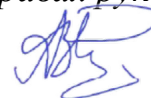


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»

На правах рукописи



Никулин Александр Владимирович

**Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения
на основе современных инструментальных методов аналитической химии и
теоретических методов квантовой химии**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
доктор фармацевтических наук
Потанина Ольга Георгиевна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СУБСТАНЦИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. КВАНТОВАЯ ХИМИЯ КАК ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИК АНАЛИЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 18 |
| 1.1. Инструментальные методы определения металлов в фармацевтических объектах природного происхождения..... | 18 |
| 1.2. Определение анионов, имеющих значение в фармации | 29 |
| 1.3. Методы определения суммы восстанавливающих сахаров и полисахаридов..... | 34 |
| 1.4. ВЭЖХ с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим детекторами для целей определения гидроксилсодержащих ароматических соединений в природных объектах (арбутин, антоцианы)..... | 39 |
| 1.5. Квантово-химические методы исследования молекул природного происхождения..... | 52 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ И РЕАКТИВЫ, МЕТОДЫ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 63 |
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛРС..... | 69 |
| 3.1. Выбор условий кислотного разложения ЛРС в условиях МВ- нагрева..... | 69 |
| 3.2. Разработка методики количественного определения макроколичеств элементов методом АЭС-ИСП..... | 71 |
| 3.3. Разработка методики количественного определения кремния спектрофотометрическим методом..... | 118 |
| 3.4. Разработка методики количественного определения наноколичеств кадмия, свинца, мышьяка методом ЭТААС..... | 129 |

| | |
|--|-----|
| ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ, БРОМИДОВ, ЙОДИДОВ МЕТОДОМ ИОНОМЕТРИИ..... | 149 |
| 4.1. Определение нитратов и бромидов в субстанциях природного происхождения..... | 149 |
| 4.2. Разработка методики определения йодидов в слоевищах ламинарии..... | 156 |
| ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ..... | 166 |
| 5.1. Разработка спектрофотометрической методики определения суммы восстанавливающих сахаров | 166 |
| 5.2. Квантово-химическое исследование спектрофотометрической методики определения сахаров..... | 178 |
| 5.3. Гравиметрическое определение полисахаридов..... | 191 |
| 5.4. Определение глюкозамин сульфата методом ВЭЖХ/МС в геле для наружного применения..... | 208 |
| ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРБУТИНА, АНТОЦИАНОВ В ЛРС МЕТОДОМ ВЭЖХ/МС/УФ..... | 223 |
| 6.1. Определение арбутина методом ВЭЖХ/МС в листьях толокнянки..... | 223 |
| 6.2. Квантово-химическое исследование процессов масс-фрагментации арбутина в условиях ионизации типа «Электроспрей»..... | 235 |
| 6.3. Определение арбутина методом ВЭЖХ/УФ в ЛРС..... | 242 |
| 6.4. Определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения..... | 259 |
| ГЛАВА 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РУТИННОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РАЗРАБОТАННЫХ МЕТОДИК В ЗАВОДСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ..... | 279 |
| 7.1. Пробоподготовка ЛРС к определению микроэлементов..... | 280 |
| 7.2. Определение кадмия, свинца, мышьяка..... | 283 |
| 7.3. Определение суммы восстанавливающих сахаров. Выделение полисахаридов из ЛРС..... | 284 |
| 7.4. Определение арбутина и суммы антоцианов в ЛРС..... | 287 |

| | |
|--|-----|
| 7.5. Квантово-химические расчеты..... | 288 |
| ОБЩИЕ ВЫВОДЫ..... | 293 |
| СПИСОК РАБОТ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ..... | 299 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 302 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 304 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А. Примеры использования инструментальных методов анализа для определения элементов, арбутина, антоцианов в ЛРС..... | 342 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Проекты общих фармакопейных статей..... | 347 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты внедрения..... | 378 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Дополнительная литература..... | 386 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Требования, предъявляемые к качеству лекарственного растительного сырья (ЛРС) и препаратов из них, в последнее десятилетие существенно повысились, что связано со значительным ухудшением экологической обстановки в районах заготовок ЛРС и, как следствие, необходимостью повышения надежности данных анализа как по содержанию экотоксикантов, так и по содержанию действующих веществ. Повышение требований к контролю качества ЛРС и фитопрепаратов диктует необходимость внедрения современных инструментальных аналитических методов и методик контроля качества. Традиционно применяемые методы в анализе ЛРС (например, титриметрия) не достаточно селективны по отношению к аналиту на фоне многокомпонентной матрицы, не редко требуют трудоемкой пробоподготовки, трудно поддаются автоматизации. Наиболее часто применяемый в анализе ЛРС инструментальный метод – спектрофотометрия, характеризуется относительной простотой и дешевизной. Однако методики, разработанные на его основе, также зачастую трудоемки. Поэтому тенденция к разработке альтернативных инструментальных методик, наметившаяся еще в ГФ XIII, продолжилась в ГФ XIV. Так, например, согласно ГФ XIV метод – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) используется для определения действующих веществ в следующем сырье: корнях и корневищах валерианы лекарственной, траве донника, плодах и семенах лимонника китайского, корнях и корневищах рапontiкума сафлоровидного, корнях и корневищах родиолы розовой, корнях и корневищах элеутерококка колючего. Несмотря на наметившийся тренд к применению современных автоматизированных методов к анализу ЛРС, для определения индивидуальных веществ, например, арбутина, а также суммы антоцианов в ГФ XIV все еще используется длительная спектрофотометрическая методика, поскольку альтернативных методик для стандартизации ЛРС на основе ВЭЖХ-метода в ГФ XIV не представлено. Подобная ситуация наблюдается и при необходимости определить в ЛРС эссенциальные

элементы, необходимые для нормального развития организма. Так, богатая биологически доступным кремнием трава хвоща полевого согласно ГФ XIV стандартизируется только по флавоноидам, что делает весьма актуальным разработку инструментальной методики определения этого элемента в данном виде ЛРС. Еще одним примером являются слоевища ламинарии, которые содержат значительное количество йода, в том числе в форме легко усваиваемых йодидов. Однако определение йодидов в данном виде сырья не предусмотрено.

Оценка качества ЛРС согласно ГФ XIV производится не только по результатам определения содержания биологически активных веществ, но и по содержанию, например, опасных неорганических экотоксикантов. При определении тяжелых металлов и мышьяка относительно недорогим методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ЭТААС) условия пробоподготовки и определения, рекомендуемые в ГФ XIV, не являются оптимальными, так как не учитывают физико-химических свойств элементов. В тоже время наиболее часто применяемый за рубежом метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) практически не доступен лабораториям, занимающимся рутинным контролем качества сырья.

Перспективным направлением стандартизации ЛРС является использование максимально автоматизированных унифицированных методик анализа, разработанных на основе экономически выгодных инструментальных методов, что позволило бы при одинаковых инструментальных параметрах и сходных условиях пробоподготовки определять один тип аналитов в ЛРС. В ГФ XIV существуют ОФС, где применяется унифицированный подход для определения некоторых групп действующих веществ, а именно суммы дубильных веществ и эфирных масел. В данных статьях приводятся общие процедуры пробоподготовки и методики определения (конкретизация деталей: навеска, измельченность сырья и др., – приведены в ФС на конкретные виды лекарственного растительного сырья). Однако по другим группам биологически активных веществ соответствующих ОФС в ГФ XIV не приведено.

При разработке унифицированных методик количественного определения необходимо использовать теоретические подходы, позволяющие связать строение молекул определяемых веществ со свойствами, определяющими аналитический сигнал. Это позволяет не только ускорить разработку методик, но и в значительной степени объяснять и прогнозировать наблюдаемые в реальном эксперименте эффекты. Одним из современных разделов теоретической химии, обладающим набором необходимых методов, является квантовая химия, которая объясняет химические и физико-химические явления с позиций квантовой механики.

Таким образом, все вышеизложенное указывает на необходимость систематических исследований по разработке современных унифицированных инструментальных методик анализа субстанций природного происхождения для целей стандартизации и повышения качества сырья. Очевидно, что использование современных аналитических методов предполагает и теоретическое обоснование с применением квантово-химических методов.

Степень разработанности темы исследования

Анализ литературных данных показал, что в рутинном контроле качества в условиях заводских лабораторий наиболее широко распространена спектрофотометрия, что и отражается в ОФС, приведенных в ГФ XIV. Значительное распространение спектрофотометрии в фармакогнозии обусловлено относительной простотой и дешевизной метода, а также необходимостью во многих случаях определять сумму всех биологически активных веществ. Этот метод обладает рядом недостатков: он трудно поддается автоматизации (что важно при большом потоке образцов), требует трудоемкой пробоподготовки и не всегда позволяет получать результаты с приемлемой точностью. Более современным инструментальным методом, позволяющим до некоторой степени нивелировать указанные недостатки, является ВЭЖХ. ВЭЖХ также предоставляет более широкие возможности для унификации инструментальных условий определения одних и тех же аналитов в разных группах ЛРС, что очень удобно для лабораторий, занимающихся рутинным контролем качества и стандартизацией субстанций природного происхождения. Однако вопросу унификации как в отечественной, так

и зарубежной литературе уделяется недостаточно внимания – большинство авторов ограничиваются разработкой конкретной методики для определенного вида ЛРС.

Подобная ситуация наблюдается не только при определении биологически активных веществ, но и при анализе растительного материала на содержание эссенциальных элементов, тяжелых металлов. В РФ значительный шаг в направлении унификации методик элементного анализа ЛРС был сделан И. А. Самылиной, И. В. Гравель и их учениками. Ими на основании собственных исследований были подготовлены ОФС, в которых были включены разнообразные методики пробоподготовки и условия атомно-абсорбционного определения тяжелых металлов в ЛРС. Однако, эти методики и условия определения недостаточно унифицированы и оптимизированы, поскольку не учитывают физико-химические свойства элементов, что может приводить к потерям аналитов на стадии пробоподготовки, а также получению недостаточно воспроизводимых и точных результатов на стадии определения, в частности методом ЭТААС. В силу химических свойств некоторые элементы, например, кремний, не могут быть надежно определены атомно-спектральными методами без сложной дорогостоящей модификации оборудования, что недоступно по экономическим соображениям отечественным производителям ЛРС. Здесь более уместным является использование метода спектрофотометрии, но в зарубежной и отечественной литературе имеется не так много работ, посвященных спектрофотометрическому определению кремния в фармакогностических объектах. Исследованию содержания анионов (бромидов, нитратов) методом ионометрии уделяется не так много внимания. По-прежнему остаются проблемы при определении полисахаридов в целях стандартизации методом гравиметрии.

Таким образом, методологические подходы к разработке унифицированных методик анализа субстанций растительного происхождения требуют дальнейшего активного изучения, а общий теоретический алгоритм процедуры анализа, который необходим в целях контроля качества и стандартизации ЛРС, должен быть научно обоснован.

Цель и задачи исследования

Целью работы является комплексные экспериментальные и теоретические исследования в области совершенствования стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии.

Для решения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1) провести анализ и обобщить литературные данные по методам и методикам определения эссенциальных элементов, тяжелых металлов (кадмия, свинца, мышьяка), биологически активных веществ в сырье: арбутина, восстанавливающих сахаров и полисахаридов, антоцианов;

2) подобрать и детализировать условия пробоподготовки ЛРС к последующему определению эссенциальных элементов методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) и тяжелых металлов методом ЭТААС; подобрать и детализировать инструментальные условия определения; валидировать разработанные методики; предложить нормы для тяжелых металлов, содержащихся в ЛРС;

3) разработать и валидировать спектрофотометрическую методику определения кремния в кремнефильном ЛРС; предложить норму для содержания кремния в траве хвоща полевого;

4) исследовать возможности применения ионометрии для определения бромидов, нитратов, йодидов в субстанциях природного происхождения с целью ее дальнейшего использования при стандартизации;

5) оптимизировать условия пробоподготовки, разработать и валидировать унифицированную методику определения суммы восстанавливающих сахаров на основе метода Дюбуа в ЛРС; предложить нормы содержания восстанавливающих сахаров для субстанций природного происхождения; провести квантово-химические исследования физико-химических процессов, лежащих в основе формирования аналитического сигнала; улучшить условия осаждения и очистки осадков при гравиметрическом определении полисахаридов с целью обеспечения более точных результатов анализа;

6) предложить условия и разработать методику определения глюкозамина сульфата в геле для наружного применения методом ВЭЖХ/МС; исследовать наблюдаемые процессы масс-фрагментации квантово-химическими методами;

7) подобрать унифицированные хроматографические условия, разработать и валидировать методику количественного определения арбутина методом ВЭЖХ/УФ/МС; объяснить масс-фрагментацию арбутина с помощью квантово-химических расчетов; рекомендовать нормы по содержанию арбутина в арбутинсодержащем ЛРС;

8) изучить влияние параметров и предложить унифицированные условия хроматографического разделения антоцианов в извлечениях, полученных из ЛРС; разработать и валидировать методику количественного определения суммы антоцианов методом ВЭЖХ/УФ; рассмотреть возможность нормирования содержания суммы антоцианов по результатам анализа антоцианосодержащих субстанций природного происхождения методом ВЭЖХ/УФ;

9) предложить обобщенный алгоритм разработки унифицированных методик анализа с использованием современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии; представить рекомендации по использованию разработанных методик в лабораториях, специализирующихся на контроле качества и стандартизации субстанций природного происхождения. На основе полученных результатов подготовить Фармакопейные статьи (ФС) и Общие фармакопейные статьи (ОФС) к Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ).

Научная новизна исследования

Получены новые экспериментальные данные на основании анализа более 30 образцов фармакопейного и нефармакопейного ЛРС, которые показывают преимущества использования принципа унификации методик при применении современных инструментальных методов. Изучены и предложены условия пробоподготовки анализируемых образцов, позволяющие получать наиболее удобные для последующего определения методами АЭС-ИСП и ЭТААС формы элементов (нитраты), и обеспечивающие плавный подъем температуры до

необходимого значения, что дает возможность избежать разгерметизации сосудов с последующим выбросом реакционной массы, вследствие неконтролируемого роста давления. Подобраны условия определения эссенциальных элементов методом АЭС-ИСП и тяжелых металлов (кадмия, свинца, мышьяка) методом ЭТААС, которые (в отличие от методик, изложенных в ГФ XIV) являются более удобными, унифицированными, и при этом позволяющими обеспечивать удовлетворительные метрологические характеристики результатов анализа. Впервые разработана и предложена к использованию в фармакогнозии спектрофотометрическая методика, характеризующаяся устойчивым аналитическим сигналом, количественного определения кремния в траве хвоща полевого. Впервые предложены методики для полуколичественной оценки содержания бромидов и нитратов в ЛРС. С помощью разработанных методик было установлено, что содержание бромидов во всех образцах субстанций природного происхождения было ниже терапевтического уровня, однако их влияние может быть учтено при синергизме всех действующих веществ в ЛРС. Впервые предложена ионометрическая методика определения йодидов в слоевищах ламинарии. Впервые разработана и предложена к использованию в фармакогнозии унифицированная методика определения суммы восстанавливающих сахаров на основе метода Дюбуа, отличающаяся безопасностью, простотой выполнения, меньшей трудоемкостью. Предложена новая процедура получения более «чистых» осаждаемых и гравиметрических форм полисахаридов, а также унифицированный осадитель при гравиметрическом определении суммы полисахаридов. Получены ИК-спектры выделенных полисахаридов и впервые предложено дополнительно использовать ИК-спектроскопию для определения их подлинности (одновременно с количественным определением). Впервые разработаны и предложены к фармакогностическому применению ВЭЖХ-методики определения арбутина и суммы антоцианов в ЛРС; рекомендованы более простые хроматографические условия разделения, одинаковые для всех видов арбутин- и антоциансодержащего сырья. Представлена методика «мягкого» извлечения антоцианов из сырья без использования кислот и нагревания, позволяющего снизить риск разрушения

аналитов. Показано, что разработанный метод пробоподготовки, а также методы пробоподготовки, рекомендованные в ГФ XIV, хорошо сочетаются с выбранными унифицированными условиями определения суммы антоцианов методом ВЭЖХ/УФ. Выявлены закономерности в формировании аналитического сигнала с позиций «структура-свойство» при определении аналитов спектрофотометрическим и ВЭЖХ/МС методами на основе методов квантовой химии. Предложен общий алгоритм разработки инструментальных методик для стандартизации ЛРС с учетом многокомпонентности анализируемых объектов, принципа унификации и методологии современной квантовой химии.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость исследования заключается в научном обосновании проведенной разработки методик анализа и стандартизации ЛРС с использованием современных инструментальных методов (АЭС-ИСП, ЭТААС, ВЭЖХ/УФ/МС, ионометрии, спектрофотометрии), который включает помимо экспериментальных исследований применение теоретических квантово-химических расчетов. Для теоретического описания физико-химических процессов, оказывающих влияние на формирование аналитического сигнала, разработана теоретическая процедура, позволяющая применять методы квантовой химии. В результате проведенных исследований был предложен обобщенный теоретический алгоритм, позволяющий осуществлять разработку унифицированных методик анализа субстанций природного происхождения. Разработанные подходы совершенствования стандартизации ЛРС по содержанию арбутина и суммы антоцианов и других БАВ, а также предлагаемые в работе процедуры квантово-химических расчетов могут быть использованы при разработке и совершенствовании подходов и других групп биологически активных веществ.

Предложены новые для фармакогнозии методики, позволяющие упростить процедуру анализа в рутинном контроле качества ЛРС, содержащего различные группы биологически активных веществ, за счет одинаковых инструментальных условий определения одних и тех же биологически активных веществ в ЛРС и построения процедур пробоподготовки по единой схеме, которые будут отличаться

детальями (степень измельчения, тип экстрагента, соотношение сырье:экстрагент, кратность экстракции и т. д.). При анализе ЛРС на содержание эссенциальных элементов и тяжелых металлов, а также полуколичественной оценки сырья на содержание нитратов и бромидов предложены полностью унифицированные методики.

Методология и методы исследования

В процессе исследования применялась общенаучная методология – сравнение, сопоставление, анализ. Методология исследования также базировалась на анализе литературных данных, оценке степени изученности и актуальности темы исследования. Теоретическую основу исследования составили как труды зарубежных (M. Dubois, M.J.S. Dewar, A.D. Becke, A. Filipiak-Szok, E. Kenndler, H.M. Kingston и др.), так и ведущих российских исследователей (И.В. Гравель, И.А. Самылина, А.В. Куркин, К.И. Эллер, В.И. Дейнека и др.), нормативная документация, входящая в импортные и отечественную фармакопеи.

В качестве объектов исследования в работе использовались субстанции природного происхождения различных морфологических групп.

В работе использованы современные инструментальные методы анализа (АЭС-ИСП, ЭТААС, ионометрия, УФ/ВИД-спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ/УФ/МС), теоретические методы квантовой химии (PM3, B3LYP), международная и российская нормативная документация на ЛРС. Для валидации разработанных методик и статистической обработки результатов использовали ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» и ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ РФ XIV изд.

Основные положения, выносимые на защиту

– результаты разработки унифицированной методики количественного определения элементов методами АЭС-ИСП, ЭТААС. Результаты определения кремния методом спектрофотометрии;

– результаты исследований по определению нитратов, бромидов, йодидов методом ионометрии; рекомендации по возможному использованию полученных результатов при стандартизации ЛРС по данным группам БАВ;

– результаты разработки унифицированной методики количественного определения арбутина методом ВЭЖХ;

– результаты разработки унифицированной спектрофотометрической методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров по методу Дюбуа; глюкозамина сульфата в геле для наружного применения методом ВЭЖХ/МС;

– результаты исследований по выбору унифицированных условий осаждения полисахаридов для их последующего определения методом гравиметрии;

– результаты по исследованию влияния ультразвуковой обработки на извлечение антоцианов из субстанций природного происхождения в отсутствие использования нагревания и кислот и разработке количественной методики определения антоцианов с использованием метода ВЭЖХ/УФ;

– результаты теоретических расчетов процессов, оказывающих влияние на формирование аналитического сигнала, при определении действующих веществ спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ/МС на основе квантово-химических моделей молекул.

Достоверность научных положений и выводов

Достоверность результатов подтверждена многократными экспериментами с применением современных инструментальных и физико-химических методов анализа и их сопоставлением с данными научной литературы, достаточным объёмом публикаций, статистической обработкой результатов исследований. Научные положения и выводы диссертации основываются на большом числе анализов, выполненных с помощью разработанных унифицированных методик.

Экспериментальные исследования выполнялись автором на поверенных приборах и аттестованном оборудовании с подтверждением соответствующими

документами. Отчеты о валидации методик, разработанных автором, свидетельствуют о воспроизводимости и достоверности результатов.

Апробация результатов исследования

Результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях: третьей научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века», Москва, 2015; международной конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине, Москва, 2016; XI международной пироговской конференции, Москва, 2016; 20 международном конгрессе «Phytopharm», Санкт-Петербург, 2016; четвертой научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века», Москва, 2016; объединенным 16 международном симпозиуме по содержанию следовых количеств элементов в человеке и животных (ТЕМА-16), 12 конференции международного общества по исследованию следовых количеств элементов в человеке (ISTERH 2017) и 13 конференции северного общества по исследованию следовых количеств элементов (NTES 2017), Санкт-Петербург, 2017; XXVIII московской международной гомеопатической конференции, Москва, 2018; 7 международной научно-методической конференции «Фармообразование», Воронеж, 2018; 22 международном конгрессе «Phytopharm», Хорген, 2018; международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке», Москва, 2018; международной научной конференцией «Перспективы лекарственного растениеводства», 2018; 23 международном конгрессе «Phytopharm», Санкт-Петербург, 2019; 2 международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке», Москва, 2019. Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ЦКП (НОЦ) РУДН 20.07.2021 г.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в постановке задачи исследования, получении и обобщении экспериментальных и расчетных данных. В научных исследованиях, выполненных совместно с другими авторами, автором лично проведено планирование экспериментов по разработке методик, выполнен анализ

полученных результатов. Вклад автора на всех этапах экспериментальных и теоретических исследований, а также внедрения в практическую деятельность является определяющим.

Внедрение результатов исследования

Подготовлены проекты ОФС для Государственной фармакопеи следующего издания, а именно: ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье», ОФС «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом», ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ», ОФС «Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ», изменение к ФС «Бадана толстолистного корневища». Также унифицированная ЭТААС методика определения кадмия, свинца, мышьяка и унифицированная ВЭЖХ/УФ методика определения антоцианов в ЛРС внедрена в деятельность АО «Фармцентр ВИЛАР». Спектрофотометрическая методика количественного определения кремния (в пересчете на SiO_2) в траве хвоща полевого, унифицированная ВЭЖХ/УФ методика определения арбутина и унифицированная спектрофотометрическая методика определения суммы восстанавливающих сахаров (на основе фенол-сернокислого метода) в ЛРС внедрены в работу Испытательного центра ФГБНУ ВИЛАР. Унифицированная АЭС-ИСП методика определения эссенциальных элементов в ЛРС внедрена в ЦКП (НОЦ) РУДН.

Результаты внедрены в учебные процессы ФГАОУ ВО «Северо-Восточного федерального университета им. М. К. Аммосова (отделение «Фармация»), Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МО РФ (кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты исследования, приведенные в диссертации, соответствуют паспорту специальности, конкретно п. 2, 3, 6, 7.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках плана и в соответствии с направлением научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ЦКП (НОЦ) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГАОУ ВО «РУДН»).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 341 страницах печатного текста (с учетом Приложений – 386), содержит 117 таблиц и 135 рисунков. Работа включает в себя введение, обзор литературы, главу, в которой приводится описание реактивов, приборов и материалов, 4 главы, включающих экспериментальные данные, одну теоретическую главу, общие выводы, список сокращений, список опубликованных работ по теме диссертации, 4 приложения и список литературы, включающий 343 источника.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 20 работ, в том числе научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук – 6; статей в изданиях, индексируемых в международных базах данных – 13, обзорная статья в МБД Scopus – 1 .

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СУБСТАНЦИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. КВАНТОВАЯ ХИМИЯ КАК ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИК АНАЛИЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Инструментальные методы определения металлов в фармацевтических объектах природного происхождения

К концу двадцатого столетия проблема наличия элементных примесей в фармацевтических объектах стала столь актуальной, что потребовалась разработка специального международного руководства по элементным примесям (Guideline for elemental impurities ICH Q3D) [174], в котором приводится допустимое содержание примеси исходя из допустимой ежедневной экспозиции (ДЕЭ) [305].

Согласно ICH Q3D все возможные в фармацевтической практике элементные примеси были разделены на несколько классов в зависимости от опасности, которые они представляют для человека. В класс 1 входят наиболее токсичные тяжелые металлы: кадмий, свинец, мышьяк, ртуть, определение которых обязательно во всех потенциальных источниках поступления. Класс 2 разделен на две большие подгруппы: класс 2А и класс 2Б. К классу 2А принадлежат элементы менее токсичные, чем элементы 1 класса – кобальт, никель, ванадий, вероятность элиминирования которых из материалов оборудования высока. К классу 2Б относятся элементы, крайне редко встречающихся в природе, а также в обычной фармацевтической практике и единственно возможным вариантом поступления которых являются остаточные вещества катализаторов (серебро, золото, металлы платиновой группы, селен и таллий). К классу 3 относятся нетоксичные и малотоксичные элементы, определение которых необходимо только для определенных путей введения (барий, медь, хром, олово, литий, молибден, сурьма). Хотя в руководстве ICH Q3D иные металлы не перечислены, тем не менее заметное токсическое действие могут оказывать и другие элементы [2, 47]. В ГФ XIV в

субстанциях растительного происхождения нормируется только содержание кадмия, свинца, мышьяка, ртути (1,0 мг/кг для Cd, 6,0 мг/кг для Pb, 0,5 мг/кг для As, 0,1 мг/кг для Hg) [11]. Для ламинарии норма содержания мышьяка увеличена до 90 мг/кг поскольку она, будучи природным геохимическим барьером, концентрирует этот элемент в значительном количестве [12]. В ряде фармакопей мира [20] помимо указанных тяжелых металлов также регламентируется содержание цинка, меди, железа, марганца (в Индии), меди, железа [56], марганца (в Австрии), никеля, цинка (в Польше) [31].

Очевидно, что ЛРС является комплексным источником, в котором помимо токсичных элементов, могут находиться и элементы, необходимые для нормальной жизнедеятельности организма (например, алюминий, калий, кальций, магний, марганец, медь, железо, цинк) [305]. В отличие от токсичных кадмия, свинца, мышьяка и ртути, жизненно необходимые элементы должны находиться на гораздо более высоких уровнях содержаний. Сложность состава, различия в уровнях содержаний элементов требуют использования современных методов определения.

К числу наиболее распространенных в фармацевтическом анализе спектральных методов относятся «атомно-абсорбционная спектрометрия с пламенной (ПААС) и электротермической атомизацией (ЭТААС), атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП)» [53]; в качестве метода пробоподготовки наиболее перспективным является кислотное разложение образцов в закрытых системах в условиях микроволнового нагрева (МВ-нагрев) [36, 120, 194]. В ЕР [56] для определения элементов в субстанциях природного происхождения последние разлагают с использованием добавки серной кислоты, что приводит к высаждению некоторых аналитов, например свинца сульфата (II); программы для перевода образцов в условиях МВ-нагрева в раствор прописаны неполностью – приводятся время нагрева, мощность магнетрона (в настоящее время необязательно, так как современное оборудование регулирует его автоматически исходя из температур в тефлоновых сосудах), а температуры не прописываются. Недостатки присутствуют и на стадии определения. Анализ на содержание мышьяка

рекомендуется выполнять в гидридных приставках, что не достаточно рационально, поскольку мышьяк может быть определен методом ЭТААС; завышенные температуры термообработки (800 °С) и атомизации, приведенные в ЕР, для ЭТААС-определения кадмия и тем более свинца, обладающего повышенной летучестью, как в отсутствии, так и в присутствии модификаторов (смесь нитрата магния и дигидрофосфата аммония) приводит к потерям элементов и, соответственно, к искажению полученных результатов. Подобная ситуация наблюдается и в ГФ XIV. Так, до сих пор широко применяется пробоподготовка в открытых системах, что чревато потерями нанограммовых количеств аналитов; автоклавное разложение с использованием труднолетучей серной кислоты, не позволяющей получать устойчивые формы элементов – кадмия, свинца, мышьяка, взрывоопасной хлорной кислоты; трубок Кариуса/колб Кьельдаля. Все эти методы и подходы отражены в ГФ XIV. Они длительны и не позволяют автоматизировать процесс пробоподготовки, что было бы весьма полезно в условиях заводских лабораторий, занимающихся рутинным анализом ЛРС. Все эти недостатки позволяет преодолеть использование кислотного разложения образцов азотной кислотой, помещенных в микроволновое поле.

