандартизации плодов шиповника, цветков пижмы обыкновенной и травы зверобоя. Научно обоснованы методические подходы к оценке доброкачественности указанных видов ЛРС и установлены нижние пределы содержания ведущих групп БАС в ЛРС пижмы обыкновенной и зверобоя.

Автором подготовлены предложения по изменению и дополнению ОФС по отбору проб и ОФС по определению влажности ЛРС и ЛРП, ФС на изученные виды.

Объем и структура работы. Диссертационное исследование описано на 224 страницах машинописного текста. Результаты исследования изложены в форме 30 таблиц и 25 рисунков. Работа включает в себя введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, 3 главы собственных исследований, выводы и заключение, список литературы, который состоит из 231 источника, из которых 46 – на иностранном языке, а также приложений.

Глава 1 содержит краткий обзор литературных данных в области контроля качества и стандартизации ЛРС, гармонизации фармакопейных требований, а также основных методов и способов определения влажности твердых материалов.

Глава 2 включает в себя описание объектов, методов и методик, использованных при выполнении диссертационного исследования.

В главе 3 представлены данные по работе с автоматическим анализатором влажности с керамическим нагревательным элементом, подобраны и научно обоснованы оптимальные

параметры подготовки проб (степень измельчения и навеска) исследуемых фармакопейных видов ЛРС, разработаны методики определения влажности 23 видов воздушно-сухого ЛРС 7 морфологических групп и проведена сравнительная метрологическая оценка. Кроме того, оценена возможность использования автоматических анализаторов с другими нагревательными элементами, а также некоторых видов свежего ЛРС.

В главе 4 изложены актуальные аспекты контроля качества и стандартизации шиповника плодов, зверобоя травы и пижмы обыкновенной цветков. Предложены научно обоснованные пути их решения.

В главе 5 представлена динамика требований по определению влажности ЛРС в отечественных и ведущих зарубежных изданиях фармакопей. Представлены проекты изменений и дополнений ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» и 23 частных ФС на конкретные виды ЛРС ГФ РФ XIV издания.

Диссертация завершается заключением, практическими рекомендациями, перспективами дальнейшей разработки и списком литературы.

В приложениях к работе представлены метрологическая оценка результатов экспериментальных данных, патенты Российской Федерации на изобретение: № 2695662 «Способ определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья плодов расторопши пятнистой» (регистрационный № 2019112566, от 24.04.2019 г., решение о выдаче патента 25.07.2019 г.) и № 2725133 «Способ определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья плодов эфиромасличных растений семейства Сельдерейных» (регистрационный № 2019145632, от 30.12.2019 г., решение о выдаче патента 30.06.2020 г.), акты внедрения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами диссертационного исследования явились образцы 23 фармакопейных видов воздушно-сухого ЛРС 7 различных морфологических групп, заготовленные на территориях Самарской, Оренбургской и Воронежской областей, Краснодарского края, Республики Марий Эл и Чувашской Республики в период с 2017 по 2020 гг., а также промышленные образцы в виде ЛРП различных производителей и серий.

В рамках диссертационной работы также исследованы водные и водно-спиртовые (70 % и 96 % этиловый спирт) извлечения из плодов шиповника, цветков пижмы обыкновенной и травы зверобоя с использованием стандартных образцов (СО) и рабочих стандартных образцов (РСО), полученных на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: аскорбиновой кислоты, рутина, лютеолина, цинарозида, тилианина, акацетина и гиперицина.

Морфолого-анатомические методы использованы для подтверждения подлинности заготовленных образцов ЛРС. Микроскопический анализ проводили в проходящем свете на белом поле с помощью микроскопов Motic DM-39C-N9GO-A и DM-111 (Польша).

Определение влажности ЛРС проводили параллельно двумя способами: фармакопейным способом – воздушно-тепловым (ВТ) с использованием сушильных шкафов (СШ) с температурой нагрева 100-105 °С (электрический круглый 2В-15 (СССР), ШС-80-01МК СПУ (Россия)) и инфракрасным термогравиметрическим (ИК ТГ) способом с использованием автоматических

анализаторов влажности с задаваемой температурой нагрева 103 °С (Sartorius MA-150, Sartorius MA-35 (Германия), ViBRA MD-83 (Япония)).

Для количественного определения кислоты аскорбиновой в водных извлечениях плодов шиповника применяли методы титриметрического анализа, основанные на восстановительных свойствах кислоты аскорбиновой: индофенольный и йодатометрический.

Метод ТСХ применяли с целью определения основных групп БАВ и использовали пластины марки *Sorbfil* типа ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия). ВЭЖХ-анализ проводили с целью качественного анализа аскорбиновой кислоты в водных извлечениях плодов шиповника на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром-6» с УФ-спектрофотометрическим детектором (Россия).

Методы прямой и дифференциальной спектрофотометрии использованы для исследования образцов водных и водно-спиртовых извлечений из шиповника плодов, пижмы обыкновенной цветков и зверобоя травы. Анализ проведен на спектрофотометрах Specord 40 (Германия) и СФ-2000 (Россия) в кварцевых кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 до 600 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики с оценкой однородности выборок, расчетом среднего значения (\bar{x}), дисперсии (S^2), стандартного отклонения (S), полуширины доверительного интервала (Δx) и относительной ошибки результата среднего определения (ϵ). Сравнение выборочных средних значений проводили с помощью t -критерия Стьюдента с тестом Левина для оценки однородности дисперсий. Величину уровня значимости (p) для t -критерия Стьюдента и теста Левина устанавливали равной 0,05. Статистический анализ проведен в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ РФ XIV издания с использованием программ STATISTICA 10.0 (USA) и ChemMetr 1.0

Валидационная оценка разработанных методик определения влажности ЛРС способом ИК ТГ проведена в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV издания.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследования по разработке методик определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья инфракрасным термогравиметрическим способом

Диссертационное исследование выполнено с использованием автоматического ИК ТГ анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом Sartorius MA-150.

Важным условием прецизионного анализа является температура окружающей среды, которая, по нашим данным, должна находиться в пределах 23 ± 3 °С при стандартной влажности воздуха (50-60 %).

Ежедневно, после калибровки весоизмерительной системы, прибор выводили «на режим» путем высушивания отработанной навески ЛРС (холостой пробы). Нами определено, что результат анализа после первого включения или длительного простоя в режиме ожидания всегда завышен, поэтому для прецизионных измерений не следует допускать более длительных временных затрат, чем требуется для остывания нагревательного блока до температуры окружающей среды (23 ± 3 °С). Несмотря на наличие запрограммированного режима предварительно прогрева с поддержанием постоянной температуры внутри сушильной камеры (минимально задаваемое значение – +40 °С), холостая проба предпочтительнее, так как более высокая температура внутри сушильной камеры будет стимулировать высушивание уже на этапе

распределения навески ЛРС, что особенно критично для эфиромасличного сырья, когда потеря веса регистрируется прибором начиная с 27 °С.