«Микроволновое излучение (МВИ) – это вид электромагнитного излучения. Оно представляет собой неионизирующее излучение, которое вызывает движение молекул за счет перемещения ионов и вращения диполей, но не приводит к изменениям в структуре молекул. Частоты микроволнового излучения лежат в диапазоне 300–300000 МГц. Из этих частот наиболее часто используется частота 2450 МГц» [71, 199]. При прохождении МВИ через образец энергия поглощается в соответствии с коэффициентом поглощения, представляющего собой отношение величины диэлектрических потерь образца к диэлектрической постоянной. При этом «в образце наблюдаются потери микроволновой энергии, происходящие по двум механизмам: ионной проводимости и дипольного вращения. Поскольку ионная проводимость представляет собой электрофоретическую миграцию ионов в растворе при наложении электромагнитного поля, то и потери ею обусловленные, зависят от размера, заряда, концентрации и удельной электропроводности

растворенных ионов, а также от взаимодействия ионов с молекулами растворителя. Потери, связанные с вращением диполей, возникают благодаря определенной ориентации молекул, имеющих постоянный или наведенный дипольный момент, в электромагнитном поле» (Неудачина Л. К. и др., 2011, Приложение Г). Сочетание этих потерь позволяет осуществлять быстрый объемный нагрев, сократить процесс пробоподготовки с нескольких часов до нескольких минут и получить устойчивые хорошо растворимые формы аналитов, решить проблему потерь определяемых элементов, контаминации проб и загрязнения окружающей среды в процессе подготовки анализируемого материала к определению. Более того, кислотное разложение в условиях МВ-нагрева позволяет обеспечить наиболее простое сочетание с современными спектральными методами анализа – АЭС-ИСП, МС-ИСП, ЭТААС.

Для получения устойчивых, хорошо растворимых форм элементов наиболее перспективным является использование концентрированной азотной кислоты в качестве эффективного окисляющего агента.

«Азотная кислота является сильным окислителем и широко используется для перевода в раствор (в виде растворимых нитратов, как было указано выше) микроэлементов из биологических материалов. Азотная кислота – одна из немногих кислот, для которых достижима сверхвысокая степень чистоты, что необходимо при определении малых содержаний элементов. Азотная кислота идеально ведет себя под действием микроволнового излучения. В закрытом сосуде при давлении около 5 атм азотная кислота может достичь температуры 176 °С, что более чем на 50 °С превышает температуру ее кипения. При повышении температуры возрастает окислительный потенциал, и реакции протекают быстрее» [177]. Для дополнительного повышения окислительного потенциала также вводится небольшая добавка перекиси водорода концентрированной.

Учитывая требования фармакопей к уровню содержания тяжелых металлов в субстанциях природного происхождения (Pb 6,0, Cd 1,0, Hg 0,1, As 0,5 мг/кг) можно заключить, что методы АЭС-ИСП и ПААС не пригодны для определения

ультранизких содержаний кадмия, свинца и мышьяка вследствие их низкой чувствительности.

Метод МС-ИСП является одним из основных современных методов определения следов элементов. Развитию этого метода в последнее время уделяют большое внимание благодаря его несомненным достоинствам: высокой чувствительности, экспрессности (многоэлементный режим анализа), широкому динамическому диапазону (5–7 порядков) [236]. В чистых растворах метод МС-ИСП для металлов позволяет обеспечить предел обнаружения на уровне ppt. Однако реализовать столь низкие пределы обнаружения на практике в подавляющем большинстве случаев не удастся, что обусловлено влиянием различных факторов на формирование аналитического сигнала. В МС-ИСП различают два основных типа помех: матричные эффекты и полиатомные интерференции [54, 75, 108]. Матричные эффекты обусловлены необходимостью физического перемещения ионов, образовавшихся в аргоновой плазме, через систему конусов (самплер и скиммер) в часть прибора, находящуюся под вакуумом. «Образующийся в высоковакуумной части масс-спектрометра между скиммером интерфейса и экстрактором объемный заряд, влияет на траекторию ионов аналита, что приводит к искажениям аналитического сигнала. Объемный заряд определяется составом аргоновой плазмы и состоит из однозарядных ионов аргона Ar^+ . Появление в анализируемом растворе матричного элемента увеличивает концентрацию его ионов в области объемного заряда. В результате плотность объемного заряда повышается и рассеяние всех ионов на нем увеличивается» [54]. «Наличие матричных элементов в анализируемом растворе также приводит к необратимым изменениям кривой чувствительности масс-спектрометра из-за осаждения элементов на рабочих поверхностях конусов интерфейса» [56]. Последнее является причиной общего снижения чувствительности. Полиатомные интерференции являются «следствием образования в плазме значительных количеств возбужденных атомов, ионов аргона, водорода, кислорода, азота, двух- и трехзарядных ионов» [27, 75, 85, 207]. «Эти ионы при прохождении интерфейса вступают в различные плазмохимические реакции, давая полиатомные ионы,

которые обладают таким же отношением массы к заряду, что и изотопы определяемых элементов, выбранных в качестве аналитических» [54]. Последнее приводит к артефактам при количественном анализе. Недостатки МС-ИСП обусловили необходимость поиска приемов учета влияний [85]. Самые распространенные приемы учета влияний – это использование реакционно-столкновительных ячеек, механизм работы которых определяется типом используемого газа [207]; математическое моделирование; применение систем десольватации, позволяющих получить «сухую» плазму и, тем самым, в значительной степени уменьшить влияние кислородсодержащих молекулярных ионов на аналитические сигналы определяемых элементов. Однако использование этих методов не является универсальным подходом и проблема устранения матричных влияний по-прежнему остается нерешенной [109]. Использование двойной фокусировки позволяет существенно улучшить разрешение по массам по сравнению с квадрупольными фильтрами, но приводит к существенному уменьшению чувствительности – при увеличении разрешения [54] ($m/\Delta m$) на порядок чувствительность определения снижается примерно на такую же величину [109, 231]. Корректировка полиатомных влияний возможна с помощью широко распространенного в настоящее время метода изотопного разбавления [85], позволяющего учитывать влияние матричных компонентов на аналитические сигналы определяемых металлов (после изотопной гомогенизации), учитывать потери аналита в процессе пробоподготовки, существенно повышать точность определения. Недостатком изотопного разбавления является необходимость существования как минимум двух изотопов определяемого элемента.

Помимо чисто инструментальных проблем у метода МС-ИСП существуют проблемы, связанными с его недостаточной «гибкостью» по отношению к процедуре пробоподготовки – остаточная минерализация растворов должна быть чрезвычайно низкой (не более 0,2 %), ввод органических растворителей/экстрактов, а также водных растворов, содержащих органические вещества, в плазму затруднен. Использование других минеральных кислот и иных реагентов для разложения образцов растительного материала за исключением азотной кислоты

приводит к возникновению нежелательных эффектов памяти [175]. Дополнительным ограничением, сдерживающим повсеместное использование масс-спектрометров для целей стандартизации по четырем элементам (кадмий, свинец, мышьяк, ртуть), является несоразмерно высокая стоимость прибора при покупке и техническом обслуживании. При необходимости определения небольшого круга элементов на следовом уровне более рационально использование ЭТААС.

ЭТААС является альтернативой методу МС-ИСП для фармацевтического контроля качества ЛРС и позволяет обеспечить низкие пределы обнаружения металлов на уровне ppb [292]. По сравнению с методами, использующими в качестве источника возбуждения индуктивно связанную плазму, ЭТААС является чрезвычайно селективным методом, но обладает рабочим диапазоном всего в 1-2 порядка и не позволяет определять одновременно несколько элементов (определение ведется последовательно). Использование ЭТААС не накладывает в отличие от МС-ИСП жестких ограничений на состав анализируемого раствора, что несомненно является преимуществом при определении кадмия, свинца и мышьяка в растворах, полученных кислотным вскрытием ЛРС.

Несмотря на очевидные преимущества ЭТААС по сравнению с МС-ИСП при анализе субстанций растительного происхождения существуют некоторые физические и химические влияния, способные снизить чувствительность определения [54]. К физическим помехам можно отнести явления, обуславливающие неселективное поглощение излучения: светорассеяние на неиспарившихся частицах пробы; образование в процессе термообработки молекулярных фрагментов, обладающих широкими спектральными линиями; селективное поглощение света другими резонансными линиями определяемого элемента; наложение на наиболее чувствительную линию аналита линий сопутствующих элементов [74]. Эти типы помех легко корректируются физическими методами: применением источников излучения со сплошным спектром (дейтериевая коррекция), использованием эффекта самообращения спектральных линий (коррекция Смита–Хифья), расщеплением в магнитном поле вырожденных энергетических уровней атома, что в

итоге обуславливает расщепление резонансной линии поглощения (эффект Зеемана) [54].

Корректировать химические влияния [54] несоизмеримо труднее. Тем не менее, при определении кадмия, свинца и мышьяка в растворах, полученных кислотным разложением органического сырья, обычно не возникает каких-либо затруднений при определении кадмия, но при определении свинца и мышьяка возможны потери этих элементов на стадии термообработки вследствие их высокой летучести. Устранить это нежелательное явление, а также увеличить температуру термообработки (необходимо для наиболее полного отделения атомов матрицы от атомов аналита в процессе ЭТААС-определения) возможно с помощью модификаторов. Наиболее универсальным модификатором считается нитрат палладия и его смеси с нитратом магния [328]. Он чрезвычайно дорог и не всегда может быть доступен лабораториям, занимающимся анализом субстанций растительного происхождения. Вместо солей палладия могут быть использованы аммония гидрофосфат [187] или аммония дигидрофосфат [221]. Однако эти соли высокой степени чистоты в Российской Федерации мало доступны. Более простой альтернативой при определении свинца является использование в качестве модификатора раствора аскорбиновой кислоты 1 % [78], обладающего восстанавливающим действием (восстановление формы Pb^{2+} до Pb^0), а при определении мышьяка – раствора никеля нитрата 1 % [317, 29], обладающего свойством образовывать с летучими элементами соединения интерметаллидной природы.

В последнее время предпринимаются попытки сделать метод атомно-абсорбционной спектроскопии многоэлементным [261, 280, 329]. Уже выпускается коммерчески доступный прибор фирмы «Analytik Jena», оборудованный источником сплошного спектра. Однако данное направление, на наш взгляд, нельзя считать перспективным, поскольку физико-химические свойства определяемых металлов и физика метода ограничивают возможности реализации «истинной многоэлементности». При этом метрологические характеристики для элементов, аналитические длины волн которых лежат в дальнем ультрафиолете (например,

мышьяка) оставляют желать лучшего по сравнению с классическим вариантом ЭТААС.

При определении элементов методом ЭТААС возможно использование нескольких типов кювет: обыкновенной, с пиропокрытием, с платформой. Использование печи с пиропокрытием в условиях повышенной температуры (за счет действия модификатора) является предпочтительной, поскольку использование такого типа кювет позволяет значительно увеличить ее ресурс работоспособности.

На сегодняшний день ЭТААС – один из наиболее востребованных методов определения элементов в природных объектах [95, 112, 121, 123, 162, 167, 191, 217, 226, 234, 252, 274, 310, 341] и является доступной, наиболее селективной по отношению к анализам, менее требовательной к составу испытуемых растворов альтернативой по сравнению с МС-ИСП.

Примеры определения элементов в растительном материале с помощью методов МС-ИСП и ЭТААС приведены в Таблице А.1 (см. Приложение А). Изучение данных, приведенных в литературе, показывает, что наиболее часто определяемыми элементами являются эссенциальные металлы: В, Ва, К, Са, Mg, Mn, Fe, Zn, потенциально токсичные и токсичные – Al, Pb, Cd, As, Cr, Co, Mo, Ni. В некоторых работах дополнительно к основному набору элементов определялись лантаноиды [242] и элементы платиновой группы [215], которые включены согласно ICH Q3D в класс 2Б.

Согласно действующим требованиям ГФ XIV для целей контроля качества субстанций растительного происхождения требуется определение всего четырех наиболее токсичных элементов (кадмия, свинца, мышьяка и ртути), но в связи с тенденцией к гармонизации требований между международной и отечественной нормативно-правовой базой следует ожидать в будущем включения в отечественную фармакопею требований по определению элементов, включенных в класс 2.

При определении четырех экотоксикантов на уровне рrb использование метода МС-ИСП нецелесообразно – более оптимальным вариантом является

ЭТААС (для определения кадмия, свинца и мышьяка) и метод «холодного пара» (метод Полуэктова) при определении ртути. Однако при расширении списка определяемых элементов путем включения металлов из класса 2 применение ИСП-методов становится уже необходимым. АЭС-ИСП позволяет определять эссенциальные и потенциально токсичные элементы одновременно, но при условии нахождения последних на уровне содержаний не ниже ppm. Но сочетание АЭС-ИСП и ЭТААС является более дешевой и простой альтернативой МС-ИСП и позволяет перекрыть весь рабочий диапазон от нг/г до мг/г. К сожалению не все элементы можно определить ЭТААС и АЭС-ИСП методами – к их числу относятся кремний, накапливающийся в значительных количествах в траве хвоща полевого – растении, которое широко используется в официальной медицине РФ [10]. В качестве лекарственного сырья используются бесплодные летние побеги, в которых содержание производных кремниевых кислот может достигать 4 % и даже более [32, 170]. В траве хвоща полевого присутствуют несколько растворимых форм Si:

1) формы, связанные с высокомолекулярными органическими соединениями (белками, полисахаридами и т. д.), доля которых может достигать 50 % от общего содержания кремния;

2) формы кремния, связанные с гидрофильными органическими соединениями (около 40 % от общего содержания кремния).

То есть доля потенциально биодоступных форм Si в данном виде сырья может достигать 90 % от общего содержания элемента. Таким образом, трава хвоща полевого может рассматриваться как природный источник кремния – элемента необходимого для нормального функционирования костной ткани, слизистых оболочек, стенок кровеносных сосудов. Последнее обуславливает необходимость стандартизации данного ЛРС по показателю «Кремний» наряду с определением флавоноидов, которое рекомендовано в ГФ XIV [10]. Однако эффективных, валидированных, относительно простых, пригодных для рутинного анализа методик определения валового содержания Si в сырье хвоща полевого в ведущих фармакопеях мира до сих пор нет. Так, в частности в ГФ XIV, качество сырья устанавливается по сумме флавоноидов в пересчете на кверцетин [10].

Определение кремния методами ЭТААС, АЭС-ИСП и МС-ИСП значительно затруднено из-за особых химических свойств этого элемента. Так, для перевода аналита в растворенную форму, в том числе в условиях закрытых микроволновых систем, необходимо использование высоко токсичной плавиковой кислоты, которая, реагируя со стеклянной горелкой атомно-эмиссионного спектрометра, а также с материалом кюветы атомно-абсорбционного спектрометра, приводит к порче дорогостоящего оборудования. Применение специальных систем ввода растворов образцов, содержащих плавиковую кислоту, может значительно ухудшить аналитические и метрологические характеристики методики, существенно повысить стоимость анализа. Для нейтрализации HF необходимо дополнительно вводить добавки борной кислоты [323, 150], что также нежелательно для последующего определения кремния методами, использующими в качестве источника возбуждения аналитического сигнала индуктивно связанную плазму, вследствие увеличения солевого фона. Кроме того, при использовании HF для разложения кремнийсодержащих образцов высок риск потерь определяемого элемента на стадии пробоподготовки вследствие образования летучего SiF₄. Таким образом, поиск других методов и методик определения кремния в ЛРС является важной задачей. Одним из перспективных методов, с этой точки зрения, является спектрофотометрический. Существуют спектрофотометрические методики, в которых аналит определяется в форме желтой неустойчивой кремнемолибденовой кислоты после трудоемкой многостадийной пробоподготовки, включающей стадии озоления, стадии отделения примесей от аналита; в качестве стандартного образца используется силикат натрия – соединение не постоянного химического состава [33]. Более рациональным является определение кремния с помощью устойчивой, интенсивно окрашенной кремниемолибденовой сини [4, 48, 128, 219, 220, 275, 289], что обеспечивает высокую чувствительность, а предварительное сплавление анализируемого материала позволяет существенно снизить трудозатраты и риск потерь определяемого элемента в результате образования летучих соединений. В качестве стандартного образца (СО) в этом случае можно взять официально

стандартизированный природный объект, обладающий постоянным составом, например геохимический стандарт.

1.2. Определение анионов, имеющих значение в фармации

В организме млекопитающих и человека эссенциальный элемент – йод присутствует на 80 % в щитовидной железе [265] – он необходим для синтеза важнейших регулятивных йодсодержащих гормонов, в частности тироксина и трийодтиронина [166], влияющих на рост и развитие тела, половых органов, выработку защитных антител [135, 216, 260, 262]. При дефиците йода очевидным решением является заместительная терапия, заключающаяся в применении лекарственных фитопрепаратов с высоким содержанием этого неметалла в доступной для усвоения форме. В отечественной медицинской практике таким сырьем являются слоевища ламинарии.

Для определения йода в талломе ламинарии используются различные химические и физико-химические методы. Так, для определения валового содержания йода согласно ГФ XIV [12], ВР [114], ЕР [147] используется недостаточно селективная, особенно в случае природных объектов, трудоемкая титриметрическая методика (йодометрия) [12, 114, 147], которая включает в себя несколько стадий: предварительное сжигание анализируемой пробы в атмосфере кислорода с последующим поглощением продуктов реакции смесью воды и натрия гидроксида, как в случае [12] или прокаливанием на открытом пламени горелки как в случае [114, 147]. Известны работы, где йод определяли на газовом хроматографе, оборудованном электрозахватным детектором [338]. Метод отличается высокой чувствительностью и селективностью, однако требует трудоемкой многостадийной пробоподготовки, включающий помимо озоления образца перевод аналита в летучую органическую форму обработкой 3-пентаноном. Анализ может быть выполнен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии после экстракции йодорганических соединений ионными жидкостями, содержащими пиридиний-катион [248].

Проводились попытки использовать атомно-абсорбционную спектрометрию и АЭС-ИСП для определения валового содержания йода [103]. Однако определение данного неметалла атомно-абсорбционными методами представляет значительные трудности. Резонансная линия поглощения йода – 183 нм лежит в дальней ультрафиолетовой области и не охватывается спектральным диапазоном серийно выпускаемых приборов, поэтому йод можно определить только косвенно – посредством определения металлов, образующих с йодом соединения точной стехиометрии [102, 235, 101]. Использование АЭС-ИСП также сильно ограничено из-за низкой чувствительности метода по отношению к определяемому элементу. Значительно лучших результатов, по нашему мнению, позволяет обеспечить ввод аналита в индуктивно связанную плазму в виде паров, получаемых с помощью специальных систем, однако стоимость такого оборудования существенно возрастает.

Наибольшее распространение при определении валового содержания йода в природных объектах получила МС-ИСП [311, 256] и более старый трудоемкий метод Санделла–Кольтгоффа – кинетический метод, в котором используется спектрофотометрическое детектирование [283]. Метод Санделла–Кольтгоффа основан на реакции восстановления окрашенных в желтый цвет солей Се (IV) до бесцветных Се (III) с помощью As (III). Сама реакция протекает очень медленно, однако в присутствии йодидов как катализатора резко ускоряется. В качестве аналитического сигнала измеряется скорость исчезновения желтой окраски. Метод Санделла–Кольтгоффа отличается чрезвычайно высокой чувствительностью – предел обнаружения может достигать 0,1 нг/мл. Однако он не отличается высокой селективностью в присутствии органических соединений, поскольку ионы церия являются активными комплексообразователями. Более современным методом является МС-ИСП. Тем не менее, и этот метод не лишен существенных недостатков, связанных с его недостаточной селективностью по отношению к йоду. Для корректировки матричных влияний могут использоваться различные изотопы, например, In¹¹⁵ и Rh¹⁰³ [141]. Тем не менее, наилучшей изотопной меткой при определении йода (наиболее распространенный изотоп I¹²⁷) является радиоактивный изотоп I¹²⁹ [141, 165], что требует особых мер безопасности при

работе. Анализ литературных данных позволяет сделать вывод о необходимости разработки других селективных методик определения содержания йода в слоевищах ламинарии с использованием иных инструментальных методов.

На долю йодидов в ламинарии приходится около 90 % от общего содержания йода [320]; оставшиеся 10 % – это йодированные аминокислоты, преимущественно йодтирозин [315, 171, 281], то есть растение является природным геохимическим барьером по отношению к йоду, причем данный элемент накапливается растением преимущественно в наиболее усвояемой человеком форме–форме йодидов. Это дает возможность определять подавляющую часть йода, находящегося в данном морском фитоорганизме в форме йодидов, с помощью ионометрии.

Ионометрия является одним из электрохимических методов анализа и характеризуется чрезвычайно высокой селективностью. Появившись более ста лет назад [209] этот метод до сих пор играет заметную роль в химико-аналитических исследованиях, особенно прикладных. Как и для любого электрохимического метода для выполнения потенциометрических измерений необходима электрохимическая ячейка, которая состоит из ионселективного рабочего электрода и электрода сравнения (чаще всего хлорсеребряного), подключенных к вольтметру. Измерение потенциала рабочего электрода, зависящего от активности определяемого компонента в анализируемом растворе, проводится относительно электрода сравнения, имеющего постоянный потенциал. Теория процессов, происходящих при этом на границе раздела фаз между полупроницаемой мембраной электродов и анализируемым раствором, прекрасно представлены в работах [117, 54].

Концентрация и активность иона связаны между собой через коэффициент активности, поэтому для разбавленных растворов, когда коэффициент активности частицы стремится к единице, концентрация определяемого иона близка к активности того же иона. Это дает возможность проводить количественное определение, используя зависимость не между потенциалом и активностью, а между потенциалом и концентрацией определяемого иона.

Принципиальная конструкция рабочих электродов зависит от типа полупроницаемой мембраны [46].

Несмотря на относительную дешевизну и доступность метод ионометрии на сегодняшний день практически не используется для определения валового состава объектов и практически полностью вытеснен методами МС-ИСП, АЭС-ИСП, ЭТААС. Тем не менее, метод ионометрии на современном уровне развития аналитической химии занял свою нишу – он используется там, где необходимо знать не только общее содержание, но и форму нахождения определяемого элемента [124, 155, 188, 239, 269, 270, 286, 318], а также там, где определение того или иного элемента, например, йода в силу его физико-химических свойств затруднено.

В фармацевтической практике ионометрическим методом в проточно-инжекционном режиме (ПИА) проводилось определение валового содержания йода в препаратах бетадин, «бесцветный йод ВРС34» [131]. Для этого молекулярный йод, присутствующий в препаратах восстанавливали до йодида раствором метабисульфита натрия; концентрация йодидов измерялась йодид-селективным электродом с твердой мембраной $\text{AgI}/\text{Ag}_2\text{S}$. Аналитический сигнал при этом имел форму пика. Теоретические исследования разработанной методики были проведены теми же авторами в работе [130]. Методика интересна в научном плане, однако в целях рутинного контроля качества вряд ли может быть осуществлена в силу невозможности стандартизации самой установки. В [159] был разработан йодид-селективный электрод на основе модифицированных углеродных нанотрубок и наночастиц сульфида меди, обладающий, по мнению авторов быстрым временем отклика, хорошей воспроизводимостью полученных результатов, высокой селективностью в присутствии органических и неорганических веществ. С помощью данного электрода был определен йодид-ион в препарате меглюмина. В [169] представлен электрод, где в качестве ионообменника использовался железо(II)-трис батофенантролин йодид. Данное устройство было применено для определения валового содержания йода после его восстановления до йодида в ПИА-режиме в препарате «Повидон-Йод». Смесь

родамина В и трийодид-иона [197], а также смеси ионных жидкостей с йодидами фталоцианина кобальта [284], 3-амион-5-меркапто-1,2,4-триазолкобальт (II) [342] могут быть использованы для изготовления высокоселективных электродов чувствительных к изменению содержания йодидов в лекарственных препаратах. Стоит упомянуть работу [268], в которой авторами был разработан твердотельный ион-селективный электрод, содержащий в своем составе 1,3-дигексадецилимидазолиевую ионную жидкость. По утверждению разработчиков в зависимости от состава анионной части ионной жидкости электрод может быть селективен как по отношению к тиоцианатам, так и по отношению к йодидам. Тем не менее, все перечисленные выше электроды не являются легко доступными и стандартизованными, поскольку не производятся современной промышленностью.

Наибольшее распространение в практике определения неорганических форм йода получили достаточно удобные, промышленно изготавливаемые и, соответственно, стандартизованные твердотельные электроды, включающие химически и механически устойчивые кристаллические мембраны (изготовленные из Ag_2S), допированные AgI [44, 46, 51, 97, 198]. Но несмотря на доступность и относительную дешевизну таких йодид-селективных электродов и оборудования в целом, в фармакогностической практике метод ионометрии все еще не получил широкого распространения.

Дополнительный интерес представляет оценка содержания в ЛРС потенциально опасных нитратов и бромидов, способных оказывать фармакологическую активность, например тормозящее действие на ствол головного мозга [43]. Нитраты могут поступать с удобрениями при культивировании ЛРС. Полученные данные могли бы быть использованы в дальнейшем для разработки методик количественного определения и поиска лекарственных растений-концентраторов брома. Немаловажную роль при этом могла бы также сыграть ионометрия.

1.3. Методы определения суммы восстанавливающих сахаров и полисахаридов

Сахара – класс биологически активных веществ, широко распространенных в природе и входящих в состав всех живых организмов. Они участвуют в многочисленных биохимических процессах [65], а их полимерные формы (полисахариды), масса молекул которых может достигать нескольких миллионов Да [335], являются строительным материалом для растений, микроорганизмов, экзоскелета насекомых, а также выполняют функцию запасания питательных веществ для растений и млекопитающих. Не менее важную роль полисахариды играют в механизмах межклеточного взаимодействия и регуляции иммунного ответа [126, 140]. Многочисленные эксперименты показали, что природные полисахариды оказывают на организм человека многомерное, комплексное действие [80, 125, 148, 149, 153, 156, 180, 181, 193, 211, 253, 254, 258, 259, 278, 324, 336, 339]. Поэтому вещества углеводной природы представляют все больший интерес.

Довольно значительное количество растительного сырья является источником полисахаридов. В Российской Федерации таким сырьем согласно ГФ XIV [13] являются: листья мать-и-мачехи, листья подорожника большого, цветки липы, семена льна, трава фиалки, корни алтея, корни лопуха, корни одуванчика, корни и корневища девясила, трава череды трехраздельной. И качество указанных субстанций растительного происхождения оценивается по содержанию в нем веществ углеводной природы.

Для рутинного контроля качества желательно использовать наиболее простые, удобные прописи, не требующие значительных трудовременных затрат, в частности, на выделение каждой углеводной фракции. По этой причине в заводской практике наибольшее распространение получили методики, позволяющие определять общее содержание сахаров, представляющее собой сумму свободных сахаров и сахаров, образующихся после кислотного гидролиза (инвертирования) полисахаридов.

Наиболее старым методом определения суммы сахаров является метод Бертрана и его модификация – метод Макс–Мюллера [3], заключающиеся в перманганатометрическом титровании горячей инвертированной вытяжки, после последовательной обработки реактивом Феллинга, раствором железоаммонийных квасцов или сернокислого железа. Метод неспецифичен, трудоемок. Более того, протекающие реакции не стехиометричны. В результате при расчете содержания сахаров необходимо вводить поправки из специально разработанных таблиц. Метод Макс–Мюллера отличается от метода Бертрана только соотношением используемых при определении реагентов. В настоящее время эти методы применяются очень редко и практически полностью вытеснены инструментальными: ВЭЖХ, ПИА- и спектрофотометрическими методами.

При определении сахаров методом ВЭЖХ возможны несколько вариантов детектирования. Поскольку этот класс веществ активно не поглощают свет ни в видимой, ни в ультрафиолетовой области, то самым очевидным решением является использование рефрактометрического детектора [238]. Тем не менее, его показания в сильной степени зависят от колебаний параметров, влияющих на состав подвижной фазы, таких как давление, температура и концентрация определяемого компонента. Вследствие этого градиентный режим элюирования мало пригоден при рефрактометрическом детектировании, что сильно ограничивает возможности данного типа устройств для анализа природных объектов. В литературе также имеются данные о применении электрохимических детекторов, где в качестве индикаторного используется, например, медный [86] или золотой электрод [132]. Недостатками приборов данного типа являются нестабильность, уменьшение чувствительности со временем в связи с изменением характеристик электродов, значительная зависимость аналитического сигнала от расхода и чистоты подвижных фаз и ограниченное применение в ВЭЖХ с градиентным режимом элюирования. Недостатки рефрактометрических и электрохимических детекторов обусловили широкое распространение в настоящее время подхода, заключающегося в предварительной дериватизации сахаров реагентами, способными поглощать в УФ-области. В этом случае становится возможным

применение наиболее надежных и распространенных УФ-детекторов. Модификация может быть выполнена как в виде отдельного этапа пробоподготовки, так и в проточной реакционной ячейке, непосредственно присоединенной к хроматографу. В литературе наиболее многочисленны работы, где в качестве модификаторов используются вещества, молекулы которых состоят из ароматических радикалов, обладающих хромофорными свойствами: тетразолиевый голубой [331], 2-аминопиридин [302], 1-фенил-3-метил-5-пиразолон [325] и т. д. Существенными недостатками такого подхода являются: усложнение пробоподготовки, изменение структуры и, соответственно, физико-химических свойств определяемых компонентов, потери аналитов, риск образования побочных продуктов, неполнота прохождения реакции модификации определяемого вещества, удорожание оборудования. Поэтому в рутинном контроле качества данный подход в Российской Федерации редко используется.

Наметившаяся в последние десятилетия тенденция к максимальной автоматизации анализа привела к попыткам использования ПИА для определения сахаров. Этот подход заключается в том, что вся аналитическая процедура определения вещества выполняется автоматически/полуавтоматически в потоке подвижной фазы с момента введения аликвоты в систему до момента регистрации аналитического сигнала включительно. Для регистрации сигнала используются весы [276], биамперометрический [227], спектрофотометрический детекторы [87, 212, 223, 244, 251]. Причем последний тип устройств получил наибольшее распространение в практике ПИА. При определении ПИА-методом, особенно после модификации аналитов органическими реагентами, помимо блоков, связанных с хранением, транспортировкой жидких сред, смешением реагентов, переключением и барботированием потоков, необходимо вводить нагревательные ячейки для дериватизации. Вследствие этого состыковка различных частей системы, а также унификация и стандартизация чрезвычайно сложна. По этой причине использование ПИА в условиях заводских лабораторий не представляется возможным.

Для количественного определения суммы свободных сахаров и полисахаридов наибольшее распространение в фармакогнозии получил спектрофотометрический метод, который характеризуется простотой инструментальной базы. При определении суммарного содержания сахаров этим методом преимущественно используются органические реагенты двух типов. Реагенты первого типа взаимодействуя с определяемым веществом и восстанавливаясь переходят в окрашенный продукт, способный поглощать свет в УФ или ВИД-диапазоне. К этому типу относятся нитроароматические соединения [290], в частности широко применяемые 3,5-динитросалициловая кислота, которая при взаимодействии с моносахаридом восстанавливается до 3-амино-5-нитросалициловой кислоты [94, 110, 229, 314], и пикриновая кислота (метод Крезелиуса-Зейферта), восстанавливаемая до пикраминовой кислоты [13, 69, 79, 82, 83, 307]. Значительно реже используется 2-(аминоэтан-амин 2-(этоксикарбонил)-4,6-динитрофенолят [343], тетразолиевый голубой [183], хлорид трифенилтетразолия [224] (применяемый также в гистологических исследованиях), фенолфталеиновый реагент [282]. Существенный недостаток растворов, содержащих реагенты первого типа, – их многокомпонентность, и, как следствие, недостаточная устойчивость при хранении, необходимость длительного нагрева смесей с испытуемым раствором для получения требуемой аналитической формы, что существенно сказывается на метрологических характеристиках методик. Так, в литературе имеются убедительные данные, что метод Крезелиуса-Зейферта является ориентировочным и может быть использован только лишь для предварительной оценки содержания суммы сахаров в сырье [172].

Действие реагентов второго типа основано на реакции азосочетания определенных реагентов с производными фурфурола, образующимися в среде концентрированной серной кислоты в результате дегидратации молекул сахаров [92,107]. В процессе реакции синтезируются красители, обладающие значительными коэффициентами экстинкции. В качестве реагентов могут выступать различные вещества ароматического ряда, способные взаимодействовать с фурфурами. Однако наибольшую популярность завоевали антрон (метод

Морриса–Роэ, антроновый метод) [1, 77, 179, 266, 340], фенол (метод Дюбуа, фенол-серноокислый метод) [25, 76, 138]. При определении фруктозы применяется метод Селиванова (резорциновый метод) [34, 66], который достаточно чувствителен и специфичен по отношению к кетозам; альдозы в тех же условиях практически не взаимодействуют с резорцином. При применении антрона в качестве реагента образуется ярко окрашенный продукт сине-зеленого цвета, фенола – продукт розово-оранжевого цвета, резорцина – продукт вишнево-красного цвета.

Для выполнения определения сахаров по методу Морриса–Роэ необходима многоступенчатая очистка коммерчески доступного антрона [70], но даже в этом случае реактив не позволяет получить достаточно воспроизводимых результатов, в том числе и из-за необходимости нагрева реакционной смеси перед определением. Более перспективным является метод Дюбуа, который не требует дополнительных очисток реагентов, нагрева реакционной массы, позволяет получать более воспроизводимые данные. По этой причине практическому применению фенол-серноокислого метода посвящено наибольшее количество публикаций [67]. В ГФ XIV [13] для количественного определения суммы свободных сахаров и полисахаридов в большинстве случаев используется метод Морриса–Роэ, метод Крезелиуса–Зейферта или для фруктозанов – метод Селиванова. Фенол-серноокислый метод не прописан. В ЕР полисахаридсодержащее лекарственное растительное сырье не нормируется по содержанию суммы полисахаридов и свободных сахаров – оценка качества проводится по показателю «Коэффициент набухания» [144].

При определении полисахаридов наибольшее распространение получил метод гравиметрии, основанный на том, что данная группа веществ высаживается спиртом 96 % [23, 24, 28, 37, 81]. Этот метод традиционно используется для стандартизации растительного материала и обладает всеми недостатками, присущими гравиметрии: длительностью, трудоемкостью, риском неполного осаждения аналитов, соосаждением матричных компонентов, от которых не всегда возможно избавиться простым промыванием осадка, потери в процессе отделения осадка от маточного раствора. Так, например, в работе [24] для ускорения осаждения инулина спиртом 96 % из водных

извлечений, полученных из корней лопуха, применяли достаточно низкую температуру минус 15 °С. Несмотря на очевидные недостатки химические свойства полисахаридов таковы, что использование иных методов определения этой группы веществ для целей контроля качества затруднено вследствие многокомпонентности и полимерной природы полисахаридов, их значительной вариабельности по структуре и составу мономерных звеньев. Указанные сложности требуют применения нетривиальных для контроля качества особенно в условиях заводских лабораторий методов, например эксклюзионной хроматографии. Однако даже при наличии необходимого оборудования количественное определение указанной группы веществ все равно остается затруднительным, поскольку соответствующие СО отсутствуют. Поэтому, по всей видимости, единственный возможный способ улучшения определения полисахаридов в настоящий момент заключается в выборе иных растворителей, обладающих лучшей осадительной способностью, уменьшение длительности анализа и стремление к его максимальной автоматизации.

1.4. ВЭЖХ с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим детекторами для целей определения гидроксилсодержащих ароматических соединений в природных объектах (арбутин, антоцианы)

Арбутин

В медицине арбутинсодержащее сырье (листья толокнянки обыкновенной, брусники обыкновенной, корневища бадана толстолистного) давно используются в качестве диуретического [271], антисептического, противовоспалительного [233, 334], антиоксидантного средства [88] при заболеваниях мочеполовой системы (Рисунок 1).

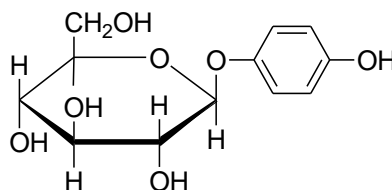


Рисунок 1 – Строение арбутина

Предполагается, что арбутин не разлагается ферментативной системой почек вследствие присутствия в сырье танинов [228], но гидролизуется по гликозидной связи до глюкозы и гидрохинона в мочевыводящих путях под действием β -глюкозидазы, вырабатываемой патогенными микроорганизмами [157, 158, 161, 164, 279, 337]. Образующийся гидрохинон, собственно, и проявляет антибактериальные свойства, при этом существенно не изменяя формулу крови [184] в отличие от синтетических антибиотиков.

Недавно японскими исследователями была отмечена склонность арбутина к окислительной полимеризации в присутствии ионов меди в качестве катализатора [168]. При этом получающиеся водорастворимые полимерные формы арбутина, молекулярная масса которых может достигать 10000, отличается от мономерной повышенной антимикробной активностью [185]. Данные полусинтетические антибиотики представляются весьма перспективными для фармацевтической промышленности, так как обладают менее выраженной токсичностью по сравнению с синтетическими.

Помимо антисептических и антибактериальных свойств, арбутин оказывает также отбеливающее действие на кожу [182, 218, 228, 230, 247, 264], что делает его весьма привлекательным для использования в косметических средствах.

Ввиду перспективности применения арбутина в косметологии и фармации интерес к использованию природных источников этого вещества все время растет, что обуславливает необходимость в разработке новых, современных методик для контроля качества и стандартизации ЛРС, содержащих данное биологически активное вещество.

Для определения арбутина применяются различные методы. Наиболее старым и наименее селективным является титриметрия, где в качестве титранта применяется раствор йода 0,1 М; перед титрованием извлечение обрабатывается раствором ацетата свинца с целью высаживания мешающих определению компонентов. Эта методика была приведена в ГФ XI для определения арбутина в листьях толокнянки и брусники [19]. К настоящему времени эта методика потеряла

свое значение и не используется для целей стандартизации. Вместо нее предпочтение отдается инструментальным методам.

При спектрофотометрическом определении необходимо использование реагентов, дающих яркую окраску с определяемым веществом. Таким реагентом может быть, например, 4-аминоантипирин [42, 84, 308], который при взаимодействии с арбутином в щелочных условиях в присутствии гексацианоферрата (III) образует продукт, окрашенный в ярко-красный цвет (Рисунок 2) и поглощающий на длине волны 514 нм.

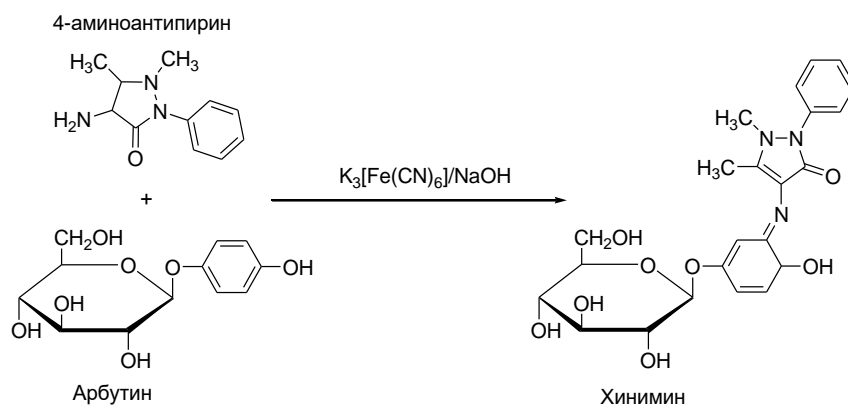


Рисунок 2 – Схема реакции между антипиринном и арбутином в щелочных условиях в присутствии гексацианоферрата (III)

Из представленной на Рисунке 2 схемы видно, что продуктом реакции является основание Шиффа, молекула которого обладает значительной системой сопряженных связей, в результате чего аналитическая длина волны продукта будет смещена в батохромную область. Однако данные методики нельзя считать селективными, поскольку 4-аминоантипирин будет давать окрашенные основания Шиффа и с другими ароматическими соединениями, содержащими гидроксильные заместители. Попытки улучшить селективность спектрофотометрического метода привели к разработке не прямых методов определения арбутина. Так, в работе [96] окрашивание проводилось хлористым железом после окисления молекулы аналита перйодатом калия (образование комплексного соединения между хлористым железом и продуктом окисления арбутина). Однако и в этом варианте использование спектрофотометрической методики без предварительного отделения

компонентов матрицы при определении арбутина в субстанциях растительного происхождения не позволяет добиться существенного повышения селективности.

По этой причине были предложены методики, включающее предварительное осаждение балластных соединений ацетатом свинца или очистку извлечения посредством пропускания через «home made» колонку, наполненную окисью алюминия [42]. Последний вариант спектрофотометрической методики рекомендован в ГФ XIV для количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной [16] и в листьях брусники обыкновенной [15]; измерение предлагается вести на длине волны 285 нм без дополнительного окрашивания. Однако, как показали исследования [38, 39], данный подход трудоемок и не отличается высокой селективностью, а также сопряжен с риском потерь определяемого компонента. Поэтому для более надежного определения аналита на современном уровне необходимо использовать иные инструментальные методы.

Наиболее современными и селективными являются хроматографические методы. Предпринимались попытки использовать высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) [257, 319], «газовую хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС)» [203, 205], капиллярный электрофорез [192] для количественного определения арбутина. Тем не менее, они пока не получили преимущественного развития в рутинном анализе вследствие присущих им недостатков. ВЭТСХ, сопряженная с последующим денситометрическим определением, «обладает недостаточной разрешающей способностью из-за сравнительно небольшой длины разделяющей зоны, невысокой чувствительностью, зависимостью результатов анализа от свойств окружающей среды» [257]. Тем не менее, определенные успехи в этом направлении были достигнуты. Так, например, в [257] было показано, что лучшее разрешение между пятном арбутина и матричными компонентами наблюдается при использовании в качестве подвижной фазы смеси этилацетат : метанол : вода (40 : 5,4 : 4). Стоит надеется, что прогресс в приборостроении и производстве пластинок для ВЭТСХ позволит существенно расширить границы применения этого метода в области количественного определения арбутина. В отличие от ВЭТСХ метод ГХ/МС

чувствителен и высокоселективен, но требует трудоемкой пробоподготовки для перевода определяемого вещества в летучую, недостаточно устойчивую (подверженную гидролизу) силированную форму. В [205] в качестве силирующего реагента использовали N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), в [176, 203] – смесь N,O-бис(триметилсилил)ацетамида (БСА) и триметилхлорсилана (ТМХС). В результате были получены 4 и 5-ТМС производные арбутина, которые в условиях ионизации электронным ударом дают в масс-спектрах два интенсивных сигнала дочерних ионов с m/z 254 и 182 Да. Первый сигнал и был выбран авторами в качестве аналитического. Несмотря на высокую селективность метода ГХ/МС в силу необходимости перевода в летучую форму (дополнительная стадия пробоподготовки) и высокой стоимости аналитического оборудования перспективы внедрения этого метода в рутинную практику контроля качества представляются довольно сомнительными. Гораздо большим потенциалом с точки зрения стандартизации ЛРС является сравнительно мало используемый в заводских лабораториях капиллярный электрофорез. Однако и он не лишен существенных недостатков – он обладает более низкой по сравнению с ВЭЖХ чувствительностью, которая обусловлена поглощением раствора определяемого вещества малого объема, находящегося в узком капилляре (стандартная толщина 75 мкм) небольшой длины, непосредственно проходящей через детектор; сильной зависимостью времени удерживания от состояния поверхности капилляра, в результате чего идентификация пиков особенно в случае многокомпонентных образцов существенно усложняется; меньшей воспроизводимостью ввода по сравнению ВЭЖХ; существенным влиянием напряжения разделения на скорость миграции компонентов анализируемой смеси через детектор, в результате чего воспроизжимость площадей пиков аналитов заметно ухудшается.

Перечисленные недостатки обусловили наибольшее распространение в настоящее время ВЭЖХ с УФ-детектированием [50, 115, 142, 145, 222, 245, 246, 267, 287, 293, 303, 309] для целей анализа.

Так, в [118, 245, 287] для отделения пика арбутина от сопутствующих веществ авторы рекомендуют использовать изократический режим, в [38, 39, 45]

фосфатные буферы, что делает практически невозможным полное отделение пика аналита от сопутствующих веществ. В предлагаемых в ВР и ЕР методиках [115, 143, 145] не приводятся ориентировочное время удерживания аналита, дополнительно вводится добавка гидрохинона с целью оценки эффективности разделения, марка хроматографической колонки не указывается, вид типичной хроматограммы не приводится. В ЈР [303] в описании методики указывается, что в подвижную фазу дополнительно вводится 0,1 М НСІ, что усложняет ее состав, «скорость элюирования нужно подбирать таким образом, чтобы время удерживания определяемого компонента составляло около 6 мин» [303], марка хроматографической колонки не прописывается. При этом добиться выполнения требований ГФ XIV [14] достаточно сложно. Приведенные недостатки обуславливают необходимость разработки иных методик количественного анализа ЛРС на содержание арбутина.

Помимо ультрафиолетового детектора может быть также использован масс-спектрометр (ВЭЖХ/МС), где в качестве метода ионизации применяется электроспрей. ВЭЖХ/МС позволяет однозначно идентифицировать аналит не только по времени удерживания, как в случае с УФ-детекторами, но и по иону с характерным для определяемого вещества значением m/z [40]. Дополнительное преимущество современного масс-спектрометрического детектора заключается в относительно легкой реализации MRM режима, что делает возможным выделение аналитического сигнала на фоне сложной матрицы. Этот тип детектора дорог, требует высокой научной квалификации сотрудников (что не всегда возможно и нужно в рутинном анализе) и в настоящее время в основном используется для научных исследований.

Наличие МС-детектора накладывает значительные ограничения на состав анализируемых растворов и подвижных фаз. Так при определении арбутина методом ВЭЖХ/МС анализируемый раствор и подвижная фаза не должны содержать высокого солевого фона. Поэтому при разработке методики необходим выбор не только условий регистрации масс-спектров арбутина, но и унифицированных условий хроматографирования и пробоподготовки,

совместимых как с МС- (для научных исследований), так и с классическим УФ-детекторами (для контроля качества субстанций природного происхождения).

В Таблице А.2 (см. Приложение А) приведены примеры определения арбутина в субстанциях природного происхождения методом ВЭЖХ/УФ. Из литературных данных видно, что наиболее часто в зарубежной литературе при извлечении арбутина используется ультразвуковая обработка, в то время как в отечественной – нагревание на водяной бане. При ультразвуковой обработке наиболее часто используется метанол и его смеси с водой.

В отечественной литературе наиболее часто используется нагревание сырья в водных и водно-спиртовых смесях на водяной бане. При ВЭЖХ-определении арбутина в качестве подвижных фаз используется преимущественно метанол и вода; иногда применяются ацетонитрил и буферы.

Антоцианы

Антоцианы – обширная группа природных соединений, содержащихся в растениях и обуславливающая окраску плодов, цветков; обладают насыщенным цветом, который может варьироваться от красной до синей или сине-фиолетовой [127, 160]. Проявляют ярко выраженные антиокислительные, противораковые, противовоспалительные свойства, в частности, антоцианы черники оказывают положительное влияние на органы зрения [77, 119, 133, 208, 332, 333].

Антоцианы относятся к группе флавоноидов, углеводная часть молекул которых соединена с катионом флавилия – частицей, несущей положительный заряд (Рисунок 3), который распределен по системе сопряженных связей ароматических колец. Именно высокая степень сопряжения обуславливает наличие яркой окраски у этих пигментов.

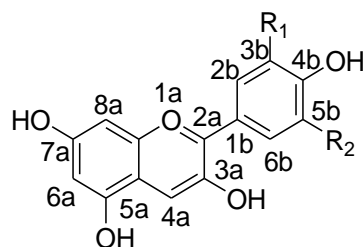


Рисунок 3 – Структура катиона флавилия

В природе найдено примерно 560 соединений, которые можно отнести к группе антоцианов [119, 133, 208, 332, 333]. Основные отличия в структуре будут заключаться в различной степени гликозилирования антоцианидина, замещении ароматической системы гидроксильными или метокси-радикалами, наличии или отсутствии ацилированных фрагментов. Сахара чаще всего присоединены к гидроксильным заместителям в положениях C3a, C5a, C7a, C3b, C4b, C5b [77], основная система сопряженных ароматических колец при этом сохраняется. Чем выше содержание гидроксильных групп и выше молекулярная масса углеводных заместителей, тем более устойчива молекула антоциана. Тем не менее, даже наиболее стабильные антоцианы, выделенные их сырья растительного происхождения, являются очень реакционноспособными соединениями – они способны окисляться при действии химических и физических факторов, например pH, света, температуры, ферментов [173, 316]. По этой причине работа с ними требует аккуратности.

В растворах антоцианы находятся в нескольких формах, находящихся в равновесии. При pH 1-2 антоцианидин существует в виде окрашенного в красный/малиновый цвет катиона флавилия. При повышении pH до значений близких к нейтральным равновесие смещается в сторону бесцветных форм (карбинол и халкон). Дальнейшее увеличение pH (щелочная среда) способствует переходу агликона в недостаточно устойчивую хиноидную форму, окрашенную в фиолетовый цвет. Сложность химических равновесий, устанавливающихся при таких переходах, убедительно показана в [72, 122].

Поскольку наиболее устойчивой формой является гидрофильный катион флавилия, то и извлечение и последующее определение аналитов проводят подкисленной водой, или подкисленными протонными растворителями: ацетоном, этанолом, метанолом (несмотря на лабильность антоцианов). Имеются технологические работы, где извлечение определяемых веществ из растительного материала проводится в присутствии МВИ [210, 330]. Показано, что МВИ позволяет значительно ускорить скорость экстракции и предотвратить разложение

наиболее лабильных антоцианов. Однако в целях контроля качества этот подход не нашел широкого распространения.

В настоящее время для количественного определения антоцианов используется УФ/ВИД-спектрофотометрия и ВЭЖХ как с спектрофотометрическим, так и с масс-детекторами.

Спектрофотометрическое определение рекомендуется ГФ XIV при определении суммы антоцианов в испытуемых растворах, полученных при извлечении аналитов раствором соляной кислоты 1 % из цветков василька синего [8] (температура – 40–45 °С, время – 15 минут), при извлечении подкисленным этанолом 96 % из сухих плодов аронии черноплодной [17] (температура – 100°С, время – 30 минут), подкисленным этанолом 60 % из плодов черники обыкновенной [18] (температура – 100 °С, время – 60 минут). Определение ведут с использованием удельного показателя поглощения цианидин-3-глюкозида на длине волны 546 нм для плодов черники обыкновенной, 534 нм для сухих плодов аронии черноплодной или цианидин-3-5-дигликозида на длине волны 510 нм для цветков василька синего. В белорусской фармакопее аналогичные методики рекомендуются для определения антоцианов в цветках василька синего [5] и свежих плодах черники обыкновенной [6]. В ЕР определение суммы антоцианов предусмотрено для свежих плодов черники обыкновенной [146]. Извлечение определяемых компонентов выполняется метанолом при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученный испытуемый раствор разбавляется подкисленным метанолом и далее измеряется оптическая плотность на длине волны 528 нм; процентное содержание суммы антоцианов в навеске определяется также как и в ГФ XIV с помощью удельного коэффициента поглощения. Удельный показатель поглощения удобен тем, что позволяет не использовать напрямую СО. Однако унификация таких методик становится практически невозможной. Следует заметить, что помимо фармакопейных методик существуют работы, где сумма антоцианов определяется рН – дифференциальным методом [77], или в виде комплексов с хлористым алюминием [104]. Эти методики интересны с теоретической точки зрения, но не нашли широкого применения в целях контроля качества и стандартизации ЛРС.

Достоинством спектрофотометрических методов является простота выполнения, однако они не позволяют судить о антоцианиновом составе, который уникален для каждого вида образца, и тем самым, не дают возможности осуществлять одновременное определение подлинности по действующим веществам и количественное определение.

Гораздо большее распространение в научной литературе при определении антоцианов в фармацевтических и пищевых объектах получил метод ВЭЖХ [22, 116, 127, 129, 134, 186, 189, 206, 210, 214, 237, 272, 273, 288], позволяющий обеспечить гораздо большую автоматизацию процесса по сравнению с УФ/ВИД-спектрофотометрией, точность определения, сочетание количественного определения аналитов с подтверждением подлинности сырья. При ВЭЖХ – определении антоцианов наиболее часто используют колонки, заполненные силикагелем С18, в качестве подвижных фаз – подкисленные водные растворы уксусной, муравьиной, трифторуксусной, ортофосфорной кислот, а также ацетонитрил, метанол и их смеси. Перед определением испытуемые растворы и растворы СО подкисляют до примерно рН 1-2 для перевода многочисленных форм агликона, находящихся в равновесии, в катион флавилия. Это дает возможность достичь лучшего разделения аналитов в процессе элюирования, формы и воспроизводимости пиков, добиться высокой селективности методики, поскольку в спектральной области выше 500 нм кроме ярко окрашенных антоцианов другие неокрашенные или слабоокрашенные соединения не поглощают. Однако использование сильно кислых сред накладывает определенные ограничения на тип сорбента – для максимального сохранения работоспособности колонок необходимо использование кислотоустойчивых марок. В работах [127, 214, 237, 273] в качестве подкисляющей добавки использовалась трифторуксусная кислота, что повышает риск коррозии колонок и необратимой модификации поверхности сорбента, так как данный реагент является ион-парным. Условия, приведенные [22, 116, 134, 186, 273, 288], где в качестве добавок использовались муравьиная или уксусная кислоты, являются более щадящими. Существуют литературные данные о одновременном применении подкисленных смесей

метанола и ацетонитрила или о одновременном применении смесей муравьиной и уксусной кислот [129, 206], при этом значительного улучшения формы пиков и разрешающей способности не происходит. Поэтому, по нашему мнению, усложнение состава подвижных фаз в данном случае не является строго обоснованным и достаточно применения только одного органического растворителя в подвижной фазе. Применение в качестве подвижных фаз солевых буферов также нецелесообразно.

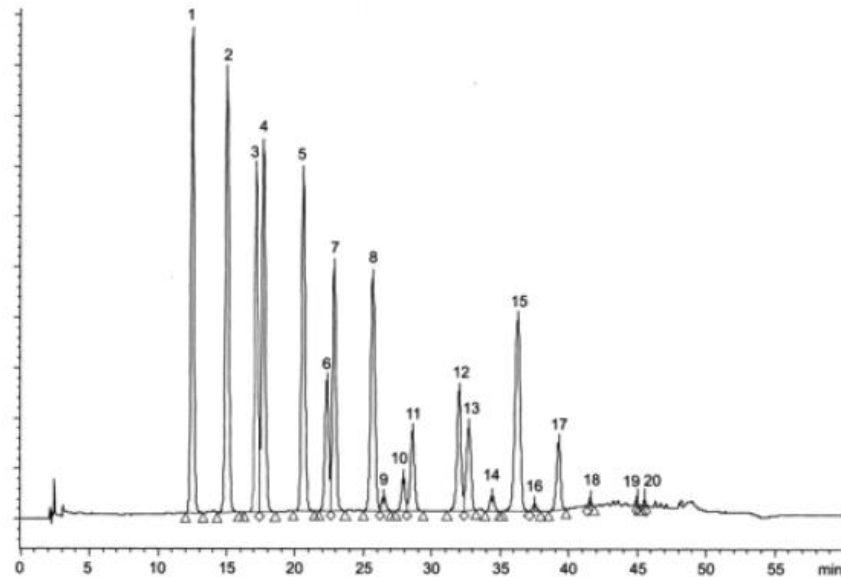
Пробоподготовка образцов для последующего определения существенно различается в зависимости от объекта анализа, но, как правило, проводится при температурах не выше 60 °С. Иногда для интенсификации процесса проводится ультразвуковая обработка. Примеры данных по пробоподготовке и использованию подвижных фаз, которые приведены в научной литературе, представлены в Таблице А.3 (см. Приложение А).