Первым этапом разработки методик был предварительный отбор значений степеней измельчения ЛРС, который основывался, в первую очередь, на требованиях к степени измельчения следующих разделов соответствующих ФС: «Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение». Кроме того, в обязательном порядке нами учтены требования ФС в разделе «Измельченность сырья». Второй этап заключался в выборе оптимальной навески анализируемой пробы измельчённого ЛРС. Критерием выбора минимально допустимой массы навески служило полное и равномерное покрытие измельчённой пробой всей площади поверхности дна алюминиевой кюветы. Максимально допустимую массу навески определяли нахождением баланса между воспроизводимостью и условной достоверностью величины показателя влажности, а также временем, затраченным на анализ.

Обзор литературных данных, а также изучение методических рекомендаций показали, что главным недостатком является тот факт, что ИК ТГ методики не разработаны для оценки качества именно ЛРС, использующегося в фармации и медицине.

С целью разработки алгоритма определения влажности ИК ТГ способом воздушно-сухого ЛРС нами на примере плодов расторопши пятнистой (*Silybi mariani fructus*) исследованы различные комбинации степеней измельчения (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 мм) и навесок (\approx 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 12,0; 15,0 г). В результате установлены оптимальные значения степени измельчения (2-3 мм) и массы навески ($10,0 \pm 1,0$ г) для определения влажности ИК ТГ способом. Сравнительная метрологическая оценка полученных результатов определения влажности при оптимальных параметрах степени измельчения и массы навески, а также при фармакопейных значениях массы навески в случае ВТ и ИК ТГ способов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная метрологическая оценка результатов определения влажности плодов расторопши пятнистой

Способ (навеска, г)	n	\bar{X}	S^2	S	Доверительный интервал $S_{\bar{x}}$		$\bar{\epsilon}$
					-95,00%	+95,00%	
ВТ (3-5)	7	5,48	0,0034	0,0587	0,0378	0,1293	0,0222
ИК ТГ (10,0 \pm 1,0)	7	5,72	0,0022	0,0468	0,0302	0,1031	0,0177
ИК ТГ (3-5)	7	5,40	0,0086	0,0926	0,0597	0,2040	0,0350

Показано, что результаты определения влажности двумя способами сопоставимы (5,48 % и 5,40 %). Наименьшая ошибка среднего определения составила 0,0177 % для ИК ТГ влагомера с массой навески плодов расторопши $10,0 \pm 1,0$ г и влажностью 5,72 %.

Следовательно, при разработке методик определения влажности ЛРС способом ИК ТГ необходимо использовать алгоритм, заключающийся в предварительном отборе степеней измельчения и навесок. При определении влажности плодов семейства Сельдерейных (*Ariaceae*) нами выявлены следующие особенности: анатомическое строение, химический состав и удельный вес эфиромасличных плодов, поэтому разработку методик необходимо проводить с учётом специфических особенностей конкретного вида ЛРС.

На наш взгляд, метрологическую оценку результатов определения влажности плодов семейства Сельдерейных (*Ariaceae*) целесообразно привести на примере одного эфиромасличного вида – плодов фенхеля обыкновенного (*Foeniculi vulgaris fructus*) со степенью измельчения 1,0 мм (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительная метрологическая оценка результатов определения влажности плодов фенхеля обыкновенного

Способ (навеска, г)	\bar{X}	S^2	S	Доверительный интервал $S_{\bar{x}}$		$\bar{\epsilon}$
				-95,00%	+95,00%	
ВТ (3-5)	9,45	0,0012	0,0342	0,0220	0,0752	0,0129
ИК ТГ (4,5±0,5)	10,95	0,0009	0,0297	0,0191	0,0654	0,0112
ИК ТГ (10,0±1,0)	10,11	0,0527	0,2296	0,1480	0,5057	0,0868
ИК ТГ (1-2)	8,30	0,3290	0,5736	0,3696	1,2632	0,2168

Из представленных данных видно, что наименьшая ошибка среднего определения (0,0112 %) наблюдается при навеске 4,5±0,5 г. Показатель влажности в данной подгруппе выше (10,95 %), чем показатель, полученный ВТ способом.

Оценим однородность дисперсий с последующим сравнением выборочных средних результатов определения влажности плодов фенхеля обыкновенного с помощью *t*-критерия Стьюдента и теста Левина (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты сравнительного анализа выборочных средних значений влажности плодов фенхеля обыкновенного

Способ (навеска, г)	Число степеней свободы (<i>f</i>)	Критерий Стьюдента (<i>t</i>)	Уровень значимости (<i>p</i>)	Критерий Левина (<i>F</i>)	<i>p</i> -Левина
ВТ (3-5) и ИК ТГ (4,5±0,5)	12	-87,6197	0,000000	0,56491	0,466773
ВТ (3-5) и ИК ТГ (10,0±1,0)	12	-7,5706	0,000007	14,14205	0,002718
ВТ (3-5) и ИК ТГ (1-2)	12	5,3014	0,000188	9,16758	0,010509

В первую очередь следует обратить внимание на тест Левина. Уровень значимости комбинации с навеской 4,5±0,5 г составил 0,466773>0,05 и, следовательно, дисперсии в данных подгруппах однородны и использование критерия Стьюдента правомерно. Значения критерия Стьюдента составили 87,6197, 7,5706 и 5,3014 для навесок 4,5±0,5 г, 10,0±1,0 г и 1-2 г соответственно, что намного больше критического значения (2,18) при доверительной вероятности 95 % и *f*=12. Так как разница между выборками статистически значима, то выборки мы не можем считать принадлежащими одной генеральной совокупности. Уровни значимости критерия Стьюдента для всех навесок составили *p*<0,05.

Следовательно, в данном случае оптимальна навеска 4,5±0,5 г, так как тест Левина, в отличие от других навесок, не имеет статистическую значимость, а величины дисперсии, стандартного отклонения и относительной погрешности значительно меньше.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены оптимальные значения степеней измельчения и массы навесок для 23 видов фармакопейных представителей воздушно-сухого ЛРС 7 морфологических групп (корни, коры, листья, плоды, семена, травы, цветки) для определения влажности ИК ТГ способом с помощью автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом (таблица 4).