В зарубежной фармацевтической практике метод ВЭЖХ используется для стандартизации продуктов переработки плодов черники. В ВР имеется монография на очищенный и стандартизованный экстракт, полученный из свежих плодов черники [113]. Пробоподготовка согласно данной монографии проста и заключается в растворении анализируемого образца в смеси хлористоводородная кислота:метанол (2:98). Обращает на себя внимание, что полученный раствор далее разбавляют не указанной выше водно-органической смесью, а водным раствором фосфорной кислоты, что с нашей точки зрения выглядит весьма нерациональным, поскольку ортофосфорная кислота относится к слабым кислотам [41] и перевод всех агликонов в заряженную форму с ее помощью, по-видимому, нельзя считать полным. Разделение проводят на колонках С18 посредством следующих подвижных фаз: муравьиная кислота : вода (8,5 : 91,5) и муравьиная кислота : ацетонитрил : метанол : вода (8,5 : 22,5 : 22,5 : 41,5), режим элюирования – градиентный, регистрация аналитического сигнала проводится на длине волны 535 нм. «Сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид рассчитывается как сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора относительно площади пика цианидин-3-глюкозида на хроматограмме раствора СО» [113]. В USP

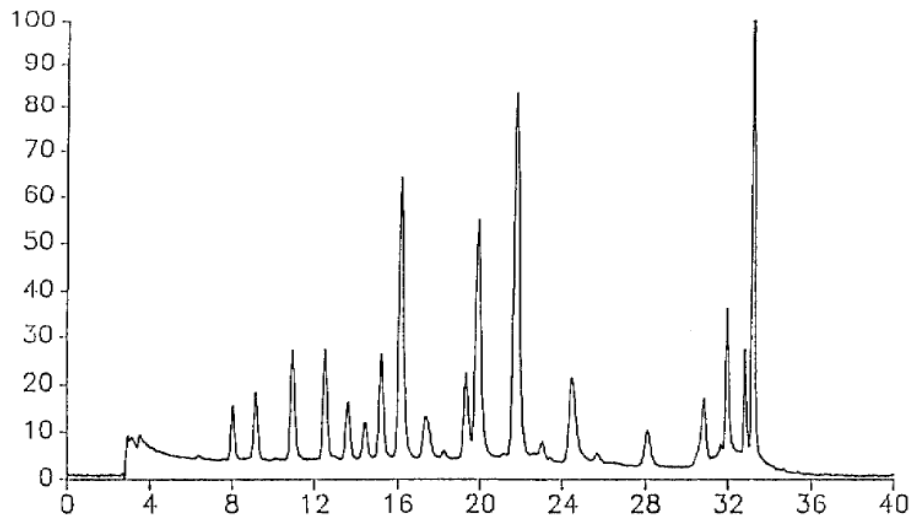
присутствует монография на экстракт черники в виде порошка [304]. Испытуемый раствор готовится растворением образца в смеси метанол:хлористоводородная кислота (49:1) под действием ультразвука. Перед введением в хроматограф испытуемый раствор разбавляется раствором ортофосфорной кислоты как и в монографии, приведенной в ВР. ВЭЖХ-анализ проводится с использованием колонки C18, подвижных фаз: муравьиная кислота:вода (1:9) и ацетонитрил:метанол:муравьиная кислота:вода (45:45:20:80), режим элюирования – градиентный, регистрация хроматограммы проводилась на длине волны 535 нм. В отличие от ВР в USP рекомендуются определять антоцианы и антоцианидины отдельно. Перерасчет производится на цианидин-3-глюкозид в случае антоцианов или цианидин в случае антоцианидинов.

Более простой вариант хроматографических условий для определения антоцианов методом ВЭЖХ представлен в рекомендациях международной федерации производителей фруктовых соков [89]. В качестве подвижных фаз в [89] используются: муравьиная кислота:вода (10:90) и вода:муравьиная кислота:ацетонитрил (40:10:50). Качество получаемых хроматограмм при этом не хуже, чем в условиях разделения, приведенных в ВР. Для сравнения на Рисунке 4 приведены хроматограммы испытуемого раствора, полученной при определении антоцианов в экстракте по методике ВР [113], и хроматограммы свежесжатого сока из плодов черники, полученной по методике [89].

Несмотря на то, что хроматограммы свежесжатого сока из плодов черники обыкновенной, полученные по [89], известны, для высушенных плодов черники их необходимо прописывать заново, так как они могут существенно отличаться в силу лабильности антоцианов.



А. Хроматограмма испытуемого раствора, полученной при определении антоцианов по методике ВР



Б. Хроматограмма свежевыжатого сока из плодов черники обыкновенной, полученной по методике [89]

Рисунок 4 – Хроматограммы испытуемого раствора, полученной при определении антоцианов в экстракте по методике ВР [113], и свежевыжатого сока из плодов черники, полученной по методике [89]

Таким образом, подвижные фазы и градиент, приведенные в [89], были выбраны в настоящей работе в качестве «отправной точки» при разработке унифицированной методики количественного определения антоцианов методом ВЭЖХ в сырье, рекомендованном ГФ XIV для медицинского применения: плодах черники обыкновенной, плодах аронии черноплодной сухих, цветках василька синего.

1.5. Квантово-химические методы исследования молекул природного происхождения

Квантовая химия – область теоретической химии, изучающая электронное строение атомов и молекул, химическую связь, химические реакции с позиций квантовой механики. Наличие квантово-химической модели предполагает некоторое упрощение задачи, в результате некоторые свойства изучаемых объектов теряются, но интересующие исследователя свойства оказываются выявленными, что позволяет проследить их изменение при изменении действующих факторов.

На современном уровне развития квантовой химии, вычислительного приборостроения и программирования можно в среднем говорить об инженерном уровне точности квантово-химических расчетов (~ 80 %). Однако точность прогнозов для разных задач будет разной: если геометрию органических молекул удастся рассчитать с точностью электронографического эксперимента, то, например, переходные состояния между реагирующими молекулами удастся спрогнозировать с несравненно худшей точностью. В результате даже при рутинном применении квантово-химических расчетов необходимо оценивать получаемые результаты с точки зрения классической теоретической химии, сопоставлять данные расчетов с экспериментальными данными при их наличии.

Современные методы квантовой химии можно разделить на три больших блока: неэмпирические (*ab initio*), полуэмпирические, методы функционала плотности (DFT). Неэмпирические методы основаны на решении уравнений Хартри–Фока, учет электронной корреляции при этом проводится методами наложения конфигураций, самосогласованного поля, связанных кластеров, с помощью теории возмущений Меллера–Плессета. В рамках квантовой теории *ab initio* являются достаточно универсальными методами, однако с точки зрения практического моделирования требуют огромных затрат машинных ресурсов и, как следствие, применения сложных вычислительных комплексов (особенно для учета электронной корреляции).

Полуэмпирические методы позволяют снять ограничения на сложность применяемого оборудования – для их применения в практическом молекулярном

моделировании достаточно обычного персонального компьютера. Основные приближения, которые реализуются в указанных методах следующие: учитываются распределение и движение валентных электронов, электроны, находящиеся на нижних орбиталях, составляют остов, электрон-электронные взаимодействия заменяются взаимодействиями валентных электронов с остовом, межъядерное отталкивание заменяется на взаимодействие остовов, при построении молекулярных орбиталей учитываются только валентные электроны, многоцентровые обменные и кулоновские интегралы не вычисляются, вместо этого вводится приближение нулевого дифференциального перекрытия. Все эти допущения были реализованы в наиболее старом методе – методе полного пренебрежения дифференциальным перекрытием (CNDO) [30], который в настоящее время практически полностью вытеснен более современным методом модифицированного пренебрежения дифференциальным перекрытием (MNDO) [30, 137], который отличается от CNDO способом выбора параметров (аналитический расчет двухцентровых интегралов). В тоже время для интегралов более высоких порядков приближение нулевого дифференциального перекрытия сохраняется. Наиболее современными вариантами MNDO являются AM1 и PM3 [136, 154, 263, 298, 299]. В работе [136], собственно, производится разработка метода AM1, а его параметризация проводится по основным элементам-органогенам (C, H, N, O). Основные допущения метода и математический формализм MNDO сохраняются, а изменяется функция, учитывающая межостовное отталкивание между атомами. Адекватность AM1 была подтверждена сравнением расчетных данных по энтальпии образования различных классов органических соединений с экспериментальными данными. Было показано удовлетворительное их согласование для нейтральных органических соединений, органических радикалов и катионов. Метод позволяет также получить удовлетворительные значения при оценках энергий водородных связей, барьеров вращения; отмечаются определенные проблемы с определением энергий ионизации и дипольных моментов. Дальнейшее развитие AM1 было связано с увеличением количества атомов, по которым производится параметризация. Так, например, в [154]

производится параметризация по атомам редкоземельных элементов: европия, гадолиния, тербия; в [298] – по атомам лития, бериллия, натрия, магния, калия, кальция, галлия, мышьяка, селена, рублидия, стронция, индия, олова, сурьмы, теллура, цезия, бария, таллия, свинца, висмута. В [263] AM1 был заново репараметризован и назван авторами RM1, но суть данного полуэмпирического метода при этом не изменилась. Развитие AM1 привело к появлению более совершенного варианта MNDO, получившего название PM3 [299]. PM3 отличается от AM1 способом выбора и значительно большим числом параметров. Введение параметров для атомов металлов и улучшение учета отталкивания остовов привело не так давно к репараметризации метода PM3. Репараметризованные варианты PM3 получили название PM5, PM6, PM7 [300, 301]. По существу, они отличаются от PM3 только количеством параметров, увеличение которых обусловлено увеличением перечня атомов, которые могут быть введены в рассчитываемую молекулу. PM3 правильно определяет геометрию молекулы, энергию и длины водородных связей, теплоты образования. Однако при исследовании слабых взаимодействий между частицами и определении ионизационных потенциалов он не дает адекватных результатов. Собственно, на примере PM3 хорошо прослеживается основной недостаток всех даже современных полуэмпирических методов – они недостаточно универсальны и хорошо воспроизводят свойства, по которым производилась параметризация и «отладка» метода, поэтому их применение для моделирования конкретных химических процессов требует известной осторожности. Тем не менее, метод PM3/PM5/PM6/PM7 может быть с успехом применен для предварительной оптимизации структуры и оценки свойств частиц, при этом получаемые результаты для некоторых молекулярных свойств оказываются не хуже результатов, получаемых с помощью получивших в настоящее время наибольшее распространение DFT-методов [297].

DFT-методы основаны на теореме Хоэнберга–Кона, согласно которой существует универсальный функционал электронной плотности для любых многоэлектронных систем, а основное состояние системы обеспечивается минимумом функционала. Сам функционал представляет сумму двух частей:

кинетической энергии электронов и энергии взаимодействия электронов, которая включает в себя обменную и кулоновскую составляющие. Основываясь на идеях DFT, Кон и Шэм предложили уравнение, включающий оператор, названный их именем и аналогичный классическому оператору Фока:

$$h_i \varphi_i = e_i \cdot \varphi_i, i=1, 2, 3, \dots, N;$$

$$h_i = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_a^K \frac{Z_a}{|R_a - r_i|} + \int \frac{\rho(r')}{|r_i - r'|} dr' + A_{xc}(r_i).$$

Видно, что в отличие от оператора Фока оператор Кона–Шэма содержит электронную плотность. Первый член оператора Кона–Шэма соответствует кинетической энергии электрона в состоянии i , второй член описывает потенциальную энергию взаимодействия между электроном i и ядром a с зарядом Z , третий член описывает электронную плотность, последний член представляет собой обменно-корреляционный потенциал:

$$A_{xc}(r_i) = \frac{dE_{xc}}{d\rho},$$

где E_{xc} – обменно-корреляционная энергия.

Основные отличия имеющихся функционалов заключаются в представлении обменно-корреляционной энергии. Единых схем для описания обменно-корреляционной энергии не существует – это основной недостаток DFT-методов. В работе [295] физиками-теоретиками были сформулированы математические требования, предъявляемые к функционалам. Однако на практике значительное число функционалов удовлетворяют не всем этим требованиям, а только части из них. Это не мешает, тем не менее, их широкому применению в моделировании.

В настоящее время существует значительное число функционалов. Но в работе [225] было показано, что получение адекватных результатов с помощью функционалов, разработанных после 2000 года весьма проблематично вследствие плохого качества получаемой в результате расчета электронной плотности. Такое положение дел авторы обоснованно объясняют отходом от строгой теоретической базы и чрезмерным использованием разработчиками подгоночных параметров для повышения точности расчетов. Поэтому использование функционалов, разработанных до 2000 года [98, 99, 195, 204, 249, 250], в молекулярном

моделировании кажется более рациональным. Наиболее разработанными и современными являются гибридные функционалы, в которых смешаны различные способы расчета энергий обмена и энергий корреляции. Наиболее широко использующийся функционал этого типа – B3LYP, предложенный Becke в 1993 году [99]. Упрощенно энергию E_{xc} (см. формулу выше) для B3LYP можно записать следующим образом:

$$E_{xc} = 0,80 \cdot E_{x(LSDA)} + (1 - 0,80) \cdot E_{x(HF)} + 0,72 \cdot E_{x(B88)} + (1 - 0,81) \cdot E_{c(LSDA)} + 0,81 \cdot E_{xc(LYP)},$$

где $E_{x(LSDA)}$ – обменная энергия, полученная в приближении локальной спиновой плотности;

$E_{x(HF)}$ – обменная энергия, полученная с использованием метода Хартри–Фока;

$E_{x(B88)}$ – обменная энергия, вычисленная с использованием функционала B88;

$E_{c(LSDA)}$ – корреляционная энергия, полученная в приближении локальной спиновой плотности;

$E_{xc(LYP)}$ – обменно-корреляционная энергия, вычисления с помощью функционала LYP.

B3LYP позволяет проводить моделирование на достаточно хорошем уровне, а затрачиваемое машинное время существенно меньше, чем при использовании методов *ab initio*. В тоже время универсальность B3LYP несоизмеримо выше по сравнению с полуэмперическими методами, поскольку в DFT-методах не используется параметризация на основе экспериментальных данных.

Выполнение квантово-химических исследований неэмпирическими и DFT-методами требует выбора базисных функций. В качестве базисных функций могут быть использованы орбитали слейтеровского типа (ОСТ) или орбитали гауссова типа (ОГТ). ОСТ максимально близка к радиальной составляющей атомных орбиталей атома водорода, демонстрирует корректное квантово-химическое поведение вблизи ядер и вдали от них. Однако при вычислении многоцентровых обменных и кулоновских интегралов достичь полного разделения переменных не удастся. Это значительно усложняет вычисления. Облегчить вычислительный процесс и разделить переменные удастся при использовании ОГТ, недостатком которых является то, что они экспоненциально не спадают при удалении от ядра и не ортогональны при разном главном квантовом числе n , но одинаковом

орбитальном квантовом числе 1 (одно из основных требований к волновым функциям). Поскольку произведение двух гауссовых функций центрированных на двух разных атомах также есть гауссова функция, то атомную орбиталь можно аппроксимировать линейной комбинацией гауссовых примитивов с соответствующими коэффициентами:

$$\chi = \sum_i c_i G_i,$$

где c_i – коэффициенты линейного разложения;
 G_i – ОГТ.

В современных расчетах используются сжатые ОГТ (СОГТ), представляющие собой линейные комбинации блоков, состоящих из линейных комбинаций ОГТ. Чем больше СОГТ, тем выше точность расчета, но и затрачиваемое машинное время существенно возрастает. В СОГТ могут быть введены поляризационные и диффузионные функции. Поляризационные функции, описывающие незанятые атомные орбитали с более высоким значением орбитального квантового числа, позволяют улучшить описание химической связи и учет электронной корреляции. Диффузионные функции при необходимости позволяют улучшить описание слабых взаимодействий.

Квантово-химические методы (DFT или полуэмперические) в настоящее время все шире используются для исследования веществ природного происхождения. В [90, 243] были проведены конформационные исследования арбутина; проведено сопоставление данных компьютерного моделирования и рентгеноструктурного анализа. Показано, что на поверхности потенциальной энергии вращения связей присутствуют 130 минимумов, что позволило авторам сгруппировать выявленные конформеры в группы и описать их свойства, выявить взаимосвязь между наличием внутримолекулярных водородных связей и спектральными свойствами арбутина в УФ- и ИК-диапазонах. La Rossa M. V. продемонстрировал на примере кверцетина и эдаравона универсальность DFT-методов при оценке антирадикальных свойств [202]. Jayakody R. S. с сотрудниками провели оптимизацию структуры молекулы бергенина, оценили токсические свойства и перспективы использования в онкологии [178]. Lobayan R. M.

исследовала стереоэлектронные свойства *Z*-изомеров фенилфлаванов и (+)-катехинов в водных растворах [100, 213]. В [312] с помощью функционала B3LYP было показано, что гликозидированные производные группы ализарина, содержащиеся в корнях и корневищах марены красильной, склонны образовывать соединения с ионом кальция – именно этим и объясняется способность препаратов на основе данного растения разрыхлять и выводить камни из почек и мочевого пузыря.

Оптимизация геометрии антоцианов на примере хризантемина квантово-химическими методами позволило получить адекватное распределение энергий молекулярных орбиталей в молекуле, что дало возможность достичь удовлетворительного согласования между теоретически предсказываемым и экспериментальными УФ-спектрами хризантемина [291]. Расчет проводился в базисах 6-311+G(d) и MIDI+ с использованием функционалов B3LYP, PBE0 и M06. Авторами было показано, что B3LYP/MIDI+ дает наилучшие результаты. Теоретические работы по исследованию структуры, антирадикальной активности, спектроскопических особенностей, нековалентных взаимодействий, моделирования адсорбционных свойств антоцианов обобщены в обзоре [285].

Квантово-химические методы широко используются и в химии сахаров, в том числе и природных [321, 105, 106, 190, 232, 294]. В [321] было проведено исследование 48 стереоизомеров гексапираноз, окисленных по 6-положению. На основе вычисленных стандартных энтальпий образования и энергии Гиббса было установлено, что окисление или восстановление гидроксиметильных заместителей всегда приводит к изменению конформации пираноз. Последнее существенно меняет физико-химические свойства пираноз и может, по мнению авторов, помочь химикам-органикам при осуществлении целенаправленных синтезов с участием сахаров и химикам-аналитикам при определении последних масс-спектрометрическими методами. В работе [105] DFT-методами (B3PW91, B3LYP) и с помощью теории Меллера–Плессета рассчитывались энергетические характеристики молекул β -D-неокарабиозы и β -D-неокарабиозы моногидрата (структурные элементы полисахаридов красных водорослей), на основании

которых была предложена наиболее выгодная конформация данной молекулы. Авторы подчеркивают, что при расчете моногидрата β -D-неокарабиозы в базис расчета была введена диффузионная функция для более корректного описания водородной связи между молекулами воды и сахара. Моделирование взаимодействия между молекулой исследуемого сахара и водой как растворителя проведено с использованием подхода Онзагера, симулирующий эффекты растворителя. Теми же авторами было проведено подобное исследование для молекул 2-O-сульфатированной 3,6- α -D-агидрогалактозы и каррабиозы – структурных элементов полимерной молекулы каррагенанов, слагающих клеточные стенки красных морских водорослей [106]. Учитывая высокую склонность мономерных сахаров к таутомерным превращениям были исследованы реакции аномеризации глюкопиранозы в вакууме, воде, и некоторых других растворителях [190]. Вычисления проводились с помощью теории Меллера–Плессета в базисах aug-cc-pVTZ и aug-cc-pVQZ, учет электронной корреляции проводили посредством использования схемы связанных кластеров с трехкратным возбуждением. Показано, что в отсутствие воды в качестве растворителя различия в энергиях α - и β -аномеров невелико и не превышает 1,5 ккал/моль. При образовании комплексных соединений глюкопиранозы с двумя молекулами воды эта величина повышается до 5 ккал/моль, при этом α -аномер оказывается более стабильным, что противоречит экспериментальным данным (соотношение α : β форм составляет 36:64). Авторы считают, что подобное расхождение может быть объяснено тем, что в реальных водных растворах, в отличие от изученной модели, β -аномер стабилизируется в большей степени за счет образования многочисленных водородных связей между молекулой глюкопиранозы и большим количеством молекул воды. Поэтому предлагаемая авторами модель может рассматриваться только как очень грубое приближение.

К похожим выводам пришли Momany F. и Schnupf U. [232], которые проводили расчет методом B3LYP/6-31+G*, а для учета сольватационных эффектов применяли алгоритм COSMO. В результате моделирования было показано, что глюкопираноза не образует устойчивых комплексов с молекулами воды, то есть

молекулы растворителя способны свободно перемещаются вокруг молекулы сахара. При этом подчеркивается, что β – аномер притягивает молекулы воды с меньшей интенсивностью, чем α – аномер. Это означает, что вероятность образования водородных связей и последующей стабилизации β – аномера ниже по сравнению с α – аномером, то есть результаты расчетов также как и в случае [190] противоречат экспериментальным данным и даже учет сольватации не позволяет согласовать их.

Выявленные разночтения, вероятнее всего, обусловлены особенностями структуры молекул сахаров (наличие большого количества полярных гидроксильных групп, склонных к слабым взаимодействиям) и наличие значительного числа таутомерных форм, переходящих друг в друга. Подобная ситуация наблюдается и в работе [294], где авторы пытаются исследовать слабые CH/π взаимодействия между молекулами сахаров и ароматическими аминокислотами, входящими в состав белков. В отличие от [190, 232], экспериментальные и расчетные результаты, выполненные авторами, согласуются друг с другом, но вступили в противоречие с приводимыми ими литературными данными.

Анализ литературных данных еще раз свидетельствует, что применение даже самых современных квантово-химических методов, особенно при исследовании механизмов реакций, должно идти параллельно с экспериментальными исследованиями и с привлечением уже имеющихся в химической науке теорий. Такой подход позволяет значительно снизить или даже исключить из рассмотрения возможные артефакты.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. При определении элементного состава ЛРС наиболее востребованными является методы МС-ИСП и ЭТААС. Для целей контроля качества и стандартизации наиболее перспективен ЭТААС, так как он в отличие от МС-ИСП не предъявляет жестких требований к составу анализируемых растворов. Для снижения риска потерь определяемых элементов и обеспечения максимальной автоматизации стадии пробоподготовки предпочтительно использовать кислотное

разложение в закрытых сосудах в условиях СВ-нагрева. Но для получения надежных результатов анализа необходим выбор унифицированных условий разложения анализируемого материала и последующего определения тяжелых металлов, исходя из их физико-химических свойств. При определении йодидов в слоевищах ламинарии более перспективен метод ионометрии.

2. Определение сахаров сопряжено со значительными сложностями. Анализ литературы показал, что при определении простых сахаров наиболее перспективным является спектрофотометрический метод, поскольку использование более современных методов, например ВЭЖХ, сопряжено со значительными трудностями в силу физико-химических свойств сахаров. Тем не менее наиболее часто используемые в отечественной фармацевтической практике антроновый, пикриновый и орциновый методы трудоемки, требуют нагрева, использования взрывоопасных веществ. Более удобным является метод Дюбуа. Но для его успешного использования в фармакогнозии необходим тщательный выбор унифицированных условий определения и пробоподготовки. При определении полисахаридов в условиях заводских лабораторий единственным доступным методом является гравиметрия, но весьма целесообразен подбор осадителей для обеспечения максимального высаждения аналитов.

3. Перспективным методом при определении арбутина, и суммы антоцианов является ВЭЖХ, поскольку данный метод, в отличие от УФ/ВИД-спектрофотометрии, позволяет улучшить точность получаемых результатов, автоматизировать процесс анализа, соединив в одном процессе стадию сброса матрицы и определения аналитов, обеспечить унификацию на более высоком уровне.

4. Важный элемент при разработке методик количественного определения действующих веществ в ЛРС – теоретическое описание протекающих химических и физико-химических процессов. В данном случае ведущую роль играют методы квантовой химии, позволяющие вполне успешно изучить многие детали химических процессов с помощью специальных компьютерных программ.

5. Проведенный обзор и систематизация данных, имеющихся в литературе, приводит к выводу о необходимости новых методологических подходов и рекомендаций по разработке и применению унифицированных методик количественного определения действующих веществ в ЛРС. При этом подходы должны основываться не только на требованиях ГФ XIV, но и на возможностях современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ И РЕАКТИВЫ, МЕТОДЫ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объекты

В качестве анализируемых образцов использовали фармакопейное ЛРС различных морфологических групп, приобретенное в аптечных сетях г. Москвы и отвечающее требованиям ГФ XIV: кора дуба, корневища бадана толстолистного, корни алтея, корни и корневища девясила высокого, корни и корневища кровохлебки лекарственной, корни лопуха, корни одуванчика лекарственного, листья березы, листья брусники обыкновенной, листья мать-и-мачехи обыкновенной, листья мелиссы лекарственной, листья ортосифона тычиночного, листья подорожника большого, листья сенны, листья толокнянки обыкновенной, листья шалфея лекарственного, плоды аронии чернополодной сухие, плоды черники обыкновенной, плоды шиповника, побеги багульника болотного, семена льна посевного, слоевища ламинарии, трава боровой матки, трава горца птичьего, трава душицы обыкновенной, трава зверобоя, трава зимолубки, трава золототысячника, трава пустырника, трава фиалки, трава хвоща полевого, трава чистотела большого, трава эрвы шерстистой, ферментированные листья бадана толстолистного (Чигирский чай), цветки бессмертника песчаного, цветки василька синего, цветки липы, цветки пижмы обыкновенной, цветки ромашки аптечной. Для приготовления геля для наружного применения использовался глюкозамина сульфат натрия хлорид (WIRUD, Германия). Образцы ЛРС приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Образцы ЛРС, использованные в работе

| <i>Морфологическая группа</i> | <i>Наименование ЛРС</i> | <i>Производитель</i> |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Трава | Душицы обыкновенной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Горца птичьего | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Золототысячника | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Фиалки | «Health Зоревье» |
| | Пустырника | «Health Зоревье» |

Продолжение таблицы 1

| <i>Морфологическая группа</i> | <i>Наименование ЛРС</i> | <i>Производитель</i> |
|-------------------------------|----------------------------|---|
| | Чистотела большого | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Зверобоя | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Эрвы шерстистой | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Боровой матки | «Русские корни» |
| | Зимолюбки | «Русские корни» |
| | Хвоща полевого | «Русские корни», ФармаЦвет («Красногорсклексредства»), «Health Зоровье», «Фитофарм» |
| Листья | Сенны | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Мать-и-мачехи обыкновенной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Березы | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Мелиссы лекарственной | «Health Зоровье» |
| | Толокнянки обыкновенной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Брусники обыкновенной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Чигирского чая | «Русские корни» |
| | Шалфея лекарственного | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Подорожника большого | «Health Зоровье» |
| Плоды | Ортосифона тычиночного | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Шиповника | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Черники обыкновенной | «Русские корни» |
| Семена | Аронии черноплодной сухие | «Русские корни» |
| | Льна посевного | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| Цветки | липы | «Health Зоровье» |
| | Ромашки аптечной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Пижмы обыкновенной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Бессмертника песчаного | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Василька синего | «Русские корни» |
| Кора | Дуба | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| Корни/корни и корневища | Кровохлебки лекарственной | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Девясила высокого | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Одуванчика лекарственного | «Health Зоровье» |
| | Алтея | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| | Лопуха | «Health Зоровье» |
| | Бадана толстолистного | ФармаЦвет («Красногорсклексредства»), «Русские корни», «Ботанический сад ВИЛАР» |
| Слоевища | Ламинарии | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |
| Побеги | Багульника болотного | ФармаЦвет («Красногорсклексредства») |

Оборудование

Для проведения исследований использовалась приборная база ЦКП (НОЦ) РУДН. УФ/ВИД-спектры регистрировались на спектрофотометре Varian Cary-100 Scan (Австралия), оптическая плотность измерялась в кювете из кварцевого стекла

с толщиной слоя 10 мм. Для регистрации ИК-спектров использовался ИК-Фурье спектрометр Varian 3100 FT-IR Excalibur Series (Varian, Австралия), таблетирование проводилось на прессе Crush IR (Pike technologies, США). Для определения металлов применялся атомно-абсорбционный спектрометр Varian AA 240G (Varian, Австралия) с электротермическим атомизатором GTA 120, атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно связанной плазмой и аксиальным обзором плазмы Varian ICP 720-ES (Varian, Австралия). Для определения бромидов, нитратов, йодидов применялся иономер Экотест-120 (НПП «Эконикс», Россия) с набором ион-селективных электродов: Эком-Br, Эком-NO₃, Эком-I, и хлорсеребряным электродом сравнения ЭСр 10101. Масс-спектры и хроматограммы одновременно регистрировались на хромато-масс-спектрометре Agilent 1290 (Agilent, США), оборудованном источником ионизации типа «Электроспрей» и тройным квадрупольным масс-спектрометром Agilent 6430 (Agilent, США). Хроматограммы были получены с помощью высокоэффективных жидкостных хроматографов Varian ProStar 500 Series (Varian, Австралия), Agilent 1200 (Agilent, США), оборудованных спектрофотометрическими детекторами. Взвешивание проводилось на аналитических весах Acculab Atilon ATL-220d4-I (Sartorius, Германия), термический нагрев – на водяной бане Loip LB-162 (АО «Лоип», Россия) или плитке Loip LH-302 (АО «Лоип», Россия), микроволновый нагрев – в печи Milestone Ethos 1 (Milestone, Италия), озвучивание – на водяной бане Сапфир-9,5 ТТЦ (ООО «Сапфир», Россия). В работе использовалась муфельная печь L (LT) 5/11 (Nabertherm, Германия). С помощью сит Retsch (Retsch, Германия) проводилось просеивание анализируемых образцов. Плавление проб осуществлялось в платиновых тиглях с крышкой (National analytical corporation, India).

Стандартные образцы (СО)

Для разработки методик были использованы следующие СО/растворы: мультиэлементный стандартный раствор IV для ИСП 1000 мг/л (Merck, Германия), раствор СО состава ионов кадмия 1000 мг/л (Merck, Германия), раствор СО состава ионов свинца 1000 мг/л (Merck, Германия), раствор СО состава ионов мышьяка 1000 мг/л (Merck, Германия), СО глюкозы (USP CAS Number 50-99-7), СО фруктозы

(USP CAS Number 57-48-7), СО арбутина (EP RS CAS Number: 497-76-7), СО цианидин-3-глюкозид хлорида (USP RS, CAS Number 7084-24-4, далее по тексту цианидин-3-глюкозид), ГСО 728-75 состава нефелиновой руды СНС-1 (содержание SiO_2 40,2 %), СО глюкозамина сульфата натриевой соли (EP RS) (далее по тексту глюкозамин сульфата).

Реактивы

Вода очищенная, азотная кислота концентрированная высокой степени чистоты («Trace metal grade») фирмы Fisher Chemical, аскорбиновая кислота квалификации «ОСЧ» (Химмед, Россия), никель (II) азотнокислый 6-водный квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), водорода пероксид квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), фенол квалификации «для биохимических исследований» (Химмед, Россия), кислота серная концентрированная квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), кислота хлористоводородная концентрирования квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), этанол для хроматографии (J.T.BAKER, Нидерланды), формиат аммония «для масс-спектрометрии» (Sigma-Aldrich, Германия), фенолфталеин «не ниже 99 %» (Химреактив, Индия), ацетонитрил «для ВЭЖХ» (Fisher Chemicals, США), муравьиная кислота 99,9 % (Acros Organics, Бельгия), калия бромид квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), калия йодид квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), калия нитрат квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), калия сульфат квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), аммония молибдат квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), винная кислота квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), метол квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), натрия сульфит безводный квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), натрия тетраборат квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия), натрия карбонат безводный «ХЧ» (Химмед, Россия), алюминия оксид «для хроматографии» (Химмед, Россия), спирт этиловый 95 % квалификации «ХЧ» (Химмед, Россия).

Квантово-химические исследования

Для выполнения квантово-химических исследований применяли программный пакет Gaussian 09: полуэмперический метод PM3, метод функционала плотности B3LYP в базисе 6-311G(d,p). Заряды рассчитывали по

способу Малликена. Для поиска возможных переходных состояний применяли метод QST2. Визуализацию расчетов осуществляли с помощью редактора GaussView 5.0.8. В настоящей работе квантово-химические исследования использовались для теоретического исследования процессов развития аналитических сигналов при спектрофотометрическом определении суммы сахаров и полисахаридов, определении арбутина и глюкозамина методом ВЭЖХ/МС.

Обработка результатов анализа

Для статистической обработки экспериментальных результатов использовалась программа Excel из программного пакета Microsoft Office 2007. Обработка результатов анализа проводилась согласно ГФ XIV ОФС.1.1.0013.15 («Статистическая обработка результатов химического анализа»). Метрологические характеристики метод анализа рассчитывались по формулам:

Среднее выборки

$$\bar{X} = \frac{\sum_1^n x_i}{n},$$

где x_i – результат анализа;
 n – число параллельных определений.

Дисперсия

$$S^2 = \frac{\sum_1^n (\bar{X} - X_i^2)}{n-1},$$

где \bar{X} – среднее выборки;
 X_i – результат анализа;
 n – число параллельных определений.

Стандартное отклонение

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (\bar{X} - X_i^2)}{n-1}},$$

где \bar{X} – среднее выборки;
 X_i – результат анализа;
 n – число параллельных определений.

Стандартное отклонение среднего результата

$$s_{\bar{0}} = \frac{s}{\sqrt{n}},$$

где s – стандартное отклонение;
 n – число параллельных определений.

Относительное стандартное отклонение среднего результата
(коэффициент вариации)

$$s_{\bar{0},\%} = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\%,$$

где \bar{X} – среднее выборки.

Доверительный интервал

$$\bar{X} \pm \Delta X = \bar{X} \pm \frac{t(P,f) \cdot s}{\sqrt{n}},$$

где \bar{X} – среднее выборки;
 $t(P,f)$ – табличное значение критерия Стьюдента при доверительной вероятности P
и числе степеней свободы f ;
 n – число параллельных определений.

Коэффициент корреляции

$$r = \sqrt{R^2},$$

где R – величина достоверной аппроксимации, получаемая из анализа линейных зависимостей по методу наименьших квадратов.

Относительная погрешность

$$E = \frac{\Delta X}{\bar{X}} \cdot 100\%,$$

где \bar{X} – среднее выборки;
 ΔX – доверительный интервал.

Валидация проводилась в соответствии с требованиями ГФ XIV (ОФС.1.1.0012.15) [9], по параметрам специфичность, линейность, правильность, аналитическая область, повторяемость.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛРС

3.1. Выбор условий кислотного разложения ЛРС в условиях МВ-нагрева

Выбор условий кислотного разложения образцов ЛРС проводили на примере мышьяка, поскольку он обладает наибольшей летучестью среди всех изученных элементов и, как следствие, наибольшей склонностью к потерям в процессе пробоподготовки. Для контроля возможных потерь в процессе отработки условий кислотного разложения в условиях МВ-нагрева использовали метод добавок. В качестве анализируемого объекта были выбраны плоды мышьяка, так как предварительным анализом было установлено отсутствия мышьяка в данном объекте. Основным варьируемым параметром была температура, поскольку в МВ-условиях она оказывает наибольшее влияние на качество разложения органической матрицы. Согласно рекомендациям к закрытым МВ-системам [194] навеска анализируемого органического материала не должна превышать 1 г, а размер частиц – не менее 0,5 или 1 мм, чтобы избежать взрыва тефлоновых сосудов вследствие неконтролируемого быстрого повышения давления, увеличивающегося за счет разложения органической матрицы анализируемого объекта. Учитывая имеющиеся ограничения, разложение проводили следующим образом: 0,5 г сырья (плоды шиповника), измельченное до размера частиц, проходящих через сито с размером отверстий 1 мм, помещали в тефлоновый сосуд, прибавляли 5 мл кислоты азотной концентрированной (обеспечивает минимальное мешающее влияние при последующем ЭТААС-определении). Для увеличения окислительного потенциала системы вводили 0,5 мл водорода пероксида. Далее вводили раствор добавки таким образом, чтобы после перевода полученного после разложения раствора в мерную колбу, концентрация мышьяка находилась на нанограммовом уровне (20 нг/мл).

Установлено (Рисунок 5), что наиболее оптимальным оказался диапазон температур 150–170 °С, при котором достигается не только разложение исследуемого материала, но и не наблюдается потерь мышьяка (введено – 20 нг/мл, найдено – 22 нг/мл).

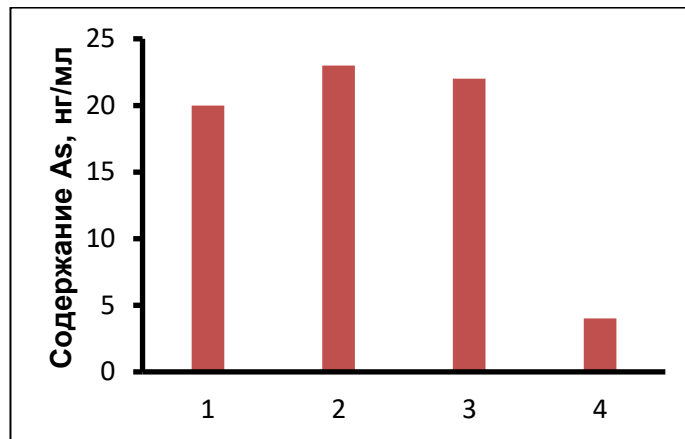


Рисунок 5 – Содержание As в испытуемых растворах, полученных при разных температурах кислотного разложения в условиях МВ-нагрева (1 – 25 °С, 2 – 150°С, 3 – 170 °С, 4 – 200 °С)

При температурах ниже 150 °С наблюдается неполное разложения органической матрицы, что подтверждено методом УФ/ВИД-спектрофотометрии (Рисунок б).

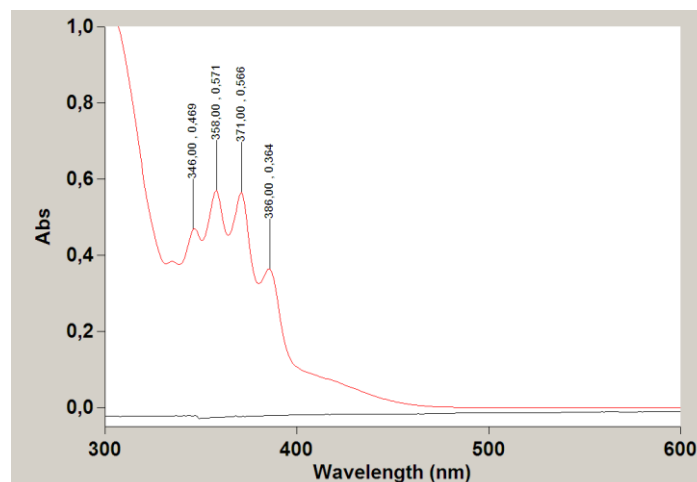


Рисунок б – УФ/ВИД-спектр раствора, полученного после кислотного разложения растительной матрицы при температурах 120–150 °С.

Действительно, набор полос поглощения в области 346 – 386 нм свидетельствует о присутствии в испытуемом растворе недоразложившихся веществ органического происхождения. При повышении температуры выше 170 °С

наблюдаются потери мышьяка (Рисунок 5). На основании полученных данных были выбраны следующие условия разложения ЛРС в условиях МВ-нагрева: масса навески растительного материала – 0,5 г, объем азотной кислоты концентрированной – 5 мл, объем водорода пероксида – 0,5 мл, время разложения – 20 мин, температура разложения – 170 °С.

3.2. Разработка методики количественного определения макроколичеств элементов методом АЭС-ИСП

Разработка методики определения макро- и микроколичеств металлов методом АЭС-ИСП проводилась на примере наиболее распространенных в природных живых объектах элементов: алюминия, бария, кальция, кобальта, хрома, меди, железа, калия, магния, марганца, никель, стронция, цинка.

Как любой другой относительный метод, АЭС-ИСП нуждается в калибровке аналитического сигнала. Анализ можно проводить по одной точке, поскольку метод обладает линейным динамическим диапазоном, достигающим 5-7 порядков. Однако для получения надежных результатов элементного анализа желательно проводить калибровку по нескольким стандартным растворам, что обусловлено не только спектральными влияниями, свойственными этому методу, но и достаточно низким содержанием элементов, а также неравномерностью их распределения в природных образцах. В настоящем исследовании определение металлов методом АЭС-ИСП проводили по градуировочной зависимости для каждого элемента, построенной путем введения в плазму стандартных растворов не менее 3 раз. Концентрации стандартных растворов подбирались исходя из возможного содержания аналитов в ЛРС. Концентрации стандартных растворов для АЭС-ИСП находились в диапазоне от 0,2 до 20 мкг/мл по всем определяемым элементам. По полученной калибровочной кривой находили концентрацию аналитов в испытуемых растворах, полученных после кислотного разложения растительных образцов в условиях МВ-нагрева. По полученной концентрации рассчитывали содержание элементов, выраженное в мг/г. Длины волн элементов были выбраны

из справочника, входящего в программное обеспечение прибора, таким образом, чтобы обеспечить, по возможности, максимальную чувствительность и отсутствие спектральных наложений на аналитическую эмиссионную линию определяемого элемента как со стороны иных эмиссионных линий аналита, так и со стороны эмиссионных линий других элементов и аргидных влияний особенно в видимом диапазоне (проявляются за счет образующихся соединений между аргоном и кислородом). Наиболее существенны спектральные влияния при аксиальном обзоре плазмы, однако и чувствительность определения выше.

Для учета/контроля таких влияний определение элементов можно осуществлять на двух выбранных длинах волн, при этом концентрация определяемых элементов представляется как среднее арифметическое концентраций, полученных при определении на каждой длине волны. Это наиболее важно для щелочных металлов: калия, стронция и особенно цезия, у которых наиболее чувствительные линии эмиссии находятся в видимой области спектра, и вероятность влияний со стороны газообразных соединений аргона и кислорода, образующихся в условиях низкотемпературной плазмы, высока. При разработке методик количественного определения металлов это необходимо учитывать и выбирать по возможности эмиссионные линии, находящиеся в ультрафиолетовой области спектра.

Длины волн эмиссии, использованные при разработке методики, а также условия, выбранные для обеспечения максимальной чувствительности определения, представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Условия определения элементов методом АЭС-ИСП ([53, 56, 64] – результаты получены автором)

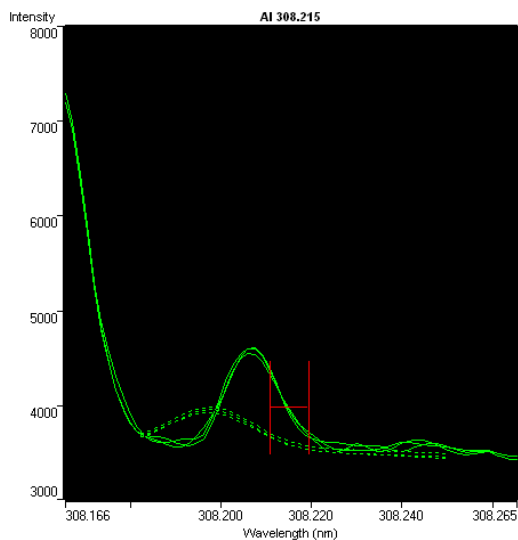
| | |
|--------------------------------------|------------|
| Обзор плазмы | аксиальный |
| Монохроматор | Эшелле |
| Плазмообразующий поток, л/мин | 15 |
| Дополнительный поток, л/мин | 1,50 |
| Поток на распыление, л/мин | 0,75 |

Продолжение таблицы 2

| | |
|--|---|
| Скорость вращения перистальтического насоса, об/мин | 15 |
| Давление газа на распылителе, psi | 40 |
| Объём вводимой пробы, мл | 2-3 |
| Аналитические длины волн, нм | Al: 308,215; 396,152 Ba: 233,527; 455,403 Ca: 318,127 Co: 228,615; 238,892 Cr: 267,716; 283,563 Cu: 324,754; 327,395 Fe: 238,204; 259,940 K: 766,491 Mg: 280,270 Mn: 257,610 Ni: 231,604 Sr: 407,771 Zn: 206,200; 213,857 |

В процессе исследования специфичности были получены сигналы эмиссии растворителя (Рисунки 7-18), представляющего собой подкисленную воду.

308,215 нм



396,152 нм

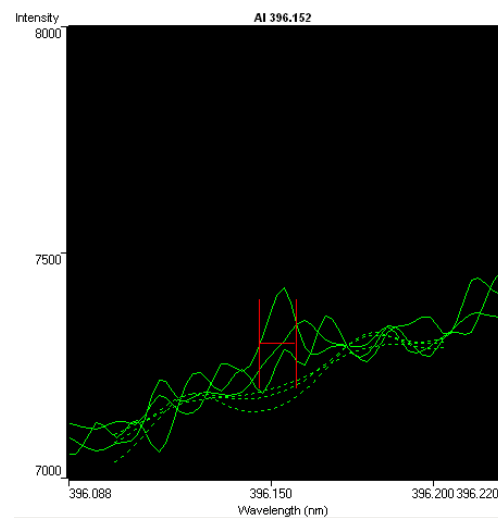
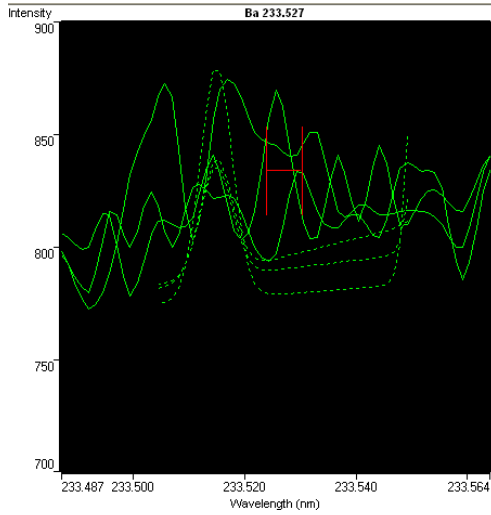


Рисунок 7 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Al)

233,527 нм



455,403 нм

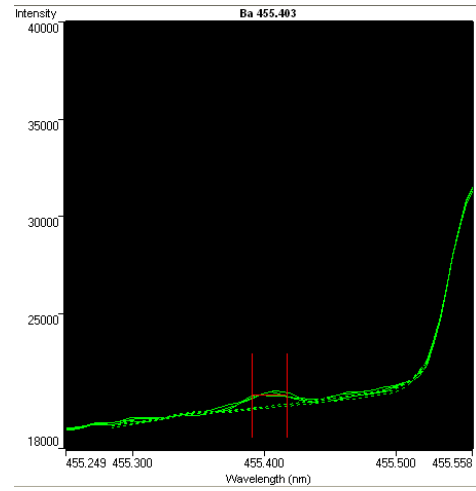
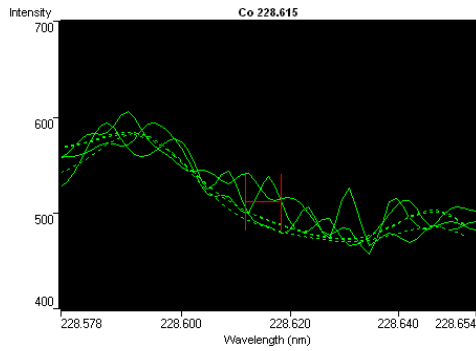


Рисунок 8 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Ba)

228,615 нм



238,892 нм

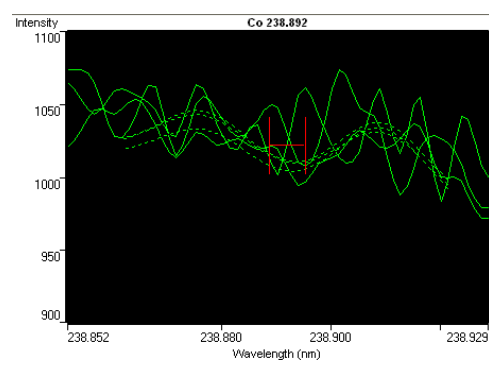
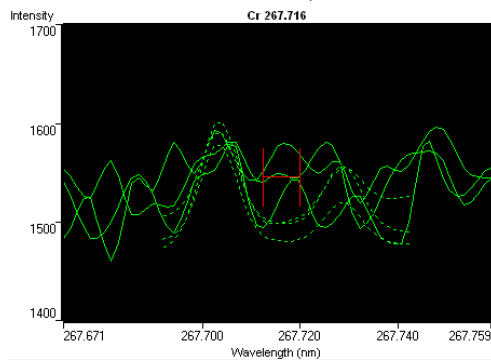


Рисунок 9 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Co)

267,716 нм



283,563 нм

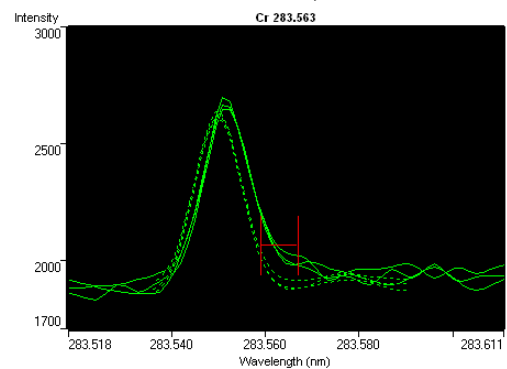


Рисунок 10 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Cr)

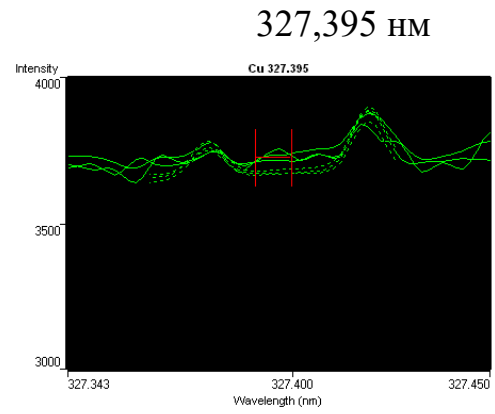
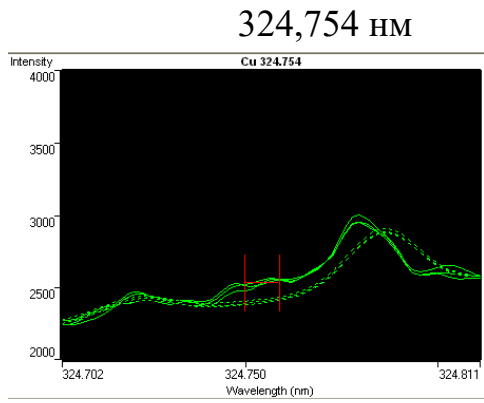


Рисунок 11 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Cu)

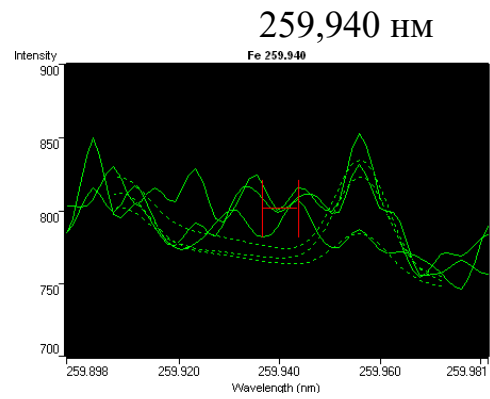
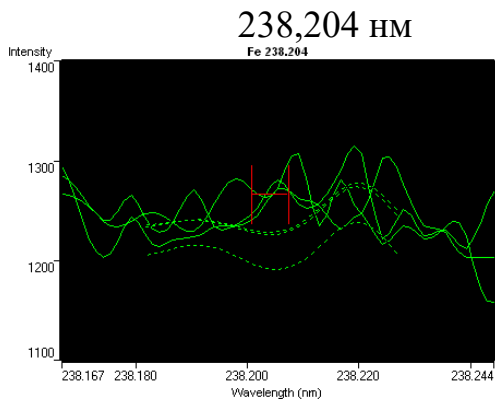


Рисунок 12 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Fe)

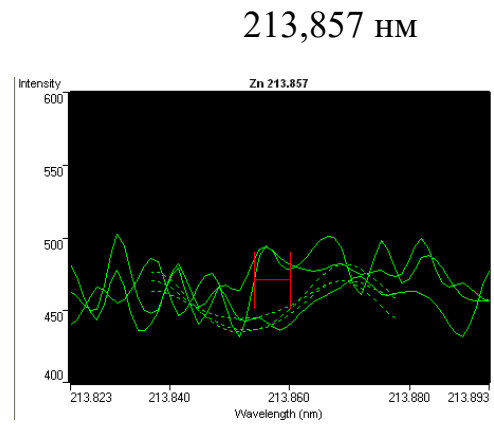
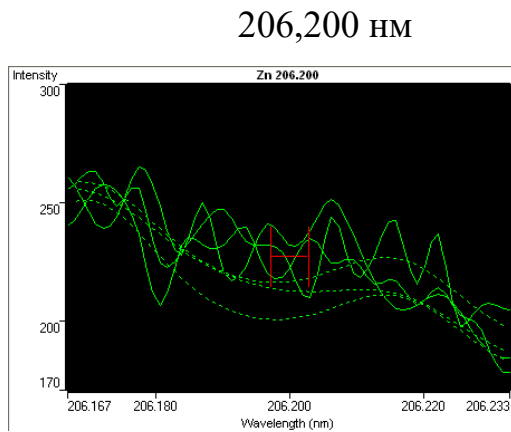


Рисунок 13 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Zn)

318,127 нм

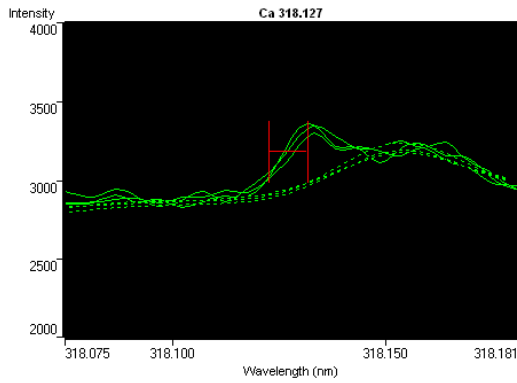


Рисунок 14 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Ca)

766,491 нм

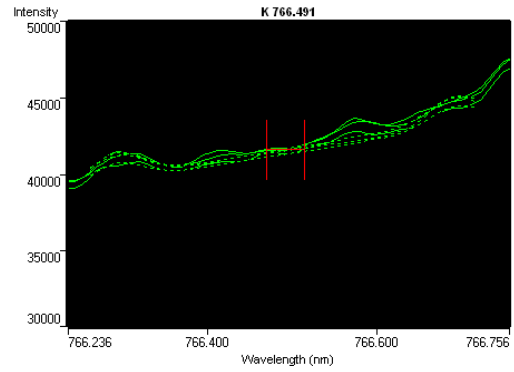


Рисунок 15 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (K)

280,270 нм

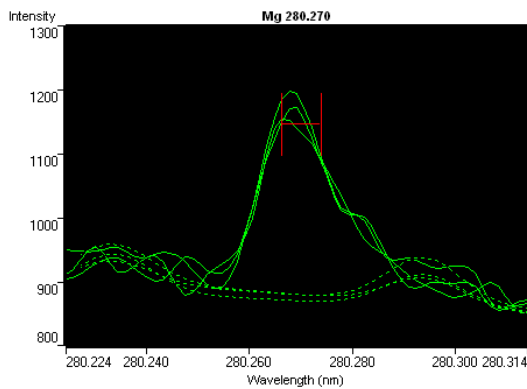


Рисунок 16 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Mg)

257,610 нм

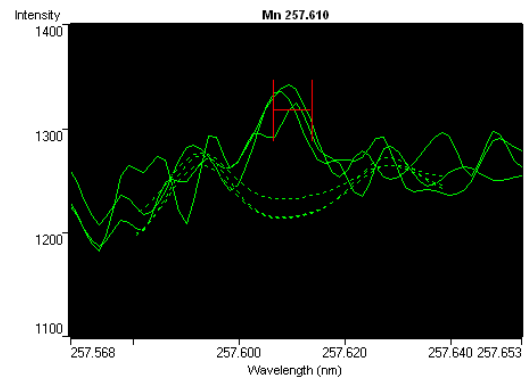


Рисунок 17 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Mn)

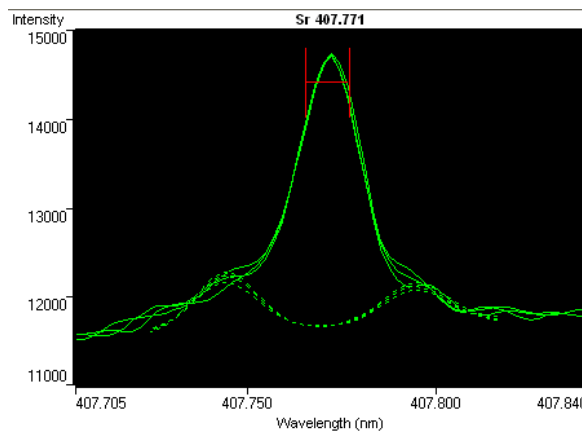


Рисунок 18 – Аналитические сигналы элементов в растворителе (Sr 407,771 нм)

При определении никеля методом АЭС-ИСП на длине волны 231,604 нм влияния растворителя на аналитические сигналы никеля также не наблюдалось.