Таблица 4 – Оптимальные значения степеней измельчения и массы навесок воздушно-сухого ЛРС для определения влажности ИК ТГ способом с использованием анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом

№ п/п	Номер ФС ГФ РФ XIV издания	Вид	Степень измельчения, мм	Навеска, г
1	ФС.2.5.0001.15	Аллея корни (<i>Althaeae radices</i>)	2	≈ 3
2	ФС.2.5.0057.18	Аниса обыкновенного плоды (<i>Anisi vulgaris fructus</i>)	1	4,5±0,5
3	ФС.2.5.0005.15	Берёзы листья (<i>Betulae folia</i>)	2	≈ 2
4	ФС.2.5.0070.18	Девясила высокого корневища и корни (<i>Inulae helenii rhizomata et radices</i>)	1	≈ 2,5
5	ФС.2.5.0071.18	Дуба кора (<i>Quercus cortex</i>)	1	≈ 2
6	ФС.2.5.0012.15	Душицы обыкновенной трава (<i>Origanum vulgare herba</i>)	1	≈ 2
7	ФС.2.5.0015.15	Зверобоя трава (<i>Hyperici herba</i>)	1	≈ 2
8	ФС.2.5.0030.15	Календулы лекарственной цветки (<i>Calendulae officinalis flores</i>)	0,5	≈ 2
9	ФС.2.5.0018.15	Кориандра посевного плоды (<i>Coriandri sativi fructus</i>)	1	4,5±0,5
10	ФС.2.5.0021.18	Крушины ольховидной кора (<i>Frangulae alni cortex</i>)	1	≈ 2
11	ФС.2.5.0024.15	Липы цветки (<i>Tiliae flores</i>)	1	≈ 1
12	ФС.2.5.0026.15	Льна посевного семена (<i>Lini usitatissimi semina</i>)	2	≈ 5
13	ФС.2.5.0029.15	Мяты перечной листья (<i>Menthae piperitae folia</i>)	2	≈ 1,5
14	ФС.2.5.0031.15	Пижмы обыкновенной цветки (<i>Tanacetum vulgare flores</i>)	1	≈ 2,5
15	ФС.2.5.0032.15	Подорожника большого листья (<i>Plantaginis majoris folia</i>)	1	≈ 1,5
16	ФС.2.5.0035.15	Расторопши пятнистой плоды (<i>Silybi mariani fructus</i>)	2-3	10,0±1,0
17	ФС.2.5.0037.15	Ромашки аптечной цветки (<i>Chamomilla recutita flores</i>)	2	≈ 1,5
18	ФС.2.5.0040.15	Солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	0,2	≈ 1
19	ФС.2.5.0098.18	Тмина обыкновенного плоды (<i>Cari carvi fructus</i>)	1	4,5±0,5
20	ФС.2.5.0043.15	Укропа пахучего плоды (<i>Anethum graveolentis fructus</i>)	1	4,5±0,5
21	ФС.2.5.0102.18	Фенхеля обыкновенного плоды (<i>Foeniculum vulgare fructus</i>)	1	4,5±0,5
22	ФС.2.5.0106.18	Шиповника плоды (<i>Rosae fructus</i>)	5	≈ 5
23	ФС.2.5.0055.15	Эхинацеи пурпурной трава (<i>Echinacea purpurea herba</i>)	0,5	≈ 1

При этом определено, что ИК ТГ способ нецелесообразно использовать для определения влажности некоторых видов ЛРС морфологической группы «Почки» (берёзы и тополя), так как высокое содержание смолистых веществ приводит к спеканию частиц навески аналитической пробы между собой и с поверхностью кюветы, что препятствует нормальному испарению влаги. Определение влажности некоторых видов свежего ЛРС, в частности, сочных плодов (боярышника и шиповника) оказалось пока невозможным в связи с программным ограничением настроек ИК ТГ анализатора из-за продолжительности анализа.

2. Актуальные аспекты контроля качества и стандартизации отдельных видов лекарственного растительного сырья

Исследования по определению оптимальных параметров подготовки проб воздушно-сухого ЛРС и разработке методик определения влажности ИК ТГ способом положили начало новому этапу обсуждения актуальных вопросов контроля качества некоторых видов ЛРС, содержащих флавоноиды: шиповника плодов, пижмы обыкновенной цветков и зверобоя травы. На наш взгляд, методологические и методические подходы, представленные в ГФ РФ XIV издания, достаточно противоречивы и не отвечают в полной мере современным тенденциям фармацевтического анализа ЛРС, несмотря на глубоко изученный химический профиль вышеуказанных видов.

2.1. Шиповника плоды (*Rosae fructus*)

Результаты хроматографического разделения в тонком слое (рисунок 1) водных и водно-спиртовых извлечений из плодов шиповника показали возможность одновременной идентификации аскорбиновой кислоты и флавоноидов в данном виде ЛРС. Однако аскорбиновую кислоту в плодах низковитаминных видов обнаружить не удалось, что соответствует литературным данным (Вершинина В.В., Куркин В.А., 2011).

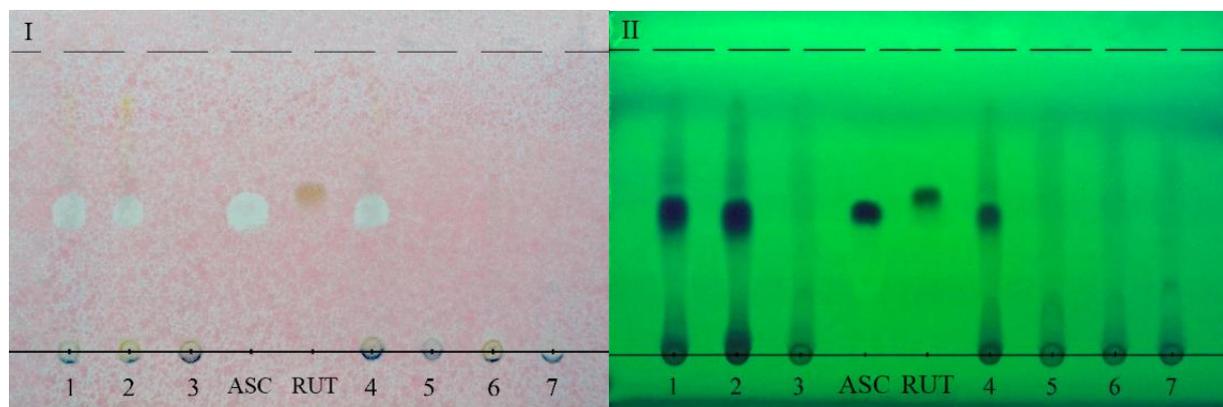


Рисунок 1 – Хроматограмма извлечений из плодов шиповника в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота ледяная-вода очищенная (4:1:2): I – водное извлечение, детекция при дневном свете после обработки 0,044 % раствором натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята; II – водно-спиртовое извлечение, детекция в УФ-свете при длине волны 254 нм

Обозначения: 1-7 – извлечения из образцов плодов шиповника;
ASC – аскорбиновая кислота, RUT – рутин

Разработка методики качественного анализа аскорбиновой кислоты в низковитаминных видах шиповника плодов методом УФ/Вид-спектроскопии

В связи с тем, что чувствительность метода ТСХ не позволяет обнаружить аскорбиновую кислоту в плодах низковитаминных видов секции шиповников (*Caninae* Среп.), очевидна

необходимость использования инструментальных методов анализа. К наиболее распространённым, доступным и экспрессным методам относится УФ/Вид-спектроскопия.