Из представленных на Рисунках 7–18 данных видно, что при определении указанных элементов отсутствуют спектральные наложения на выбранные

аналитические линии эмиссии. Незначительные пики эмиссии, наблюдающихся для наиболее чувствительных линий Ba (238,892 нм), Mg (280,270 нм), Sr (407,771 нм) обусловлены содержанием этих элементов в растворителе на уровне геохимического фона. Влияние растворителя на аналитические сигналы аналитов не было отмечено. Обращает на себя внимание, что при определении элементов на эмиссионных линиях Al (308,215 нм), Ba (455,403 нм), Cr (283,563 нм), Ca (318,127 нм) возможно завышение величин эмиссии при попытках определить эти элементы на уровнях, близких к нанограммовым значениям (ниже 0,1 мкг/мл).

Для изучения линейного диапазона готовили серию стандартных растворов с содержанием аналитов от 0,2 до 20 мкг/мл. Приготовление более концентрированных стандартных растворов нецелесообразно, поскольку содержание даже самых распространенных элементов в ЛРС в пересчете на концентрации в испытуемом растворе, полученном по методике вскрытия описанной выше (см. раздел 3.1), как правило, не превышает 20 мкг/мл. Концентрации растворов, коэффициенты вариации, величины эмиссии (I), выраженные в пикселях, приведены в Таблицах 3–15.

Полученные данные свидетельствуют, что коэффициент вариации, рассчитанный при трехкратном введении анализируемых растворов в плазму не превышают: для Al (308,215) – 3,0 %, Al (396,152) – 2,5 %, Ba (233,527) – 2,5 %, Ba (455,403) – 2,5 %, Co (228,615) – 3,0 %, Co (238,892) – 3,0 %, Cr (267,716) – 2,5 %, Cr (283,563) – 3,5 %, Cu (324,754) – 3,5 %, Cu (327,395) – 3,5 %, Fe (238,204) – 3,0 %, Fe (259,940) – 3,5 %, Zn (206,200) – 3,5 %, Zn (213,857) – 3,0 %, Ca (318,127) – 3,0 %, K (766,491) – 3,0 %, Mg (280,270) – 3,0 %, Mn (257,610) – 2,0 %, Ni (231,604) – 3,0 %, Sr (407,771) – 2,0 %. Таким образом, коэффициент вариации для любой концентрации определяемых элементов внутри линейного диапазона (от 0,2 до 20 мкг/мл) не превышает 3,5 %.

Графики зависимостей средних величин эмиссии (I_{cp}) от концентрации аналитов в стандартных растворах представлены на Рисунках 19–38: по оси ординат отложены величины I_{cp} , по абсцисс – концентрации растворов.

Таблица 3 – Линейность определения Al (308,215, 396,152 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 308,215 | 2015,627 | 4327,060 | 8181,859 | 15099,551 | 35092,652 | 69149,000 | 127553,844 |
| | 1990,872 | 4379,292 | 7976,561 | 14950,867 | 33956,773 | 67523,492 | 127864,203 |
| | 2012,937 | 4362,441 | 7988,562 | 14561,140 | 35723,336 | 66971,898 | 126528,203 |
| I _{ср} | 2006,479 | 4356,264 | 8048,994 | 14870,519 | 34924,254 | 67881,464 | 127315,417 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 0,68 | 0,61 | 1,43 | 1,87 | 2,56 | 1,67 | 0,55 |
| 396,152 | 4672,808 | 10928,802 | 22043,268 | 41418,289 | 96306,531 | 189203,563 | 355569,875 |
| | 4608,220 | 11050,145 | 21433,811 | 41025,426 | 94138,219 | 184909,750 | 355812,156 |
| | 4579,254 | 11288,981 | 21448,926 | 40550,520 | 98381,148 | 183955,219 | 355069,719 |
| I _{ср} | 4620,094 | 11089,309 | 21642,001 | 40998,078 | 96275,299 | 186022,844 | 355483,917 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 1,04 | 1,65 | 1,61 | 1,06 | 2,20 | 1,50 | 0,11 |

Таблица 4 – Линейность определения Ва (233,527, 455,403 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|---|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 233,527 | 10359,824 | 25442,297 | 52403,297 | 98589,313 | 236672,969 | 466371,656 | 837057,625 |
| | 10137,740 | 25652,584 | 50715,188 | 97607,016 | 230420,406 | 456289,938 | 856175,438 |
| | 10273,611 | 26115,480 | 50446,785 | 95845,617 | 241639,469 | 454245,313 | 842963,563 |
| I _{ср} | 10257,059 | 25736,787 | 51188,423 | 97347,315 | 236244,281 | 458968,969 | 845398,875 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 1,09 | 1,34 | 2,07 | 1,43 | 2,38 | 1,41 | 1,16 |
| 455,403 | 228635,938 | 543548,313 | 1092467,625 | 2080744,845 | 4850258,500 | 8802952,000 | 15712816,000 |
| | 219523,875 | 547747,438 | 1065730,000 | 2042132,875 | 4773136,500 | 8542095,000 | 16107366,000 |
| | 222466,766 | 555645,938 | 1069854,875 | 1986653,500 | 4959563,000 | 8568416,000 | 15902094,000 |
| I _{ср} | 223542,193 | 548980,563 | 1076017,500 | 2036510,417 | 4860986,000 | 8637821,000 | 15907425,000 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 2,08 | 1,12 | 1,34 | 2,32 | 1,93 | 1,66 | 1,24 |

Таблица 5 – Линейности определения C_0 (228,615, 238,892 нм)

| Длина волны, нм | C , мкг/мл | | | | | | |
|---|--------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 228,615 | 1671,372 | 4073,076 | 8246,257 | 15691,387 | 37515,688 | 73827,430 | 135214,234 |
| | 1653,906 | 4141,667 | 8048,702 | 15444,237 | 36444,527 | 72186,703 | 136848,953 |
| | 1644,905 | 4162,380 | 7951,941 | 15109,825 | 38339,602 | 71513,484 | 135226,047 |
| I_{cp} | 1656,728 | 4125,707 | 8082,300 | 15415,150 | 37433,272 | 72509,206 | 135779,745 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 0,81 | 1,13 | 1,86 | 1,89 | 2,54 | 1,64 | 0,71 |
| 238,892 | 4727,458 | 11436,188 | 23074,469 | 44193,703 | 103451,398 | 205405,750 | 389346,063 |
| | 4590,564 | 11586,302 | 22586,135 | 43632,934 | 102127,086 | 200723,922 | 386387,000 |
| | 4628,865 | 11701,314 | 22619,684 | 42908,348 | 107398,289 | 200732,453 | 384872,625 |
| I_{cp} | 4848,963 | 11574,602 | 22760,096 | 43578,328 | 104325,591 | 202287,375 | 386868,563 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 1,52 | 1,15 | 1,20 | 1,48 | 2,63 | 1,34 | 0,59 |

Таблица 6 – Линейность определения Cr (267,716, 283,563 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 267,716 | 7058,665 | 17032,045 | 34921,766 | 66468,398 | 160152,984 | 314662,750 | 572908,375 |
| | 6826,906 | 17334,178 | 34054,086 | 66218,547 | 156468,250 | 309628,281 | 584987,500 |
| | 7001,104 | 17614,439 | 34044,691 | 65168,691 | 163457,078 | 306958,719 | 579243,750 |
| I _{ср} | 6962,225 | 17326,887 | 34340,181 | 65951,879 | 160026,104 | 310416,583 | 579046,542 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{d},\%}$), % | 1,73 | 1,68 | 1,47 | 1,05 | 2,19 | 1,26 | 1,04 |
| 283,563 | 9315,946 | 22742,637 | 46639,457 | 84696,305 | 212361,844 | 412425,438 | 757515,563 |
| | 9209,603 | 22895,850 | 44746,070 | 87312,688 | 202402,438 | 403120,281 | 770084,563 |
| | 9316,675 | 23386,654 | 44964,188 | 88105,813 | 214941,797 | 409065,844 | 756307,000 |
| I _{ср} | 9280,741 | 23008,380 | 45449,905 | 86704,935 | 209902,026 | 408203,854 | 761302,375 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{d},\%}$), % | 0,66 | 1,46 | 2,28 | 2,06 | 3,16 | 1,15 | 1,00 |

Таблица 7 – Линейность определения Cu (324,754, 327,395 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 324,754 | 4479,426 | 10705,668 | 20915,104 | 39335,793 | 94216,922 | 184801,250 | 352720,906 |
| | 4364,998 | 10520,615 | 20375,547 | 39191,832 | 88676,273 | 177264,000 | 353134,719 |
| | 4384,430 | 10760,648 | 20534,549 | 38814,922 | 93801,953 | 181952,125 | 346411,844 |
| I _{ср} | 4409,618 | 10662,311 | 20608,400 | 39114,182 | 92231,716 | 181339,125 | 350755,823 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\sigma},\%}$), % | 1,39 | 1,18 | 1,35 | 0,69 | 3,35 | 2,10 | 1,07 |
| 327,395 | 5659,894 | 13647,632 | 27156,730 | 51460,531 | 124623,656 | 244658,141 | 466857,125 |
| | 5532,193 | 13656,064 | 26636,180 | 51419,770 | 117300,328 | 236046,531 | 467937,438 |
| | 5614,365 | 13865,592 | 26773,313 | 50868,977 | 124106,742 | 242063,500 | 459598,063 |
| I _{ср} | 5602,151 | 13723,096 | 26855,408 | 51249,759 | 122010,242 | 240922,724 | 464797,542 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\sigma},\%}$), % | 1,16 | 0,90 | 1,01 | 0,65 | 3,35 | 1,83 | 0,98 |

Таблица 8 – Линейность определения Fe (238,204, 259,940 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 238,204 | 10077,018 | 24549,113 | 50703,828 | 92306,594 | 225350,922 | 447955,344 | 807882,250 |
| | 9826,539 | 24832,729 | 48799,813 | 95029,867 | 222484,953 | 436936,156 | 823501,125 |
| | 9862,135 | 25315,355 | 48669,977 | 95411,977 | 233928,797 | 437910,125 | 815845,500 |
| I _{ср} | 9921,897 | 24899,066 | 49391,206 | 94249,479 | 227254,891 | 440933,875 | 815742,958 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{d},\%}$), % | 1,37 | 1,56 | 2,31 | 1,80 | 2,62 | 1,38 | 0,96 |
| 259,940 | 4260,359 | 9739,114 | 19980,977 | 37599,945 | 89198,797 | 173767,359 | 332794,094 |
| | 3986,817 | 9834,967 | 19308,699 | 37269,855 | 86018,867 | 171830,844 | 331524,344 |
| | 3894,464 | 10030,151 | 19345,619 | 36725,977 | 91857,609 | 172766,656 | 329752,000 |
| I _{ср} | 4047,214 | 9868,077 | 19545,098 | 37198,592 | 89025,091 | 172788,286 | 331356,813 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{d},\%}$), % | 4,70 | 1,50 | 1,93 | 1,19 | 3,28 | 0,56 | 0,46 |

Таблица 9 – Линейность определения Zn (206,200, 213,857 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 206,200 | 1987,025 | 4891,150 | 9996,793 | 19006,168 | 44723,367 | 87711,391 | 160818,609 |
| | 1892,681 | 4856,883 | 9619,470 | 18575,500 | 43702,727 | 86837,422 | 163592,797 |
| | 1927,719 | 5013,184 | 9594,064 | 18112,445 | 46412,914 | 84946,242 | 162075,500 |
| I _{ср} | 1935,808 | 4920,406 | 9736,776 | 18564,704 | 44946,336 | 86498,352 | 162075,500 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{d},\%}$), % | 2,46 | 1,67 | 2,32 | 2,41 | 3,05 | 1,63 | 0,86 |
| 213,857 | 6858,598 | 17020,957 | 34775,574 | 65937,727 | 155143,453 | 302830,063 | 532143,438 |
| | 6775,506 | 17022,160 | 33520,410 | 65150,281 | 151957,563 | 297062,688 | 547117,750 |
| | 6871,266 | 17376,803 | 33732,738 | 63858,219 | 159014,922 | 294794,656 | 544051,813 |
| I _{ср} | 6835,123 | 17139,973 | 34009,574 | 64982,076 | 155371,979 | 298229,135 | 541104,333 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{d},\%}$), % | 0,76 | 1,20 | 1,98 | 1,62 | 2,28 | 1,39 | 1,46 |

Таблица 10 – Линейность определения Са (318,127 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 318,127 | 794,594 | 1608,187 | 2889,949 | 5380,548 | 12244,009 | 23868,861 | 44557,418 |
| | 775,028 | 1547,052 | 2803,781 | 5231,524 | 12117,063 | 23380,879 | 44510,320 |
| | 805,297 | 1615,956 | 2880,896 | 5170,183 | 12470,059 | 23323,385 | 44462,449 |
| I _{ср} | 791,640 | 1590,398 | 2858,209 | 5260,752 | 12277,044 | 23524,375 | 44510,063 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 1,94 | 2,37 | 1,66 | 2,06 | 1,46 | 1,27 | 0,11 |

Таблица 11 – Линейность определения К (766,491 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 766,491 | 8438,824 | 22650,063 | 48486,520 | 99256,781 | 260238,359 | 531243,500 | 1075062,125 |
| | 8567,508 | 22662,270 | 47381,801 | 97971,625 | 251726,203 | 518475,375 | 1099701,500 |
| | 8405,930 | 23254,063 | 47870,277 | 96328,516 | 265139,750 | 516654,781 | 1084181,500 |
| I _{ср} | 8470,754 | 22855,465 | 47912,866 | 97852,307 | 259034,771 | 522124,552 | 1086315,042 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 1,01 | 1,51 | 1,16 | 1,50 | 2,62 | 1,52 | 1,15 |

Таблица 12 – Линейность определения Mg (280,270 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 280,270 | 50008,234 | 120166,266 | 244103,422 | 448147,188 | 1038723,250 | 2015856,000 | 3604635,750 |
| | 48079,297 | 118377,383 | 238064,141 | 459914,219 | 1019812,563 | 1962682,250 | 3657782,250 |
| | 49145,129 | 120437,906 | 235331,719 | 464461,688 | 1067943,750 | 1956625,500 | 3614458,750 |
| I _{ср} | 49077,553 | 119660,518 | 239166,427 | 457507,698 | 1042159,854 | 1978387,917 | 3625625,583 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 1,97 | 0,94 | 1,88 | 1,84 | 2,33 | 1,65 | 0,78 |

Таблица 13 – Линейность определения Mn (257,610 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|--|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 257,610 | 37979,449 | 91381,445 | 184731,234 | 339145,250 | 808668,125 | 1566333,625 | 28455438,500 |
| | 36538,816 | 89255,078 | 180591,266 | 348709,000 | 791445,375 | 1511933,375 | 2905656,500 |
| | 37075,090 | 91003,883 | 178429,688 | 350307,656 | 822420,063 | 1527857,750 | 2878664,250 |
| I _{ср} | 37197,785 | 90546,802 | 181250,729 | 346053,969 | 807511,188 | 1535374,917 | 2876586,417 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 1,96 | 1,25 | 1,77 | 1,74 | 1,92 | 1,82 | 1,05 |

Таблица 14 – Линейность определения Ni (231,604 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | | | |
|---|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| 231,604 | 1543,404 | 3783,948 | 7564,281 | 14304,688 | 33686,359 | 67387,203 | 123190,359 |
| | 1518,664 | 3766,429 | 7375,797 | 14197,366 | 33067,063 | 65932,039 | 125291,922 |
| | 1563,397 | 3912,845 | 7406,998 | 13830,312 | 34981,926 | 65212,402 | 123637,367 |
| I _{ср} | 1541,822 | 3821,074 | 7449,025 | 14110,789 | 33911,783 | 66177,215 | 124039,883 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 1,45 | 2,09 | 1,36 | 1,76 | 2,88 | 1,67 | 0,89 |

Таблица 15 – Линейность определения Sr (407,771 нм)

| Длина волны, нм | С, мкг/мл | | | | |
|---|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 |
| 407,771 | 783000,875 | 1898272,750 | 3840477,750 | 6726133,000 | 15368556,000 |
| | 761581,125 | 1917435,625 | 3723004,500 | 6597066,000 | 15152499,000 |
| | 772753,063 | 1937277,500 | 3732111,500 | 6465253,500 | 15703989,000 |
| I _{ср} | 772445,021 | 1917661,958 | 3765197,917 | 6596150,833 | 15408348,000 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\delta},\%}$), % | 1,39 | 1,02 | 1,74 | 1,98 | 1,80 |

308,215 нм

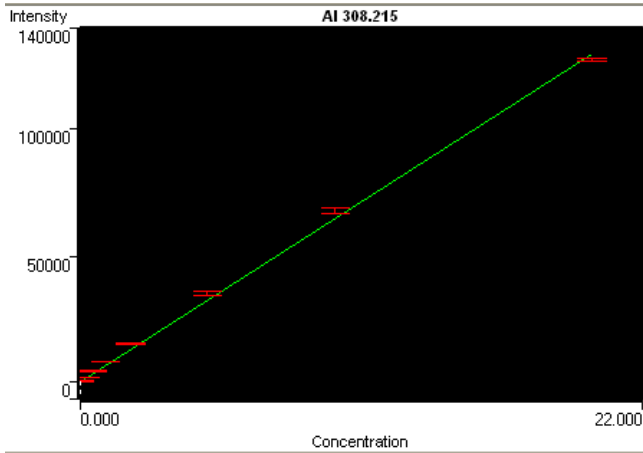


Рисунок 19 – Зависимость
аналитического сигнала AI от
концентрации стандартных растворов

396,152 нм

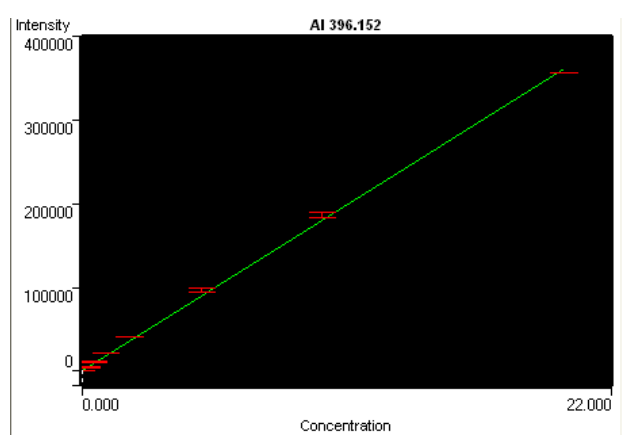


Рисунок 20 – Зависимость
аналитического сигнала AI от
концентрации стандартных растворов

233,527 нм

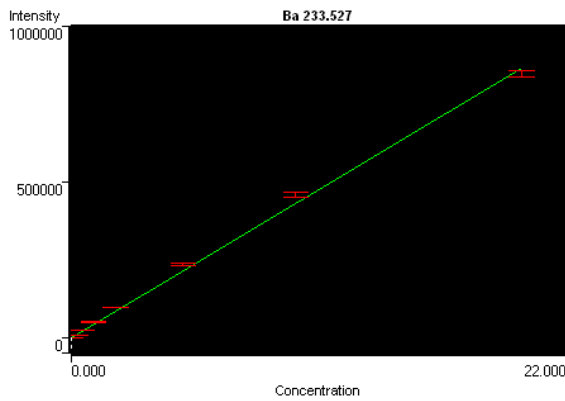


Рисунок 21 – Зависимость
аналитического сигнала Ba от
концентрации стандартных растворов

455,403 нм

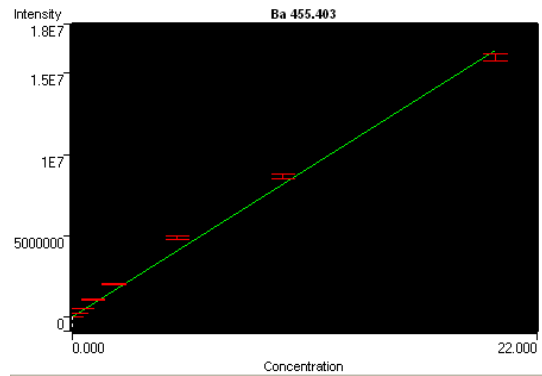


Рисунок 22 – Зависимость
аналитического сигнала Ba от
концентрации стандартных растворов

228,615 нм

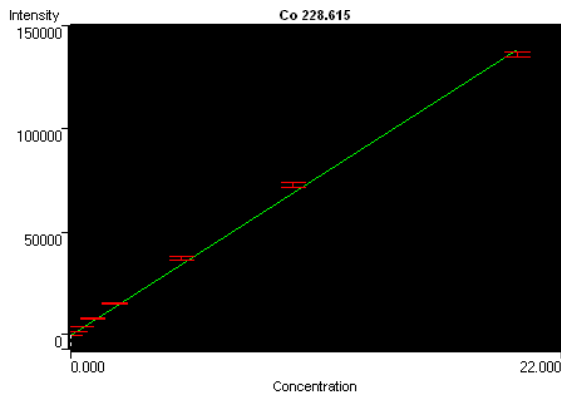


Рисунок 23 – Зависимость
аналитического сигнала Co от
концентрации стандартных растворов

238,892 нм

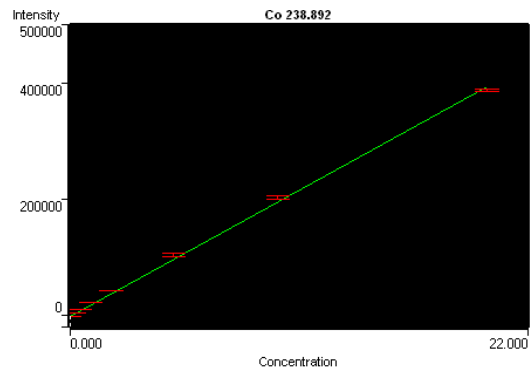


Рисунок 24 – Зависимость
аналитического сигнала Co от
концентрации стандартных растворов

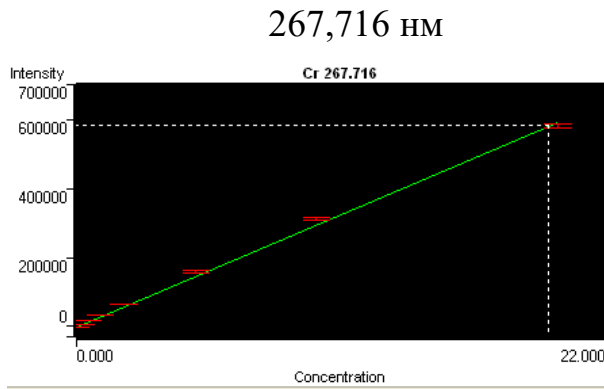


Рисунок 25 – Зависимость
аналитического сигнала Cr от
концентрации стандартных растворов
324,754 нм

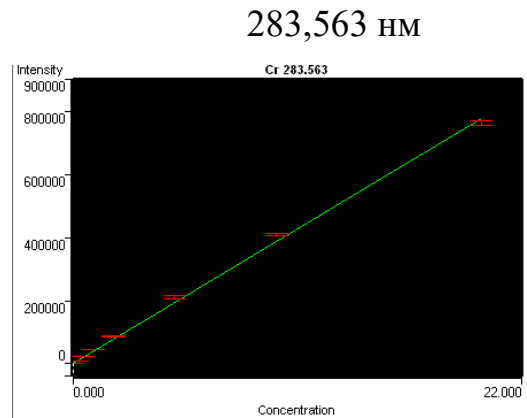


Рисунок 26 – Зависимость
аналитического сигнала Cr от
концентрации стандартных растворов
327,395 нм

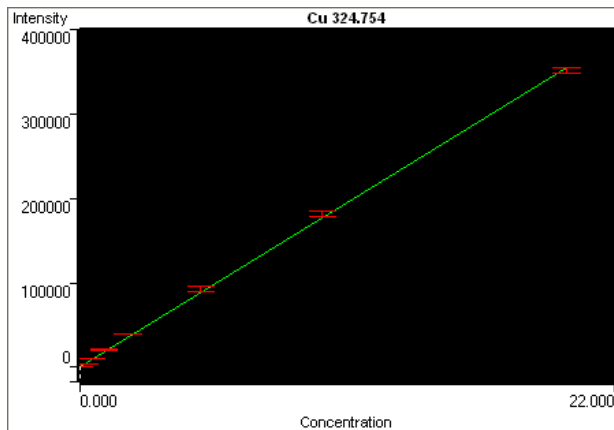


Рисунок 27 – Зависимость
аналитического сигнала Cu от
концентрации стандартных растворов

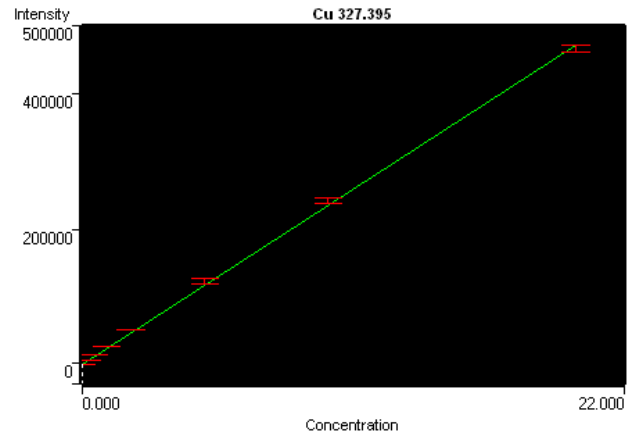


Рисунок 28 – Зависимость
аналитического сигнала Cu от
концентрации стандартных растворов

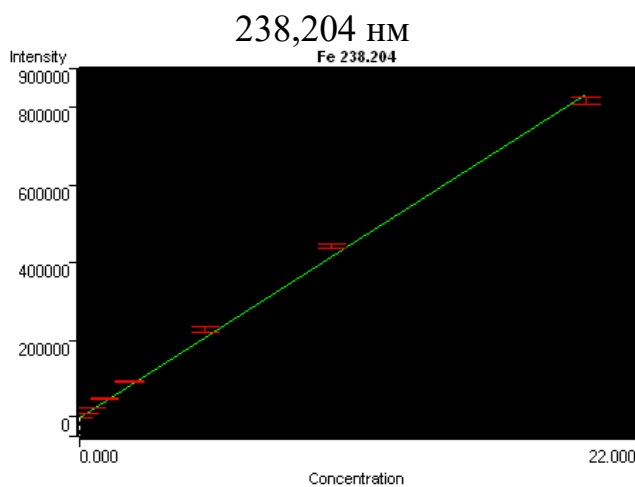


Рисунок 29 – Зависимость
аналитического сигнала Fe от
концентрации стандартных растворов

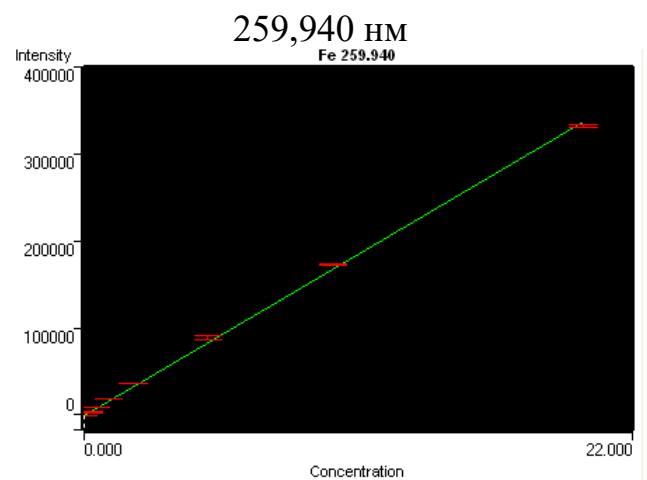


Рисунок 30 – Зависимость
аналитического сигнала Fe от
концентрации стандартных растворов

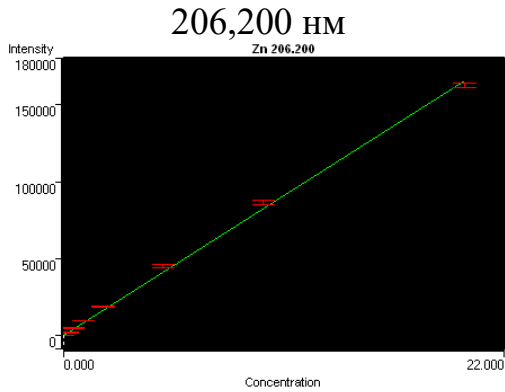


Рисунок 31 – Зависимость аналитического сигнала Zn от концентрации стандартных растворов

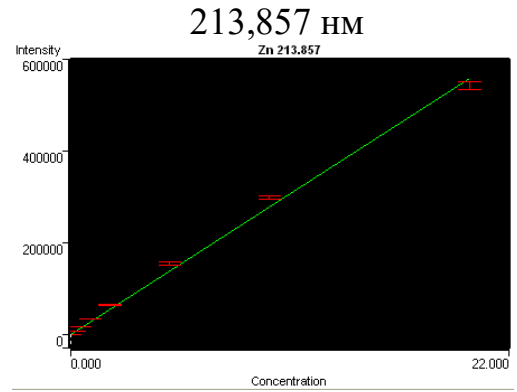


Рисунок 32 – Зависимость аналитического сигнала Zn от концентрации стандартных растворов

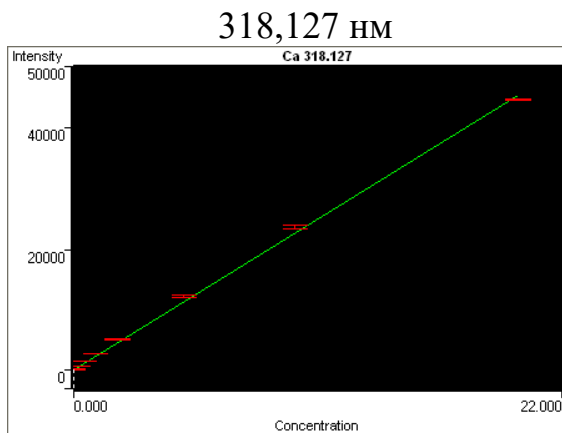


Рисунок 33 – Зависимость аналитического сигнала Ca от концентрации стандартных растворов

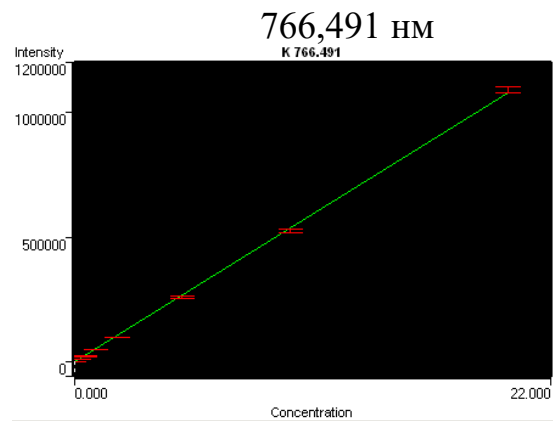


Рисунок 34 – Зависимость аналитического сигнала K от концентрации стандартных растворов

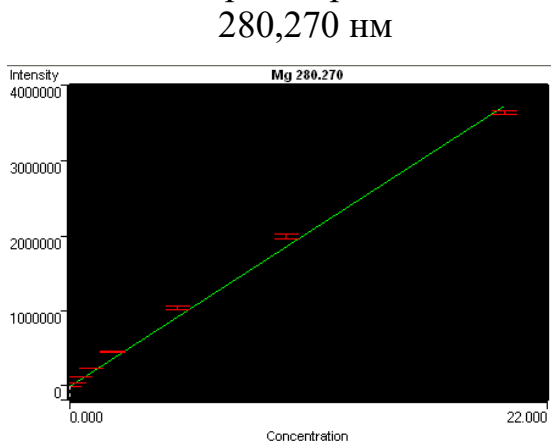


Рисунок 35 – Зависимость аналитического сигнала Mg от концентрации стандартных растворов

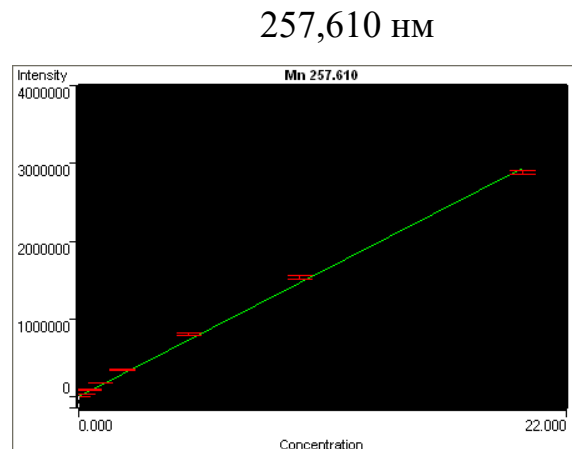


Рисунок 36 – Зависимость аналитического сигнала Mn от концентрации стандартных растворов

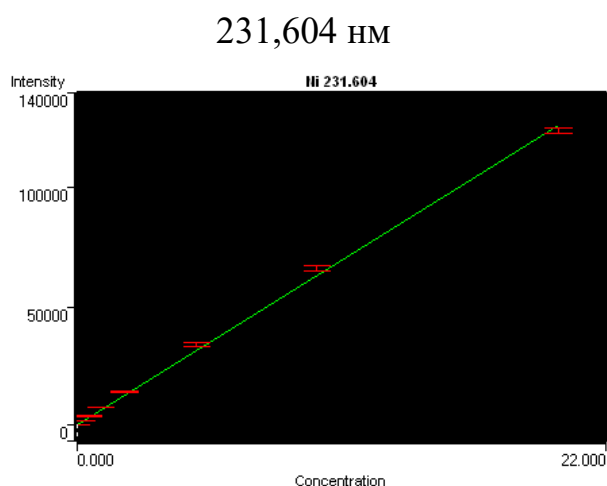


Рисунок 37 – Зависимость аналитического сигнала Ni от концентрации стандартных растворов

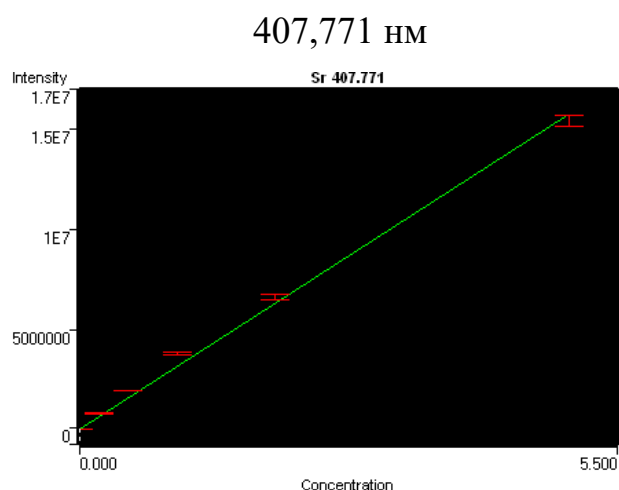


Рисунок 38 – Зависимость аналитического сигнала Sr от концентрации стандартных растворов

На основании полученных данных был рассчитан коэффициент корреляции (r) (Таблица 16).

Таблица 16 – Коэффициенты корреляции (r) (данные автора [53])

| Элемент | Длина волны, нм | r |
|---------|-----------------|--------|
| Al | 308,215 | 0,9995 |
| | 396,152 | 0,9995 |
| Ba | 233,527 | 0,9990 |
| | 455,403 | 0,9980 |
| Ca | 318,127 | 0,9995 |
| Co | 228,615 | 0,9990 |
| | 238,892 | 0,9995 |
| Cr | 205,560 | 0,9995 |
| | 267,716 | 0,9990 |
| | 283,563 | 0,9990 |
| Cu | 324,754 | 0,9995 |
| | 327,395 | 0,9995 |
| Fe | 238,204 | 0,9990 |
| | 259,940 | 0,9995 |
| K | 766,491 | 0,9995 |
| Mg | 280,270 | 0,9985 |
| Mn | 257,610 | 0,9990 |
| Ni | 231,604 | 0,9990 |
| Sr | 407,771 | 0,9990 |
| Zn | 206,200 | 0,9990 |
| | 213,857 | 0,9985 |

Из данных таблицы видно, что значение коэффициентов корреляции для линейной зависимости составляет более 0,995, что подтверждает линейность количественного определения металлов в испытуемом растворе до 20 мкг/мл включительно (для всех элементов кроме Sr). Для стронция вследствие высокой чувствительности определения на длине волны эмиссии 407,771 линейная зависимость между величиной аналитического сигнала сохраняется только до концентрации Sr в испытуемом растворе равной 5 мкг/мл.

Оценку правильности разрабатываемой методики выполняли методом добавок, посредством прибавления известных количеств элементов к испытуемому раствору, полученному кислотным разложением плодов шиповника в условиях МВ-нагрева (см. раздел 3.1). Проводили по три параллельных определения для каждой добавки (9 измерений, 3 концентрации внутри определяемого диапазона).

Показатель правильности оценивали путем расчета открываемости, то есть как соотношение между введенным и найденным содержанием элементов, выраженных в мкг/мл.

В качестве испытуемых растворов использовали три разложения плодов шиповника, которые переносили из тефлоновых сосудов соответственно в три мерные колбы объемом 100 мл, прибавляли 20 мл воды, перемешивали, прибавляли точное количество раствора добавки. Объем раствора доводили до метки водой, перемешивали.

Результаты определения правильности разрабатываемой методики количественного определения элементов, а также статистические характеристики представлены в Таблицах 17–29.

Таблица 17 – Правильность определения Al

| <i>Длина волны, нм</i> | <i>Введено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Найдено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Открываемость, %</i> |
|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|-------------------------|
| 308,215 | 0,5 | 4304,456 | 0,55 | 3930,951 | 91,3 |
| | 0,5 | 4351,392 | 0,55 | 3930,951 | 90,3 |
| | 0,5 | 4370,897 | 0,55 | 3882,068 | 88,8 |
| | 1,18 | 8066,728 | 1,08 | 7359,314 | 91,2 |
| | 1,18 | 7892,167 | 1,08 | 7368,459 | 93,4 |
| | 1,18 | 8005,764 | 1,08 | 7362,558 | 92,0 |

Продолжение таблицы 17

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|--|-----------------|-----------|-----------------|---|---|
| | 2,21 | 14270,907 | 2,10 | 13839,133 | 97,0 |
| | 2,21 | 14915,091 | 2,10 | 13978,734 | 93,7 |
| | 2,21 | 14704,196 | 2,10 | 14057,744 | 95,6 |
| 396,152 | 0,61 | 11111,660 | 0,56 | 9909,393 | 89,2 |
| | 0,61 | 11124,792 | 0,56 | 9789,324 | 88,0 |
| | 0,61 | 11115,200 | 0,56 | 9714,646 | 87,4 |
| | 1,18 | 21509,498 | 1,07 | 19424,533 | 90,3 |
| | 1,18 | 21213,416 | 1,07 | 19442,676 | 91,7 |
| | 1,18 | 21658,318 | 1,07 | 19344,090 | 89,3 |
| | 2,21 | 39156,242 | 2,08 | 37423,488 | 95,6 |
| | 2,21 | 41013,953 | 2,08 | 37706,680 | 91,9 |
| | 2,21 | 40020,508 | 2,08 | 37821,301 | 94,5 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты ($\lambda=308,215$ нм)</i> | <i>Результаты ($\lambda=396,152$ нм)</i> |
| Наименьшее значение, % | | | | 88,8 | 87,4 |
| Наибольшее значение, % | | | | 97,0 | 95,6 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 92,9 | 91,5 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 2,60 | 2,81 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 0,87 | 0,94 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 2,80 | 3,07 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 2,00 | 2,16 |

Таблица 18 – Правильность определения Ва

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|
| 233,527 | 0,60 | 25626,566 | 0,56 | 24625,912 | 96,1 |
| | 0,60 | 25764,264 | 0,56 | 24199,617 | 93,9 |
| | 0,60 | 25973,041 | 0,56 | 24425,795 | 94,0 |
| | 1,17 | 51426,816 | 1,14 | 49358,508 | 96,0 |
| | 1,17 | 50302,090 | 1,14 | 49718,270 | 98,8 |
| | 1,17 | 50667,766 | 1,14 | 49104,105 | 96,9 |
| | 2,21 | 93130,883 | 2,23 | 95926,633 | 103,0 |
| | 2,21 | 97566,164 | 2,23 | 96174,602 | 98,6 |
| | 2,21 | 95736,383 | 2,23 | 97410,992 | 101,8 |
| 455,403 | 0,67 | 545671,938 | 0,63 | 520075,469 | 95,3 |
| | 0,67 | 548501,813 | 0,63 | 512681,094 | 93,5 |
| | 0,67 | 549225,500 | 0,63 | 515956,938 | 93,9 |
| | 1,31 | 1080580,750 | 1,26 | 1036300,750 | 95,9 |
| | 1,31 | 1066342,000 | 1,26 | 1031339,563 | 96,7 |
| | 1,31 | 1073170,250 | 1,26 | 1029282,125 | 95,9 |

Продолжение таблицы 18

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|--|-----------------|-------------|-----------------|---|---|
| | 2,44 | 1961541,750 | 2,47 | 2016071,000 | 102,8 |
| | 2,44 | 2036727,125 | 2,47 | 2022835,500 | 99,3 |
| | 2,44 | 1997684,250 | 2,47 | 2032540,375 | 101,7 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты ($\lambda=233,527$ нм)</i> | <i>Результаты ($\lambda=455,403$ нм)</i> |
| Наименьшее значение, % | | | | 93,9 | 93,5 |
| Наибольшее значение, % | | | | 103,0 | 102,8 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 98,5 | 98,2 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 3,19 | 3,31 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 1,06 | 1,10 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 3,24 | 3,37 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 2,46 | 2,55 |

Таблица 19 – Правильность определения Са

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|--|-----------------|----------|-----------------|---|------------------|
| 318,127 | 0,60 | 1579,743 | 0,60 | 1614,903 | 102,2 |
| | 0,60 | 1597,442 | 0,60 | 1585,925 | 99,3 |
| | 0,60 | 1622,528 | 0,60 | 1573,454 | 97,0 |
| | 1,19 | 2909,390 | 1,25 | 3041,685 | 104,6 |
| | 1,19 | 2895,414 | 1,25 | 3013,284 | 104,1 |
| | 1,19 | 2937,218 | 1,25 | 3068,521 | 104,5 |
| | 2,17 | 5195,128 | 2,25 | 5286,908 | 101,8 |
| | 2,17 | 5247,302 | 2,25 | 5310,543 | 101,2 |
| | 2,17 | 5118,612 | 2,25 | 5304,489 | 103,6 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты ($\lambda=318,127$ нм)</i> | |
| Наименьшее значение, % | | | | 97,0 | |
| Наибольшее значение, % | | | | 104,6 | |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 100,8 | |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 2,57 | |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 0,86 | |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 2,55 | |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 1,98 | |

Таблица 20 – Правильность определения Со

| <i>Длина волны, нм</i> | <i>Введено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Найдено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Открываемость, %</i> |
|--|------------------------|---------------|---|---|-------------------------|
| 228,615 | 0,59 | 4109,151 | 0,56 | 4006,332 | 97,5 |
| | 0,59 | 4119,323 | 0,56 | 3890,888 | 94,5 |
| | 0,59 | 4111,150 | 0,56 | 3925,521 | 95,5 |
| | 1,17 | 8168,824 | 1,14 | 7865,607 | 96,3 |
| | 1,17 | 8039,432 | 1,14 | 7921,192 | 98,5 |
| | 1,17 | 8044,016 | 1,14 | 7952,972 | 98,9 |
| | 2,20 | 15400,000 | 2,24 | 15360,951 | 99,8 |
| | 2,20 | 15569,841 | 2,24 | 15465,606 | 99,3 |
| | 2,20 | 15301,148 | 2,24 | 15616,646 | 102,1 |
| 238,892 | 0,59 | 11592,584 | 0,56 | 11142,271 | 96,1 |
| | 0,59 | 11593,251 | 0,56 | 10896,432 | 94,0 |
| | 0,59 | 11691,168 | 0,56 | 10993,782 | 94,0 |
| | 1,16 | 23153,719 | 1,13 | 22525,130 | 97,3 |
| | 1,16 | 22474,814 | 1,13 | 22780,781 | 101,4 |
| | 1,16 | 22916,025 | 1,13 | 22148,359 | 96,7 |
| | 2,18 | 41526,285 | 2,23 | 43308,441 | 104,3 |
| | 2,18 | 42894,541 | 2,23 | 43710,992 | 101,9 |
| | 2,18 | 42960,227 | 2,23 | 43914,848 | 102,2 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | <i>Результаты</i> <i>($\lambda=228,615$ нм)</i> | <i>Результаты</i> <i>($\lambda=238,892$ нм)</i> | |
| Наименьшее значение, % | | | 94,5 | 94,0 | |
| Наибольшее значение, % | | | 102,1 | 102,2 | |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | 98,3 | 98,1 | |
| Стандартное отклонение (s) | | | 2,36 | 3,84 | |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{x}}$) | | | 0,79 | 1,28 | |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{x}\%}$), % | | | 2,40 | 3,91 | |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | 1,82 | 2,96 | |

Таблица 21 – Правильность определения Cr

| <i>Длина волны, нм</i> | <i>Введено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Найдено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Открываемость, %</i> |
|--|------------------------|---------------|------------------------|---|---|
| 267,716 | 0,59 | 17339,035 | 0,56 | 16793,754 | 96,9 |
| | 0,59 | 17402,600 | 0,56 | 16584,520 | 95,3 |
| | 0,59 | 17347,449 | 0,56 | 16658,570 | 96,0 |
| | 1,16 | 34585,137 | 1,14 | 33769,398 | 97,6 |
| | 1,16 | 34026,676 | 1,14 | 33684,945 | 99,0 |
| | 1,16 | 34270,836 | 1,14 | 33531,188 | 97,8 |
| | 2,19 | 63258,844 | 2,27 | 66292,813 | 104,8 |
| | 2,19 | 64231,005 | 2,27 | 67204,930 | 104,6 |
| | 2,19 | 64699,586 | 2,27 | 67412,102 | 104,2 |
| 283,563 | 0,59 | 22979,557 | 0,57 | 22235,119 | 96,8 |
| | 0,59 | 22931,453 | 0,57 | 21777,162 | 95,0 |
| | 0,59 | 23104,682 | 0,57 | 22269,178 | 96,4 |
| | 1,17 | 45856,906 | 1,14 | 44250,145 | 96,5 |
| | 1,17 | 44958,203 | 1,14 | 44471,496 | 98,9 |
| | 1,17 | 45252,645 | 1,14 | 44413,496 | 98,2 |
| | 2,23 | 85369,172 | 2,23 | 86681,484 | 101,5 |
| | 2,23 | 87872,383 | 2,23 | 85769,609 | 97,6 |
| | 2,23 | 86522,742 | 2,23 | 87530,000 | 101,2 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты ($\lambda=267,716$ нм)</i> | <i>Результаты ($\lambda=283,563$ нм)</i> |
| Наименьшее значение, % | | | | 95,3 | 95,0 |
| Наибольшее значение, % | | | | 104,8 | 101,5 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 100,1 | 98,3 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 3,87 | 2,20 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 1,29 | 0,73 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 3,87 | 2,24 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 2,98 | 1,69 |

Таблица 22 – Правильность определения Си

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|--|-----------------|-----------|-----------------|--|--|
| 324,754 | 0,59 | 10581,256 | 0,56 | 9987,499 | 94,4 |
| | 0,59 | 10671,047 | 0,56 | 10050,275 | 94,2 |
| | 0,59 | 10648,223 | 0,56 | 10044,038 | 94,3 |
| | 1,16 | 20899,010 | 1,13 | 20070,074 | 96,0 |
| | 1,16 | 20479,719 | 1,13 | 20225,135 | 98,8 |
| | 1,16 | 20773,559 | 1,13 | 20061,729 | 96,6 |
| | 2,17 | 38254,129 | 2,23 | 39243,695 | 102,6 |
| | 2,17 | 39532,848 | 2,23 | 39563,281 | 100,1 |
| | 2,17 | 38447,762 | 2,23 | 39901,578 | 103,8 |
| 327,395 | 0,59 | 13765,924 | 0,55 | 13064,613 | 95,0 |
| | 0,59 | 13866,115 | 0,55 | 12979,480 | 93,6 |
| | 0,59 | 13880,721 | 0,55 | 12930,746 | 93,2 |
| | 1,14 | 27077,371 | 1,12 | 26260,439 | 97,0 |
| | 1,14 | 26575,854 | 1,12 | 26230,707 | 98,7 |
| | 1,14 | 27095,896 | 1,12 | 26176,805 | 96,6 |
| | 2,13 | 49596,147 | 2,21 | 51406,293 | 103,7 |
| | 2,13 | 51270,117 | 2,21 | 51820,113 | 101,1 |
| | 2,13 | 50238,758 | 2,21 | 52278,000 | 104,1 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты</i> ($\lambda=324,754$ нм) | <i>Результаты</i> ($\lambda=327,395$ нм) |
| Наименьшее значение, % | | | | 94,2 | 93,2 |
| Наибольшее значение, % | | | | 103,8 | 104,1 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 99,0 | 98,7 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 3,65 | 4,09 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 1,22 | 1,36 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 3,69 | 4,14 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 2,81 | 3,15 |

Таблица 23 – Правильность определения Fe

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|--|-----------------|-----------|-----------------|--|--|
| 238,204 | 0,60 | 25175,504 | 0,57 | 23750,459 | 94,3 |
| | 0,60 | 25166,754 | 0,57 | 23167,420 | 92,1 |
| | 0,60 | 25242,342 | 0,57 | 23526,149 | 93,2 |
| | 1,18 | 50004,195 | 1,12 | 46581,523 | 93,2 |
| | 1,18 | 48813,000 | 1,12 | 46955,609 | 96,2 |
| | 1,18 | 49250,184 | 1,12 | 46649,910 | 94,7 |
| | 2,25 | 95092,664 | 2,17 | 89642,648 | 94,3 |
| | 2,25 | 95579,102 | 2,17 | 89901,680 | 94,1 |
| | 2,25 | 95702,906 | 2,17 | 92331,609 | 96,5 |
| 259,940 | 0,59 | 9974,419 | 0,56 | 9456,097 | 94,5 |
| | 0,59 | 10006,396 | 0,56 | 9290,150 | 92,8 |
| | 0,59 | 9932,780 | 0,56 | 9365,127 | 94,3 |
| | 1,16 | 19695,863 | 1,11 | 18481,047 | 93,8 |
| | 1,16 | 19194,719 | 1,11 | 18772,536 | 97,8 |
| | 1,16 | 19532,480 | 1,11 | 18602,381 | 95,2 |
| | 2,18 | 36742,234 | 2,19 | 36192,953 | 98,5 |
| | 2,18 | 37269,238 | 2,19 | 37678,891 | 101,1 |
| | 2,18 | 36697,992 | 2,19 | 36725,543 | 100,1 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты</i> ($\lambda=238,204$ нм) | <i>Результаты</i> ($\lambda=259,940$ нм) |
| Наименьшее значение, % | | | | 92,1 | 92,8 |
| Наибольшее значение, % | | | | 96,5 | 101,1 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 94,3 | 97,0 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 1,41 | 2,99 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 0,47 | 1,00 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 1,50 | 3,08 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 1,09 | 2,30 |

Таблица 24 – Правильность определения К

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------|
| 766,491 | 0,42 | 22614,434 | 0,40 | 21464,102 | 94,9 |
| | 0,42 | 22743,379 | 0,40 | 21293,215 | 93,6 |
| | 0,42 | 22670,047 | 0,40 | 21503,055 | 94,9 |
| | 0,88 | 47495,766 | 0,93 | 50147,543 | 105,6 |
| | 0,88 | 46742,555 | 0,93 | 50983,672 | 109,1 |
| | 0,88 | 47797,172 | 0,93 | 50232,055 | 106,7 |
| | 1,77 | 94509,906 | 1,61 | 86620,203 | 91,7 |
| | 1,77 | 98545,344 | 1,61 | 87301,375 | 88,6 |
| | 1,77 | 94870,844 | 1,61 | 86983,141 | 91,7 |

Продолжение таблицы 24

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты ($\lambda=766,491$ нм)</i> |
|--|---|
| Наименьшее значение, % | 88,6 |
| Наибольшее значение, % | 109,1 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | 98,9 |
| Стандартное отклонение (s) | 7,58 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | 2,53 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | 7,66 |
| Доверительный интервал (ΔX , $P=0,95$) | 5,84 |

Таблица 25 – Правильность определения Mg

| <i>Длина волны, нм</i> | <i>Введено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Найдено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Открываемость, %</i> |
|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|-------------------------|
| 280,270 | 0,65 | 122102,406 | 0,63 | 118712,125 | 97,2 |
| | 0,65 | 119229,938 | 0,63 | 117182,328 | 98,3 |
| | 0,65 | 121564,680 | 0,63 | 114919,555 | 94,5 |
| | 1,29 | 246440,563 | 1,27 | 239859,984 | 97,3 |
| | 1,29 | 242923,063 | 1,27 | 239655,313 | 98,7 |
| | 1,29 | 239852,313 | 1,27 | 240236,047 | 100,2 |
| | 2,44 | 458153,344 | 2,43 | 450895,406 | 98,4 |
| | 2,44 | 464584,063 | 2,43 | 448773,656 | 96,6 |
| | 2,44 | 460758,625 | 2,43 | 458668,531 | 99,6 |

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты ($\lambda=280,270$ нм)</i> |
|--|---|
| Наименьшее значение, % | 94,5 |
| Наибольшее значение, % | 100,2 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | 97,4 |
| Стандартное отклонение (s) | 1,71 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | 0,57 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | 1,76 |
| Доверительный интервал (ΔX , $P=0,95$) | 1,32 |

Таблица 26 – Правильность определения Mn

| <i>Длина волны, нм</i> | <i>Введено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Найдено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Открываемость, %</i> |
|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|-------------------------|
| 257,610 | 0,63 | 92892,313 | 0,60 | 89089,203 | 95,9 |
| | 0,63 | 90415,352 | 0,60 | 88321,703 | 97,7 |
| | 0,63 | 92892,789 | 0,60 | 86815,500 | 93,5 |
| | 1,24 | 176049,719 | 1,21 | 179500,250 | 102,0 |

Продолжение таблицы 26

| | | | | | |
|--|------|------------|------|---|-------|
| | 1,24 | 178676,516 | 1,21 | 180475,203 | 101,0 |
| | 1,24 | 181409,453 | 1,21 | 179064,438 | 98,7 |
| | 2,35 | 341787,906 | 2,35 | 342316,375 | 100,2 |
| | 2,35 | 352513,688 | 2,35 | 340903,094 | 96,7 |
| | 2,35 | 348400,688 | 2,35 | 351065,063 | 100,8 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты ($\lambda=257,610$ нм)</i> | |
| Наименьшее значение, % | | | | 93,5 | |
| Наибольшее значение, % | | | | 102,0 | |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 97,8 | |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 2,79 | |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 0,93 | |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 2,85 | |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 2,15 | |

Таблица 27 – Правильность определения Ni

| <i>Длина волны, нм</i> | <i>Введено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Найдено, мкг/мл</i> | <i>I, пкс</i> | <i>Открываемость, %</i> |
|--|------------------------|---------------|------------------------|---|-------------------------|
| 231,604 | 0,59 | 3800,129 | 0,57 | 3692,845 | 97,2 |
| | 0,59 | 3779,972 | 0,57 | 3567,182 | 94,4 |
| | 0,59 | 3779,496 | 0,57 | 3652,991 | 96,7 |
| | 1,16 | 7453,163 | 1,15 | 7196,945 | 96,6 |
| | 1,16 | 7297,331 | 1,15 | 7316,739 | 100,3 |
| | 1,16 | 7418,372 | 1,15 | 7292,484 | 98,3 |
| | 2,19 | 14210,420 | 2,25 | 14105,970 | 99,3 |
| | 2,19 | 14239,947 | 2,25 | 14292,356 | 100,4 |
| | 2,19 | 13926,286 | 2,25 | 14276,3232 | 102,5 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты ($\lambda=231,604$ нм)</i> | |
| Наименьшее значение, % | | | | 94,4 | |
| Наибольшее значение, % | | | | 102,5 | |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 98,5 | |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 2,47 | |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 0,82 | |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 2,51 | |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 1,90 | |

Таблица 28 – Правильность определения Sr

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|
| 407,771 | 0,61 | 1901077,000 | 0,58 | 1822212,750 | 95,9 |
| | 0,61 | 1907350,250 | 0,58 | 1791695,750 | 93,9 |
| | 0,61 | 1915515,375 | 0,58 | 1806199,500 | 94,3 |
| | 1,19 | 3769148,500 | 1,15 | 3618435,000 | 96,0 |
| | 1,19 | 3677447,750 | 1,15 | 3618778,250 | 98,4 |
| | 1,19 | 3728478,750 | 1,15 | 3606569,750 | 96,7 |
| | 2,06 | 6367231,500 | 2,11 | 6614768,500 | 103,9 |
| | 2,06 | 6582641,500 | 2,11 | 6612491,000 | 100,5 |
| | 2,06 | 6496896,000 | 2,11 | 6619754,500 | 101,9 |

| Статистические характеристики | Результаты ($\lambda=407,771$ нм) |
|--|------------------------------------|
| Наименьшее значение, % | 93,9 |
| Наибольшее значение, % | 103,9 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | 98,9 |
| Стандартное отклонение (s) | 3,48 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{0}}$) | 1,16 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 3,52 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | 2,68 |

Таблица 29 – Правильность определения Zn

| Длина волны, нм | Введено, мкг/мл | I, пкс | Найдено, мкг/мл | I, пкс | Открываемость, % |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------|
| 206,200 | 0,60 | 5010,771 | 0,57 | 4806,874 | 95,9 |
| | 0,60 | 4931,625 | 0,57 | 4710,625 | 95,5 |
| | 0,60 | 4937,005 | 0,57 | 4757,593 | 96,4 |
| | 1,17 | 9794,531 | 1,16 | 9585,305 | 97,9 |
| | 1,17 | 9535,774 | 1,16 | 9631,065 | 101,0 |
| | 1,17 | 9729,481 | 1,16 | 9685,088 | 99,5 |
| | 2,22 | 17970,670 | 2,26 | 18509,018 | 103,0 |
| | 2,22 | 18686,791 | 2,26 | 18726,430 | 100,2 |
| | 2,22 | 18448,836 | 2,26 | 18892,777 | 102,4 |
| 213,857 | 0,62 | 17238,219 | 0,56 | 15894,688 | 92,2 |
| | 0,62 | 17214,229 | 0,56 | 15522,598 | 90,2 |
| | 0,62 | 17367,197 | 0,56 | 15617,593 | 89,9 |
| | 1,22 | 34534,328 | 1,15 | 31809,777 | 92,1 |
| | 1,22 | 33523,238 | 1,15 | 32008,857 | 95,5 |
| | 1,22 | 33985,234 | 1,15 | 31833,916 | 93,7 |
| | 2,25 | 65247,223 | 2,26 | 62278,094 | 95,5 |
| | 2,25 | 65257,039 | 2,26 | 62783,746 | 96,2 |
| | 2,25 | 64001,914 | 2,26 | 63235,059 | 98,8 |

Продолжение таблицы 29

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты ($\lambda=206,200$ нм)</i> | <i>Результаты ($\lambda=213,857$ нм)</i> |
|--|---|---|
| Наименьшее значение, % | 95,5 | 89,9 |
| Наибольшее значение, % | 103,0 | 98,8 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | 99,3 | 94,4 |
| Стандартное отклонение (s) | 2,81 | 2,96 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | 0,94 | 0,99 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | 2,83 | 3,14 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | 2,16 | 2,28 |

Установлено, что открываемость для всех изученных элементов с учетом уровня их содержаний в среднем выше 90 %. Правильность количественного определения элементов для средней величины каждого из трех определений в среднем находится в диапазоне от 92,0 до 105,0 %.