Сущность разработанного способа заключается в твердофазной экстракции водного извлечения на полиамиде для очистки от фенольных соединений и сопутствующих веществ. Оценка подлинности плодов шиповника проводится следующим образом: около 1,0 г измельченных плодов шиповника, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу на 100 мл, прибавляют 30 мл воды очищенной и настаивают в течение 15 минут, периодически встряхивая. Извлечение фильтруют во флакон тёмного стекла через бумажный складчатый фильтр (раствор А).

Твердофазную экстракцию раствора А проводят на полиамиде (около 1,0 г) в стеклянном фильтре, отбрасывая первые порции.

1,0 мл полученного анализата переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки водой очищенной и перемешивают.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре в диапазоне длин волн 190-500 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную.

При изучении спектров поглощения водных извлечений из всех исследуемых образцов плодов шиповника после твердофазной экстракции на полиамиде обнаруживается характерный для аскорбиновой кислоты максимум поглощения при длине волны $\lambda_{\max}=264\pm 2$ нм (рисунок 2), что может служить подтверждением подлинности ЛРС «Шиповника плоды».

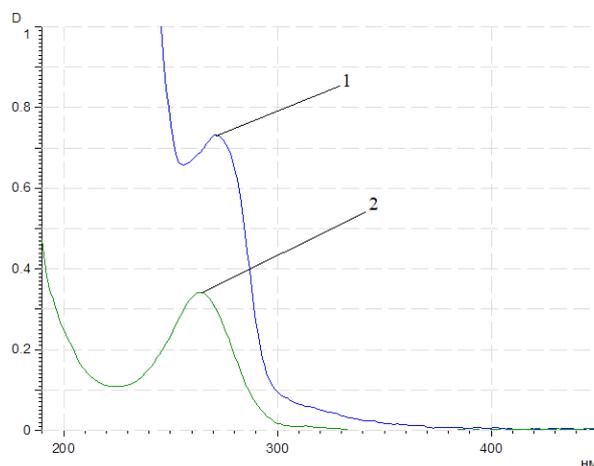


Рисунок 2 – Спектры поглощения водных извлечений из плодов шиповника

Обозначения: 1 – раствор извлечения до твердофазной экстракции на полиамиде;

2 – раствор извлечения после твердофазной экстракции на полиамиде

Определение аскорбиновой кислоты в низковитаминных видах шиповника плодов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В качестве подвижной фазы для проведения ВЭЖХ-анализа была выбрана система ацетонитрил-вода в соотношении 1:9. Сравнение значений времени удерживания пиков на ВЭЖХ-хроматограмме извлечения плодов шиповника (2,133 мин) и времени удерживания пика РСО аскорбиновой кислоты (2,016 мин) при длине волны 266 нм позволило идентифицировать наличие аскорбиновой кислоты в ЛРС «Шиповника плоды».

2.2. Пижмы обыкновенной цветки (*Tanacetum vulgare* flores)

С целью обоснования нецелесообразности использования лютеолина в качестве СО методом ТСХ нами проанализированы водно-спиртовые извлечения ЛРС «Пижмы обыкновенной цветки». Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии в извлечениях лютеолина и подтверждают тот факт, что доминирующим флавоноидом является тилианин со значением $R_f \approx 0,7$. Кроме того, обнаруживаются цинарозид ($R_f \approx 0,6$), акацетин ($R_f \approx 0,9$) и соединения, по характеру флуоресценции, предположительно, фенилпропаноидной структуры со значениями $R_f \approx 0,8$ и $0,15$ (рисунок 3).

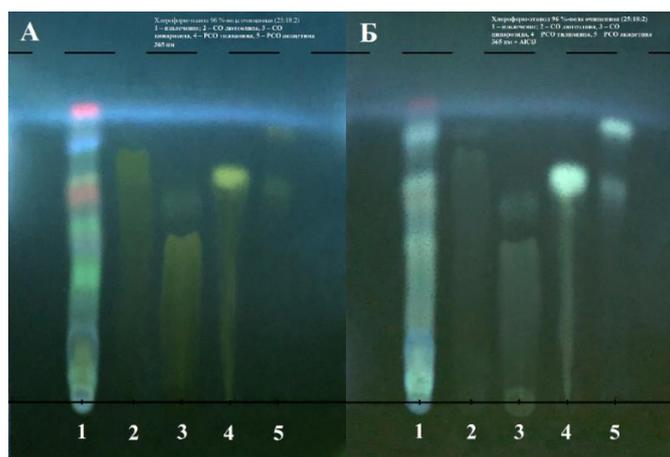


Рисунок 3 – Хроматограмма водно-спиртового извлечения цветков пижмы обыкновенной в системе растворителей хлороформ-этанол 96 %-вода очищенная (25:18:2): А – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм; Б – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором алюминия (III) хлорида 3 %
 Обозначения: 1 – извлечение; 2 – СО лютеолина, 3 – СО цинарозида,
 4 – РСО тилианина, 5 – РСО акацетина

В случае отсутствия РСО тилианина возможно использовать СО цинарозида, но с уточнением значения R_{st} тилианина с величиной – около 1,2 относительно зоны адсорбции цинарозида.

Кроме того, цинарозид, на наш взгляд, целесообразно использовать и для оценки количественного содержания суммы флавоноидов, так как в цветках пижмы обыкновенной преобладают флавоноидные гликозиды. Анализ раствора цинарозида методом дифференциальной УФ/Вид-спектроскопии с алюминия (III) хлоридом показал, что дифференциальный спектр поглощения имеет аналогичный максимум поглощения при 400 нм, что и дифференциальный спектр водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной с алюминия (III) хлоридом (рисунки 4-7).

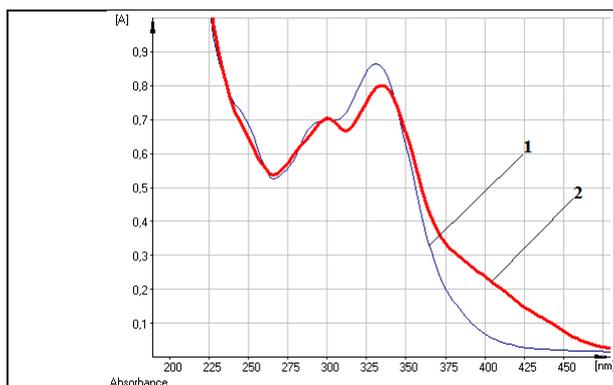


Рисунок 4 – Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из пижмы обыкновенной цветков. Обозначения: 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения в присутствии алюминия (III) хлорида

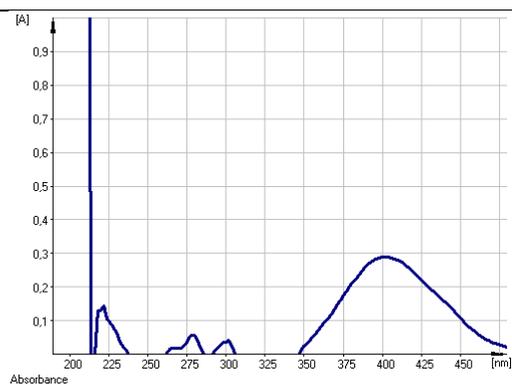


Рисунок 5 – Спектр поглощения водно-спиртового извлечения из пижмы обыкновенной цветков (дифференциальный вариант)

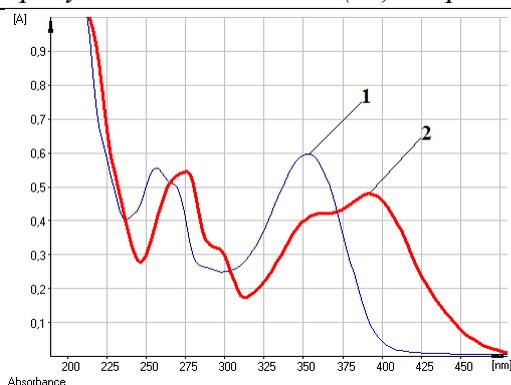


Рисунок 6 – Спектры поглощения спиртового раствора цинарозида. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор в присутствии алюминия (III) хлорида

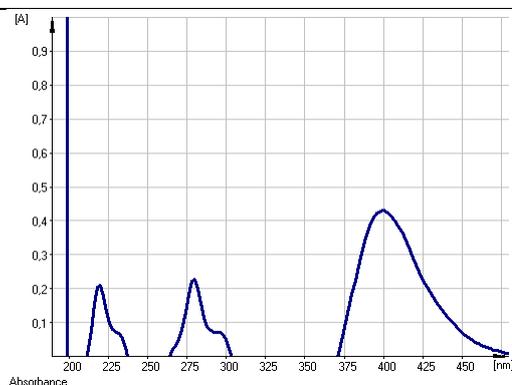


Рисунок 7 – Спектры поглощения спиртового раствора цинарозида (дифференциальный вариант)

С использованием методики (Куркина А.В., Хусаинова А.И., 2010) при аналитической длине волны 400 нм нами количественно проанализирован ряд образцов цветков пижмы обыкновенной методом дифференциальной спектрофотометрии по содержанию суммы флавоноидов в пересчёте на цинарозид. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в различных образцах цветков пижмы обыкновенной составило в пределах от 1,73 % до 2,44 %, что даёт основание предложить числовой показатель нижнего предела содержания флавоноидов в пересчете на цинарозид – не менее 1,7 %, в отличие от фармакопейного показателя – 2,5 %.

Таким образом, использование лютеолина для целей определения подлинности и количественной оценки содержания флавоноидов в ЛРС «Пижмы обыкновенной цветки», как это имеет место в случае фармакопейных методик, нецелесообразно по двум причинам: 1) данное соединение агликоновой природы практически не обнаруживается; 2) в цветках пижмы обыкновенной преобладают флавоноидные гликозиды (тилианин и др.), обуславливающие спектральные характеристики, по характеру близкие к таковым цинарозида.

2.3. Зверобоя трава (*Hyperici herba*)

При изучении ЛРП «Зверобоя трава» (образец № 5) обнаружено, что он представлен в основном стеблями – более 70 %, при допустимой норме – не более 50 %. Следовательно, образец № 5 не отвечает требованиям ФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава» ГФ РФ XIV издания по показателю «Посторонние примеси».

В ходе подготовки водно-спиртовых извлечений из образцов травы зверобоя наблюдается интересная особенность – различный цвет. Спиртовое извлечение из заготовленной нами травы зверобоя (образец № 3) имеет насыщенный ярко-красный цвет в отличие от извлечения из ЛРП (образец № 5) – жёлто-зелёного цвета. Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин свидетельствуют о формальном соответствии по данному показателю образца № 5: содержание составило $3,20 \pm 0,04$ % при нижнем пределе содержания – не менее 1,5 %. Кроме того, анализируя спектры поглощения спиртового извлечения из образца № 3, заготовленного нами, отчетливо виден максимум поглощения при длине волны 591 нм, обусловленный антраценпроизводными, тогда как в образце № 5 данный максимум не наблюдается (рисунки 8 и 9).

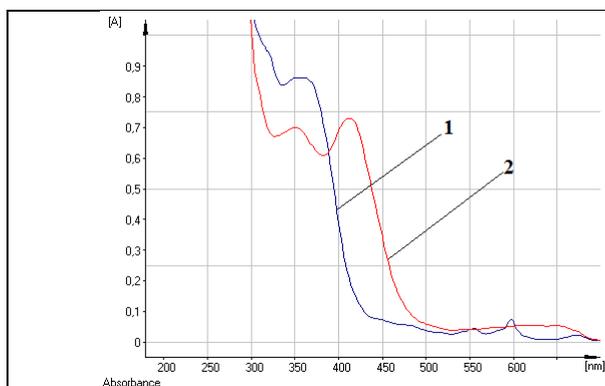


Рисунок 8 - Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из зверобоя травы.

Обозначения: 1 – раствор извлечения из образца № 3; 2 – раствор извлечения из образца № 3 в присутствии алюминия (III) хлорида

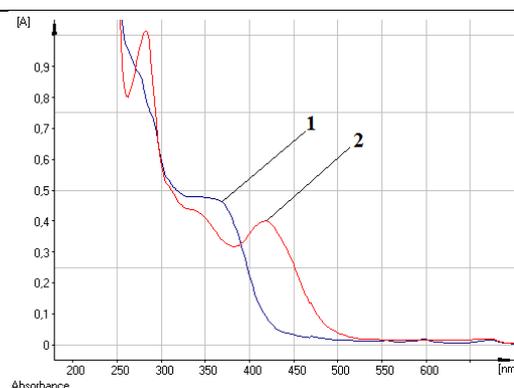


Рисунок 9 - Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из зверобоя травы.

Обозначения: 1 – раствор извлечения из образца № 5; 2 – раствор извлечения из образца № 5 в присутствии алюминия (III) хлорида

На наш взгляд, это связано с тем обстоятельством, что в образце № 5 низкий удельный вес цветков, в которых преимущественно накапливаются антраценпроизводные (гиперицин и псевдогиперицин). Учитывая тот факт, что антраценпроизводные наряду с флавоноидами обуславливают антидепрессантную активность, представляется целесообразным стандартизация по двум группам действующих веществ – флавоноидам и антраценпроизводным.

Нами проанализирована серия образцов травы зверобоя, где содержание суммы антраценпроизводных в пересчёте на гиперин составило от 0,04 % до 0,51 %. На наш взгляд, оптимальным значением нижнего предела содержания антраценпроизводных будет – не менее 0,1 %, при этом следует подчеркнуть, что образец № 5 с низким содержанием суммы антраценпроизводных (0,04 %) не отвечает требованиям ФС ГФ РФ по показателю «Посторонние примеси».

3. Изменения и дополнения, предлагаемые в отдельные общие и частные фармакопейные статьи на лекарственное растительное сырье

В результате проведенного исследования отдельных показателей качества ЛРС различных морфологических групп научно обоснованы изменения в ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» и изменения и дополнения в ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», а также отдельные дополнения в частные ФС на исследованные виды воздушно-сухого ЛРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование отдельных показателей качества ЛРС различных морфологических групп позволило сделать следующие **общие выводы**:

1. Установлено, что инфракрасный термогравиметрический (ИК ТГ) способ может быть использован для определения влажности 7 морфологических групп воздушно-сухого ЛРС: корней, коры, листьев, плодов, семян, травы и цветков. При этом определено, что способ ИК ТГ нецелесообразно использовать для определения влажности некоторых видов ЛРС морфологической группы «Почки», так как высокое содержание смолистых веществ приводит к спеканию частиц аналитической пробы между собой и с поверхностью кюветы, что препятствует испарению влаги. Определение влажности некоторых видов свежего ЛРС, в частности сочных плодов, невозможно в связи с программным ограничением настроек ИК ТГ анализатора.

2. Определены оптимальные параметры подготовки проб (степень измельчения и масса навески) 23 фармакопейных видов воздушно-сухого ЛРС 7 различных морфологических групп: алтея корни (*Althaeae radices*); аниса обыкновенного плоды (*Anisi vulgaris fructus*); берёзы листья (*Betulae folia*); девясила высокого корневища и корни (*Inulae helenii rhizomata et radices*); дуба кора (*Quercus cortex*); душицы обыкновенной трава (*Origanum vulgare herba*); зверобоя трава (*Hyperici herba*); календулы лекарственной цветки (*Calendulae officinalis flores*); кориандра посевного плоды (*Coriandri sativi fructus*); крушины ольховидной кора (*Frangulae alni cortex*); липы цветки (*Tiliae flores*); льна посевного семена (*Lini usitatissimi semina*); мяты перечной листья (*Menthae piperitae folia*); пижмы обыкновенной цветки (*Tanacetum vulgare flores*); подорожника большого листья (*Plantaginum majoris folia*); расторопши пятнистой плоды (*Silybi mariani fructus*); ромашки аптечной цветки (*Chamomillae recutita flores*); солодки корни (*Glycyrrhizae radices*); тмина обыкновенного плоды (*Cari carvi fructus*); укропа пахучего плоды (*Anethum graveolentis fructus*); фенхеля обыкновенного плоды (*Foeniculum vulgare fructus*); шиповника плоды (*Rosae fructus*); эхинацеи пурпурной трава (*Echinaceae purpureae herba*).

3. Разработаны методики определения влажности 23 фармакопейных видов воздушно-сухого ЛРС 7 различных морфологических групп ИК ТГ способом с использованием автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом, заключающиеся в указании оптимальных параметров степени измельчения и массы навески, режима анализа: автоматический режим, температура сушильной камеры – 103 °С без предварительного прогрева, ежедневная калибровка с последующей юстировкой весоизмерительной системы, проведение холостой пробы и остывание прибора до температуры 23±3 °С, распределение подготовленной аналитической пробы равномерным слоем по всей поверхности дна металлической кюветы. Внедрение ИК ТГ методик позволит значительно сократить трудо- и энергозатраты, продолжительность и погрешность определения.

4. Проведена сравнительная метрологическая оценка методик определения влажности воздушно-тепловым (фармакопейным) способом и ИК ТГ способом с помощью автоматического анализатора с керамическим нагревательным элементом. Установлено, что величины дисперсии, стандартного отклонения и относительной погрешности ИК ТГ методик, как правило, не превышают величин, рассчитанных в результате валидационной оценки фармакопейной методики.

5. Обоснована целесообразность определения аскорбиновой кислоты методом ТСХ только для плодов шиповника, использующихся для получения высоковитаминных лекарственных препаратов. С учетом значимости флавоноидов в плане проявления желчегонного эффекта обосновано введение нового числового показателя при определении ведущих групп БАВ методом ТСХ – наличие веществ флавоноидной природы с использованием СО рутина.

6. Предложены методические подходы к идентификации аскорбиновой кислоты в водных извлечениях плодов шиповника. Величины максимумов поглощения аскорбиновой кислоты в водном извлечении составили 242 нм и 264 нм для ионизированной и молекулярной форм соответственно. Разработана методика качественного обнаружения аскорбиновой кислоты в водных извлечениях плодов шиповника методом спектрофотометрии при $\lambda_{\max}=264\pm 2$ нм с предварительной твердофазной экстракцией водного извлечения на слое полиамида. Предложены условия разделения методом ВЭЖХ: изократический режим; состав подвижной фазы – смесь ацетонитрила и воды в соотношении 1:9; объем пробы – 3 мкл; сорбент – Сепарон-С18; поток – 100 мкл/мин.

7. Показана объективность использования СО цинарозида и рабочего стандартного образца тилианина (доминирующего флавоноидного гликозида цветков пижмы обыкновенной) для подтверждения наличия ведущей группы БАВ – флавоноидов, а также их количественной оценки. Уточнена величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на цинарозид в цветках пижмы обыкновенной – не менее 1,7 %.

8. Доказана необходимость внедрения нового числового показателя для травы зверобоя – суммы антраценпроизводных в пересчете на гиперин (не менее 0,1 %). Установлено, что в качестве визуального признака доброкачественности данного вида может служить цвет водно-спиртового извлечения (ярко-красный).

9. Научно обоснованы изменения в ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», изменения и дополнения в ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ РФ XIV издания: сокращено количество отбираемых аналитических проб путем объединения аналитических проб для определения влажности и золы и действующих веществ (аналитическая проба для определения влажности, содержания золы и действующих веществ). Наряду с воздушно-тепловым способом определения влажности добавлен ИК ТГ способ определения влажности воздушно-сухого ЛРС с использованием автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом. Указаны основные требования к рабочему месту, настройке и работе с автоматическим анализатором, методика определения влажности.

10. Научно обоснованы предложения по внесению в частные фармакопейные статьи (пункт «Влажность» раздела «Испытания») на исследованные виды воздушно-сухого ЛРС, которые заключаются в уточнении параметров подготовки пробы для определения влажности ИК ТГ способом с использованием автоматического анализатора с керамическим нагревательным элементом, а также изменений касающихся фитохимического анализа плодов шиповника, пижмы обыкновенной цветков и зверобоя травы.

Практические рекомендации. Разработанные методики определения влажности ИК ТГ способом с помощью автоматического анализатора влажности с керамическим нагревательным элементом и научно обоснованные подходы с установленными числовыми показателями содержания ведущих групп БАВ позволяют объективно оценить качество данных видов ЛРС, а также рекомендуются нами для включения в соответствующие статьи ГФ РФ. Результаты диссертационного исследования целесообразно использовать в учебном процессе, центрах контроля качества ЛС, а также отраслях промышленности, связанных с производством, хранением и переработкой лекарственного растительного сырья.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Продолжение исследований имеет научно-практическое значение, в первую очередь, для фармакогнозии и фармацевтической химии и заключается в экспериментально-аналитической работе по разработке ИК ТГ методик определения влажности для других видов и морфологических групп как воздушно-сухого, так и свежего ЛРС; разработке и совершенствовании объективных фармакопейных стандартов качества ЛРС и ЛРП, а также их унификации и гармонизации с мировыми фармакопейными стандартами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Жданов, Д. А. Разработка методик определения влажности лекарственного растительного сырья морфологической группы «Плоды» инфракрасным термогравиметрическим методом [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский // **Аспирантский вестник Поволжья**. — 2019. — № 1-2. — С. 13-18. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.1.13-18>
2. Определение влажности плодов эфиромасличных растений семейства Сельдереиных инфракрасным методом [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин [и др.] // **Фармация**. — 2020. — Т. 69, № 2. — С. 33-38. DOI: 10/29296/25419218-2020-02-06
3. Жданов, Д. А. Совершенствование отдельных числовых показателей качества некоторых видов лекарственного растительного сырья, содержащих флавоноиды [Текст] / Д. А. Жданов, В. А. Куркин, В. Б. Браславский // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. — 2021. — Т. 24, № 5. — С. 22-30. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-05-03>
4. Разработка и использование инфракрасного термогравиметрического метода определения влажности лекарственного растительного сырья [Текст] / В. Б. Браславский, Д. А. Жданов, В. А. Куркин, Д. В. Росихин // «Перспективы лекарственного растениеводства»: сборник научных трудов Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А. И. Шретера. — М. : ФГБНУ ВИЛАР, 2018. — С. 613-618.
5. Разработка методик определения влажности с использованием инфракрасного термогравиметрического метода на примере плодов расторопши и шиповника [Текст] / В. Б. Браславский, Д. А. Жданов, В. А. Куркин, А. П. Поздеева // «Современные проблемы фармакогнозии»: сборник материалов III Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета (Самара, 27 октября 2018 г.) / под редакцией академика Европейской Академии естественных наук, заслуженного работника высшей школы Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, профессора В. А. Куркина. — Самара : ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2018. — С. 124-129.
6. Определение влажности лекарственного растительного сырья некоторых представителей морфологической группы «Плоды» инфракрасным термогравиметрическим методом [Электронный ресурс] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин, А. П. Поздеева // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. — 2019. — № 4. — С.102-

109. — Режим доступа: <http://s.siteapi.org/7bd21d3a35e453b.ru/docs/mrai0jor01cs44kgkk4ss0wgok8ogc> (дата обращения: 24.03.2021)

7. Стандартизация лекарственного растительного сырья морфологической группы «Плоды» по числовому показателю «Влажность» [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин, А. П. Поздеева. — Текст : непосредственный // «Роль метабомики в совершенствовании биотехнологических средств производства» : сборник трудов II Международной научной конференции. — М. : ФГБНУ ВИЛАР, 2019. — С. 477-483.

8. Определение влажности лекарственного растительного сырья ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.) [Текст] / Д. А. Жданов, А. П. Поздеева, В. Б. Браславский, В. А. Куркин // «Современные проблемы фармакогнозии» : сборник материалов IV Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета. — Самара : ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2019. — С. 167-172.

9. Жданов, Д. А. Определение влажности лекарственного растительного сырья календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) инфракрасным термогравиметрическим методом [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин // «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» : сборник трудов седьмой научной конференции с международным участием. — М. : ФГБНУ ВИЛАР, 2019. — С. 197-201.

10. Определение влажности лекарственного растительного сырья льна посевного [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин, А. П. Поздеева // «Современные достижения фармацевтической науки и практики» : материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (Витебск, 31 окт. 2019 г.) / под ред. А. Т. Щастного. — Витебск : ВГМУ, 2019. — С. 71-72.

11. Жданов, Д. А. Определение влажности лекарственного растительного сырья пижмы обыкновенной с помощью инфракрасного анализатора [Текст] / Д. А. Жданов, А. П. Поздеева // «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» : материалы 72-й научно-практической конференции студентов и молодых учёных (12-13 мая 2020, г. Витебск) / под ред. А. Т. Щастного. — Витебск : ВГМУ, 2020. — С. 728-731.

12. Жданов, Д. А. Инфракрасный термогравиметрический метод определения влажности лекарственного растительного сырья крушины ольховидной (*Frangula alnus* Mill.) [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин // «От растения до лекарственного препарата» : сборник Международной научной конференции. — М. : ФГБНУ ВИЛАР, 2020. — С. 227-231.

13. Инфракрасный термогравиметрический метод определения влажности лекарственного растительного сырья дуба коры (*Quercus cortex*) [Текст] / Д. А. Жданов, А. П. Поздеева, В. Б. Браславский, В. А. Куркин // «Современные проблемы фармакогнозии» : сборник материалов V Межвузовской научно-практической конференции. — Самара : ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. — С. 71-76.

14. Жданов, Д. А. Определение влажности лекарственного растительного сырья девясила высокого (*Inula helenium* L.) инфракрасным термогравиметрическим методом [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин // «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» : сборник трудов седьмой научной конференции. — М. : ФГБНУ ВИЛАР, 2020. — С. 211-216. DOI: 10.52101/9785870190921_2021_8_217

15. Жданов, Д. А. Инфракрасный термогравиметрический метод определения влажности лекарственного растительного сырья мяты перечной (*Mentha piperita* L.) [Текст] / Д. А. Жданов //

Аспирантские чтения – 2020 : материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые: научные исследования и инновации» с международным участием, посвященной 90-летию з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева / под ред. проф. РАН А. В. Колсанова, академика РАН Г. П. Котельникова, доц. Е. Н. Зайцевой. — Самара : СамЛюксПринт, 2020. — С. 251-253.

16. Храбрая, К. Д. Определение влажности солодки корней инфракрасным термогравиметрическим методом [Текст] / К. Д. Храбрая, Д. А. Жданов // «Физика и медицина: создавая будущее» : сборник материалов IV научно-практической конференции студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижеволжский» Самарского государственного медицинского университета и 100-летию кафедры медицинской физики. — Самара : НИЦ LJournal, 2020. — С. 194-197.

17. Zhdanov, D. A. The use of infrared thermogravimetric method for the determination of moisture (Loss on drying) content in medicinal plant raw materials [Текст] / D. A. Zhdanov // «The vital problems of medical science and research» : сборник материалов V Внутривузовской конференции для аспирантов. – Самара : Офорт, 2019. — С. 25-27.

18. Жданов, Д. А. Разработка и использование инфракрасного термогравиметрического метода определения влажности лекарственного растительного сырья на примере плодов расторопши пятнистой [Текст] / Д. А. Жданов // Аспирантские чтения – 2018 : материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Исследования молодых ученых в решении актуальных проблем медицинской науки и практики», посвященной 100-летию университетского образования Самарской области / под ред. Г. П. Котельникова, Ю. В. Щукина, И. Л. Давыдкина и др. – Самара : Офорт, 2018. – С.124-125.

19. Жданов, Д. А. Разработка методики определения влажности лекарственного растительного сырья с использованием инфракрасного термографического влагомера [Текст] / Д. А. Жданов // «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» : сборник материалов XII Всероссийской студенческой научной конференции с международным участием / под ред. академика РАН, проф. Г. П. Котельникова и проф. В. А. Куркина – Самара : Офорт, 2018. – С. 147-148.

20. Поздеева, А. П. Применение ИК-излучения в определении влажности лекарственного растительного сырья [Текст] / А. П. Поздеева, Д. А. Жданов // «Физика и медицина: создавая будущее» : сборник материалов II научно-практической конференции студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижеволжский», приуроченной к 100-летию Самарского государственного медицинского университета и 100-летию кафедры медицинской физики / под ред. академика РАН, проф. Г.П. Котельникова, проф. А.Н. Волобуева, доц. Е.Л. Овчинникова, проф. В. А. Калинина. – Самара : НИЦ LJournal, 2018. – С. 211-212.

21. Жданов, Д. А. Разработка методик определения влажности лекарственного растительного сырья с применением инфракрасного излучения [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, В. А. Куркин // «Гаммермановские чтения» : сборник научных трудов IV научно-методической конференции. – М. : Русайнс, 2019. – С. 119-120.

22. Определение остаточной влаги в лекарственном растительном сырье новым ИК-термогравиметрическим методом фармакопейного анализа [Текст] / А. П. Поздеева, В. А. Куркин, В. Б. Браславский, Д. А. Жданов // Естественные и технические науки : тезисы докладов XLV-й Самарской област. науч. конф. Самара, 9-19 апреля 2019 года. Часть I /под ред. А. Ф. Крутова. – Самара: Самарама, 2019. – С. 11-12.

23. Жданов, Д. А. Определение влажности цветков ромашки аптечной и календулы лекарственной инфракрасным термогравиметрическим методом [Текст] / Д. А. Жданов, А. П. Поздеева, К. Д. Храбрая // «Физика и медицина: создавая будущее» : сборник материалов III научно-практической конференции студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижевожский» Самарского государственного медицинского университета / под ред. проф. РАН, проф. А. В. Колсанова, академика РАН, проф. Г. П. Котельникова, проф. А. Н. Волобуева, доц. Е. Л. Овчинникова.. — Самара : НИЦ LJournal, 2019. — С. 211-212.

24. Жданов, Д. А. Определение влажности плодов аниса обыкновенного (*Anisum vulgare* Gaertn.) инфракрасным термогравиметрическим методом [Текст] / Д. А. Жданов // Аспирантские чтения – 2019 : сборник материалов всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые: научные исследования и инновации», посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета / под ред. проф. РАН А. В. Колсанова, академика РАН Г. П. Котельникова. – Самара : Офорт, 2019. – С. 257-258.

25. Жданов, Д. А. Определение влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья в современной фармакогнозии [Текст] / Д. А. Жданов, В. Б. Браславский, А. П. Поздеева // «Природные соединения и здоровье человека» : сборник материалов всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 100-летию образования ИГМУ. – Иркутск: ИГМУ, 2019. – Вып. 1. – С. 49.

Патенты

1. Пат. 2695662 Российская Федерация, МПК G01N 33/15, G01N 25/56. Способ определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья плодов расторопши пятнистой [Текст] / Куркин В. А., Браславский В. Б., Жданов Д. А.; заявитель и патентообладатель СамГМУ. – № 2019112566; заявл. 24.04.2019; опубл. 25.07.2019, Бюл. № 21. – 9 с.: ил.

2. Пат. 2725133 Российская Федерация, МПК G01N 33/15, G01N 25/56. Способ определения влажности воздушно-сухого лекарственного растительного сырья плодов эфиромасличных растений семейства Сельдереиных [Текст] / Жданов Д. А., Браславский В. Б., Куркин В. А., Поздеева А. П.; заявитель и патентообладатель СамГМУ. – № 2019145632; заявл. 30.12.2019; опубл. 30.06.2020, Бюл. № 19. – 12 с.: ил.