Дополнительно в Таблице 30 приведены коэффициенты вариации для каждого элемента и для каждой добавки, вычисленные исходя из трехкратного введения в плазму ($n = 3$) по калибровочному графику.

Таблица 30 – Коэффициенты вариации ($n = 3$)

| <i>Элемент</i> | <i>Длина волны, нм</i> | <i>Концентрация, определенная по калибровочному графику, мкг/мл</i> | <i>Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$, %)</i> |
|----------------|----------------------------|---|--|
| Al | 308,215 | 0,55 | 0,63 |
| | | 1,08 | 1,08 |
| | | 2,10 | 0,79 |
| | 396,152 | 0,54 | 1,00 |
| | | 1,07 | 0,27 |
| | | 2,08 | 0,54 |
| Ba | 233,527 | 0,56 | 0,87 |
| | | 1,14 | 0,62 |
| | | 2,23 | 0,82 |
| | 455,403 | 0,63 | 0,72 |
| | | 1,26 | 0,35 |
| | | 2,47 | 0,41 |
| Ca | 318,127 | 0,60 | 1,34 |
| | | 1,25 | 0,94 |
| | | 2,25 | 0,23 |

Продолжение таблицы 30

| <i>Элемент</i> | <i>Длина волны, нм</i> | <i>Концентрация, определенная по калибровочному графику, мкг/мл</i> | <i>Коэффициент вариации ($s_{\bar{d}}$, %)</i> |
|----------------|----------------------------|---|---|
| Co | 228,615 | 0,56 | 1,50 |
| | | 1,14 | 0,56 |
| | | 2,24 | 0,83 |
| | 238,892 | 0,56 | 1,12 |
| | | 1,13 | 1,41 |
| | | 2,23 | 0,71 |
| Cr | 267,716 | 0,56 | 0,64 |
| | | 1,14 | 0,36 |
| | | 2,27 | 0,89 |
| | 283,563 | 0,57 | 1,24 |
| | | 1,14 | 0,26 |
| | | 2,23 | 1,02 |
| Cu | 324,754 | 0,56 | 0,35 |
| | | 1,13 | 0,46 |
| | | 2,23 | 0,83 |
| | 327,395 | 0,55 | 0,52 |
| | | 1,12 | 0,16 |
| | | 2,21 | 0,84 |
| Fe | 238,204 | 0,57 | 1,25 |
| | | 1,12 | 0,43 |
| | | 2,17 | 1,64 |
| | 259,940 | 0,56 | 0,89 |
| | | 1,11 | 0,79 |
| | | 2,19 | 2,04 |
| K | 766,491 | 0,36 | 0,58 |
| | | 0,95 | 0,90 |
| | | 1,61 | 0,39 |
| Mg | 280,270 | 0,63 | 1,63 |
| | | 1,27 | 0,12 |
| | | 2,43 | 1,15 |
| Mn | 257,610 | 0,60 | 1,31 |
| | | 1,21 | 0,40 |
| | | 2,35 | 1,60 |
| Ni | 231,604 | 0,57 | 1,77 |
| | | 1,15 | 0,87 |
| | | 2,25 | 0,73 |
| Sr | 407,771 | 0,58 | 0,85 |
| | | 1,15 | 0,19 |
| | | 2,11 | 0,06 |
| Zn | 206,200 | 0,57 | 1,01 |
| | | 1,16 | 0,52 |
| | | 2,26 | 1,03 |
| | 213,857 | 0,56 | 1,23 |
| | | 1,15 | 0,34 |
| | | 2,26 | 0,76 |

Данные, представленные в Таблице 30, демонстрируют, что $S_{\bar{0},\%}$ для всех элементов на выбранных длинах волн при трехкратном введении испытуемого раствора не превышает 2,1 %. Наибольшее значение коэффициента вариации (2,04 %) отмечено для железа на длине волны 259,940 нм при концентрации 2,19 мкг/мл. Наименьшее значение $S_{\bar{0},\%}$ (0,06 %) отмечено для стронция на длине волны 407,771 нм при концентрации 2,11 мкг/мл. При исследовании повторяемости в испытуемые растворы были введены добавки элементов (так как содержание металлов в плодах шиповника находится ниже предела обнаружения) таким образом, чтобы их концентрации в испытуемом растворе составляли 2 мкг/мл. Результаты приведены в Таблице 31. Данные, приведенные в Таблице 31, показывают, что коэффициент вариации при определении элементов на микрограммовом уровне в испытуемых растворах методом АЭС-ИСП не превышает 2 % (относительная погрешность не превышает 3,0 %).

Таким образом, анализ данных, полученных в процессе разработки методики одновременного количественного определения элементов на макроуровнях содержаний, в частности Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Sr, Zn, применима в интервале от 0,2 до 20 мкг/мл аналитов в испытуемом растворе. Адекватность и унифицированность разработанной методики была подтверждена анализом субстанций растительного происхождения. Данные приведены в Таблице 32.

Наибольшее содержание алюминия отмечено в корнях и корневищах кровохлебки лекарственной (0,96 мг/г), корнях лопуха (0,64 мг/г), листьях ортосифона тычиночного (1,81 мг/г), бария – в коре дуба (0,22 мг/г), кальция – в листьях подорожника большого (39,1 мг/г), листьях мать-и-мачехи обыкновенной (30,4 мг/г), железа – в корнях и корневищах кровохлебки лекарственной (1,06 мг/г), в листьях ортосифона тычиночного (1,04 мг/г), калия – в траве фиалки (23,0 мг/г), траве чистотела большого (21,5 мг/г), слоевищах ламинарии (49,4 мг/г), магния – в корнях алтея (5,52 мг/г), листьях мать-и-мачехи обыкновенной (5,89 мг/г), слоевищах ламинарии (6,20 мг/г), марганца – в листьях березы (1,35 мг/г), листьях брусники обыкновенной (1,17 мг/г), траве зимолюбки (0,73 мг/г), стронция – в листьях подорожника большого (0,42 мг/г), слоевищах ламинарии – (0,40 мг/г), цинка – в цветках бессмертника песчаного (0,30 мг/г). Хрома, меди, никеля в

Таблица 31 – Воспроизводимость определения элементов в растворах, полученных после разложения плодов шиповника с добавкой металлов 2 мкг/мл ($n = 6$, $P = 0,95$, s – стандартное отклонение, $s_{\bar{x},\%}$ – коэффициент вариации)

| Элемент | I, пкс | | s | | $s_{\bar{x},\%}$, % | |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | $\lambda = 308,215$ | $\lambda = 396,152$ | $\lambda = 308,215$ | $\lambda = 396,152$ | $\lambda = 308,215$ | $\lambda = 396,152$ |
| Al | 14068,755 | 38265,977 | 62,9 | 397,4 | 0,45 | 1,05 |
| | 13901,020 | 37169,422 | | | | |
| | 13925,437 | 37896,047 | | | | |
| | 13975,126 | 37691,246 | | | | |
| | 14028,914 | 38194,434 | | | | |
| | 14001,532 | 37853,680 | | | | |
| Среднее значение | 13983,464 | 37845,134 | | | | |
| Ba | $\lambda = 233,527$ | $\lambda = 455,403$ | $\lambda = 233,527$ | $\lambda = 455,403$ | $\lambda = 233,527$ | $\lambda = 455,403$ |
| | 98901,961 | 2067273,125 | 1125,9 | 26459,4 | 1,16 | 1,30 |
| | 95600,820 | 1996377,750 | | | | |
| | 96432,500 | 2050866,125 | | | | |
| | 96656,992 | 2011404,625 | | | | |
| | 97453,945 | 2043650,625 | | | | |
| 97316,469 | 2042469,375 | | | | | |
| Среднее значение | 97060,448 | 2035340,271 | | | | |

Продолжение таблицы 31

| Элемент | I, пкс | | s | | S ₀ , % | |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | $\lambda = 318,127$ | – | $\lambda = 318,127$ | – | $\lambda = 318,127$ | – |
| Ca | 5362,233 | – | 24,6 | – | 0,46 | – |
| | 5347,711 | | | | | |
| | 5341,845 | | | | | |
| | 5322,479 | | | | | |
| | 5384,358 | | | | | |
| | 5318,701 | | | | | |
| Среднее значение | 5346,221 | – | | | | |
| Co | $\lambda = 228,615$ | $\lambda = 238,892$ | $\lambda = 228,615$ | $\lambda = 238,892$ | $\lambda = 228,615$ | $\lambda = 238,892$ |
| | 15873,542 | 44520,469 | 302,7 | 838,6 | 1,94 | 1,92 |
| 15411,248 | 42884,227 | | | | | |
| | 15516,271 | 43626,398 | | | | |
| | 15404,785 | 43490,941 | | | | |
| | 15758,304 | 43824,672 | | | | |
| | 15648,007 | 43701,160 | | | | |
| Среднее значение | 15602,026 | 43674,645 | | | | |

Продолжение таблицы 31

| Элемент | I, пкс | | s | | $s_{\bar{\sigma},\%}, \%$ | |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | $\lambda = 267,716$ | $\lambda = 283,563$ | $\lambda = 267,716$ | $\lambda = 283,563$ | $\lambda = 267,716$ | $\lambda = 283,563$ |
| Cr | 68211,383 | 84326,982 | 751,6 | 1691,4 | 1,12 | 1,98 |
| | 66066,531 | 84694,375 | | | | |
| | 67022,188 | 83439,414 | | | | |
| | 66613,164 | 85211,362 | | | | |
| | 67615,625 | 87931,086 | | | | |
| | 67111,258 | 86937,547 | | | | |
| | Среднее значение | 67106,692 | | | | |
| Cu | $\lambda = 324,754$ | $\lambda = 327,395$ | $\lambda = 324,754$ | $\lambda = 327,395$ | $\lambda = 324,754$ | $\lambda = 327,395$ |
| | 40318,906 | 52992,484 | 472,8 | 818,5 | 1,19 | 1,57 |
| | 39009,797 | 51269,133 | | | | |
| | 39648,508 | 52292,551 | | | | |
| | 39425,895 | 51573,664 | | | | |
| | 40109,801 | 52449,000 | | | | |
| | 39859,848 | 52238,680 | | | | |
| Среднее значение | 39728,793 | 52135,919 | | | | |
| Fe | $\lambda = 238,204$ | $\lambda = 259,940$ | $\lambda = 238,204$ | $\lambda = 259,940$ | $\lambda = 238,204$ | $\lambda = 259,940$ |
| | 94275,734 | 37099,516 | 1566,0 | 419,9 | 1,71 | 1,15 |
| | 89898,984 | 35951,863 | | | | |
| | 91398,148 | 36254,680 | | | | |
| | 92014,961 | 36291,402 | | | | |
| | 91689,070 | 36738,918 | | | | |
| | 90187,633 | 36751,059 | | | | |
| Среднее значение | 91577,422 | 36514,573 | | | | |

Продолжение таблицы 31

| Элемент | I, пкс | | s | | S ₀ , % | |
|------------------|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|
| К | $\lambda = 766,491$ | — | $\lambda = 766,491$ | — | $\lambda = 766,491$ | — |
| | 89262,922 | — | 1087,4 | — | 1,24 | — |
| | 85988,125 | | | | | |
| | 87839,180 | | | | | |
| | 87525,359 | | | | | |
| | 88230,625 | | | | | |
| 87293,977 | — | — | — | — | — | |
| Среднее значение | 87690,031 | — | | | | |
| Mg | $\lambda = 280,270$ | — | $\lambda = 280,270$ | — | $\lambda = 280,270$ | — |
| | 473533,469 | — | 7908,4 | — | 1,72 | — |
| | 453534,469 | | | | | |
| | 455739,906 | | | | | |
| | 464009,500 | | | | | |
| | 459420,156 | | | | | |
| 452511,750 | — | — | — | — | — | |
| Среднее значение | 459791,542 | — | | | | |
| Mn | $\lambda = 257,610$ | — | $\lambda = 257,610$ | — | $\lambda = 257,610$ | — |
| | 359048,438 | — | 6035,6 | — | 1,72 | — |
| | 355750,156 | | | | | |
| | 342367,125 | | | | | |
| | 351729,906 | | | | | |
| | 349792,406 | | | | | |
| 346764,063 | — | — | — | — | — | |
| Среднее значение | 350908,682 | — | | | | |

Продолжение таблицы 31

| Элемент | I, пкс | | s | | S ₀ , % | | | | | |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|--|--|--|
| | λ | — | λ | — | λ | — | | | | |
| Ni | $\lambda = 231,604$ | — | $\lambda = 231,604$ | — | $\lambda = 231,604$ | — | | | | |
| | 14507,480 | | 186,5 | — | 1,31 | — | | | | |
| | 14018,895 | | | | | | | | | |
| | 14170,949 | — | | | | | | | | |
| | 14056,376 | | | | | | | | | |
| 14349,795 | | | | | | | | | | |
| 14299,154 | | | | | | | | | | |
| Среднее значение | 14233,775 | — | | | | | | | | |
| Sr | $\lambda = 407,771$ | — | $\lambda = 407,771$ | — | $\lambda = 407,771$ | — | | | | |
| | 6684665,500 | | 52487,5 | — | 0,79 | — | | | | |
| | 6595914,500 | | | | | | | | | |
| | 6707176,500 | — | | | | | | | | |
| | 6571304,000 | | | | | | | | | |
| | 6663577,500 | | | | | | | | | |
| 6641291,500 | | | | | | | | | | |
| Среднее значение | 6643988,250 | — | | | | | | | | |
| Zn | $\lambda = 206,200$ | $\lambda = 213,857$ | $\lambda = 206,200$ | $\lambda = 213,857$ | $\lambda = 206,200$ | $\lambda = 213,857$ | | | | |
| | 19070,057 | 64094,059 | 221,6 | 680,7 | 1,18 | 1,08 | | | | |
| | 18548,924 | 62148,531 | | | | | | | | |
| | 18521,439 | 62824,754 | | | | | | | | |
| | 18639,430 | 62575,129 | | | | | | | | |
| | 18919,350 | 63410,902 | | | | | | | | |
| | 18849,633 | 63146,832 | | | | | | | | |
| | Среднее значение | 18758,139 | | | | | 63033,368 | | | |

Таблица 32 – Результаты определения Al, Ba, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Sr, Zn, мг/г ([53,56,64] – данные получены автором)

| <i>Образец</i> | <i>Al</i> | <i>Ba</i> | <i>Ca</i> | <i>Fe</i> | <i>K</i> | <i>Mg</i> | <i>Mn</i> | <i>Sr</i> | <i>Zn</i> |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Трава душицы обыкновенной (<i>Origanum vulgare herba</i>) | 0,05±0,01 | 0,03±0,01 | 10,1±1,5 | 0,07±0,01 | 11,6±0,83 | 1,89±0,09 | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 | 0,03±0,01 |
| Трава горца птичьего (<i>Polygonum aviculare herba</i>) | 0,28±0,08 | 0,03±0,01 | 10,1±2,1 | 0,32±0,08 | 12,5±1,11 | 2,85±0,33 | 0,05±0,01 | 0,05±0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья сенны (<i>Senna folia</i>) | 0,31±0,06 | 0,04±0,01 | 26,6±1,2 | 0,30±0,04 | 9,27±0,92 | 3,80±0,69 | 0,05±0,01 | 0,18±0,04 | <0,01 |
| Кора дуба (<i>Quercus cortex</i>) | 0,07±0,01 | 0,22±0,05 | 27,3±2,4 | 0,07±0,01 | 2,16±0,16 | 1,17±0,13 | 0,69±0,18 | 0,13±0,04 | <0,01 |
| Трава золототысячника (<i>Centaurea herba</i>) | 0,32±0,04 | 0,03±0,01 | 6,41±1,02 | 0,31±0,07 | 10,0±1,02 | 2,04±0,54 | 0,04±0,01 | 0,02±0,01 | 0,04±0,01 |
| Корни и корневища кровохлебки лекарственной (<i>Sanguisorba officinalis</i>) | 0,96±0,12 | 0,10±0,02 | 18,0±1,2 | 1,06±0,13 | 2,94±0,41 | 2,34±0,12 | 0,06±0,01 | 0,08±0,02 | 0,02±0,01 |
| Цветки липы (<i>Tiliae flores</i>) | 0,11±0,02 | 0,04±0,01 | 14,6±0,1 | 0,13±0,01 | 10,6±0,1 | 2,80±0,20 | 0,13±0,01 | 0,07±0,01 | 0,02±0,01 |

Продолжение таблицы 32

| Образец | Al | Ba | Ca | Fe | K | Mg | Mn | Sr | Zn |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaci officinalis radices</i>) | 0,29±0,07 | 0,05±0,01 | 3,69±0,83 | 0,13±0,03 | 7,53±1,00 | 1,49±0,16 | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginis majoris folia</i>) | 0,60±0,06 | 0,05±0,01 | 39,1±2,0 | 0,80±0,10 | 18,3±0,3 | 6,54±0,02 | 0,05±0,01 | 0,42±0,01 | 0,04±0,01 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | 0,09±0,02 | 0,02±0,01 | 11,1±1,8 | 0,12±0,02 | 7,44±0,05 | 5,52±0,15 | 0,02±0,01 | 0,19±0,05 | 0,03±0,01 |
| Трава фиалки (<i>Violae herba</i>) | 0,30±0,05 | 0,10±0,07 | 9,44±0,05 | 0,29±0,09 | 23,0±0,13 | 3,11±0,19 | 0,12±0,03 | 0,04±0,01 | 0,05±0,01 |
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimi semina</i>) | 0,08±0,01 | 0,05±0,02 | 3,40±0,50 | 0,06±0,01 | 5,30±0,01 | 4,13±0,06 | 0,06±0,01 | 0,02±0,01 | 0,05±0,01 |
| Корни лопуха (<i>Arctii radices</i>) | 0,64±0,09 | 0,02±0,01 | 4,39±0,35 | 0,60±0,12 | 7,66±1,50 | 4,83±0,50 | 0,05±0,01 | 0,03±0,01 | 0,02±0,01 |
| Плоды шиповника (<i>Rosae fructus</i>) | 0,48±0,35 | 0,03±0,01 | 11,2±3,5 | 0,39±0,20 | 8,55±0,70 | 3,40±2,12 | 0,06±0,02 | 0,05±0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья шалфея лекарственного (<i>Salviae officinalis folia</i>) | 0,38±0,20 | 0,05±0,01 | 15,1±5,4 | 0,32±0,15 | 10,1±2,2 | 3,45±2,52 | 0,05±0,02 | 0,06±0,01 | 0,02±0,01 |
| Трава пустырника (<i>Leonuri herba</i>) | 0,06±0,02 | 0,05±0,09 | 10,2±3,5 | 0,09±0,02 | 9,36±2,51 | 1,93±1,52 | 0,04±0,01 | 0,05±0,02 | 0,02±0,01 |

Продолжение таблицы 32

| Образец | Al | Ba | Ca | Fe | K | Mg | Mn | Sr | Zn |
|--|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| Цветки ромашки аптечной (<i>Chamomillae recutita flores</i>) | 0,34±0,25 | 0,02±0,01 | 12,1±2,1 | 0,68±0,25 | 16,5±1,13 | 2,49±0,25 | 0,08±0,02 | 0,04±0,01 | 0,04,2±0,01 |
| Трава чистотела большого (<i>Chelidonii majoris herba</i>) | 0,28±0,10 | 0,02,0±0,01 | 12,3±1,0 | 0,54±0,30 | 21,5±7,1 | 2,28±0,25 | 0,08±0,03 | 0,05±0,01 | 0,03±0,01 |
| Трава зверобоя (<i>Hyperici herba</i>) | 0,14±0,10 | 0,02±0,01 | 10,1±3,5 | 0,45±0,30 | 17,0±7,50 | 1,97±1,51 | 0,09±0,03 | 0,03±0,01 | 0,03±0,01 |
| Цветки пижмы обыкновенной (<i>Tanaceti vulgaris flores</i>) | 0,28±0,15 | 0,02±0,01 | 10,1±1,3 | 0,22±0,10 | 15,9±2,3 | 4,59±2,03 | 0,10±0,02 | 0,08±0,03 | 0,03±0,01 |
| Трава эрвы шерстистой (<i>Aervae lanatae herba</i>) | 0,56±0,35 | 0,05±0,01 | 8,85±4,42 | 0,40±0,30 | 11,3±4,2 | 4,11±2,07 | 0,11±0,03 | 0,09±0,05 | 0,03±0,01 |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inulae helenii rhizomata et radices</i>) | 0,11±0,02 | 0,02±0,01 | 3,74±0,63 | 0,06±0,01 | 10,2±1,4 | 2,45±0,16 | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginis farfarae folia</i>) | 0,66±0,15 | 0,03±0,01 | 30,4±3,50 | 0,49±0,21 | 23,2±2,01 | 5,89±0,47 | 0,18±0,07 | 0,11±0,05 | 0,06±0,01 |

Продолжение таблицы 32

| Образец | Al | Ba | Ca | Fe | K | Mg | Mn | Sr | Zn |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Слоевница ламинарии (<i>Laminariae thalli</i>) | 0,53±0,12 | <0,01 | 7,14±1,37 | 0,43±0,10 | 49,4±2,24 | 6,20±0,82 | 0,03±0,01 | 0,40±0,06 | 0,02±0,01 |
| Цветки бессмертника песчаного (<i>Helichrysi</i> <i>arenarii flores</i>) | 0,05±0,01 | 0,03±0,01 | 10,1±1,07 | 0,11±0,04 | 10,8±1,21 | 2,00±0,49 | 0,16±0,14 | 0,06±0,01 | 0,30±0,06 |
| Побеги багульника болотного (<i>Ledi palustris</i> <i>cormus</i>) | 0,10±0,04 | 0,08±0,02 | 5,16±0,37 | 0,10±0,05 | 2,22±0,11 | 1,41±0,20 | 0,58±0,08 | <0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья березы (<i>Betulae</i> <i>folia</i>) | 0,06±0,01 | 0,09±0,03 | 8,84±1,31 | 0,12±0,03 | 5,49±1,01 | 2,89±0,17 | 1,35±0,06 | 0,04±0,01 | 0,13±0,05 |
| Листья ортосифона тычиночного (<i>Orthosiphonis staminei</i> <i>folia</i>) | 1,81±0,14 | 0,04±0,01 | 18,1±3,11 | 1,04±0,21 | 19,8±2,13 | 4,37±0,61 | 0,14±0,09 | 0,12±0,05 | 0,04±0,01 |
| Трава мелиссы лекарственной (<i>Melissae</i> <i>officinalis herba</i>) | 0,42±0,11 | 0,09±0,03 | 11,0±2,04 | 0,39±0,31 | 17,6±1,11 | 3,23±0,31 | 0,05±0,01 | 0,04±0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья толокнянки обыкновенной (<i>Arctostaphylos uvae-ursi</i> <i>folia</i>) | 0,12±0,02 | 0,07±0,02 | 3,68±1,49 | 0,12±0,03 | 3,58±0,19 | 0,92±0,27 | 0,05±0,01 | 0,02±0,01 | 0,02±0,01 |
| Листья брусники обыкновенной (<i>Vaccinii</i> <i>vitis-idaeae folia</i>) | 0,15±0,02 | 0,08±0,02 | 8,04±0,33 | 0,06±0,02 | 2,78±0,02 | 1,77±0,03 | 1,17±0,03 | 0,02±0,01 | 0,03±0,01 |
| Трава боровой матки (<i>Orthiliae secundae</i> <i>herbae</i>) | 0,53±0,17 | 0,12±0,02 | 5,99±0,18 | 0,47±0,10 | 6,34±0,02 | 2,31±0,15 | 0,28±0,02 | 0,05±0,09 | 0,02±0,01 |

Продолжение таблицы 32

| Образец | <i>Al</i> | <i>Ba</i> | <i>Ca</i> | <i>Fe</i> | <i>K</i> | <i>Mg</i> | <i>Mn</i> | <i>Sr</i> | <i>Zn</i> |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Трава зимолюбки (<i>Chimaphilae umbellatae herbae</i>) | 0,19±0,05 | 0,05±0,01 | 7,71±0,51 | 0,13±0,02 | 6,48±0,10 | 2,14±0,05 | 0,73±0,08 | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 |
| Ферментированные листья бадана (Чигирский чай) (<i>Bergeniae crassifoliae folia fermentato (ферментитрованные)</i>) | 0,28±0,02 | 0,13±0,02 | 10,8±0,11 | 0,31±0,02 | 1,55±0,09 | 2,92±0,02 | 0,20±0,01 | 0,09±0,02 | <0,01 |
| Корневища бадана толстолистного (<i>Bergeniae crassifoliae rhizomata</i>) | 0,17±0,01 | 0,07±0,02 | 10,7±0,23 | 0,16±0,06 | 5,75±0,11 | 1,70±0,03 | 0,08±0,02 | 0,12±0,03 | 0,05±0,01 |

исследуемых образцах не обнаружено. В результате этого содержание даже наиболее распространенных с точки зрения авторов элементов может значительно отличаться при исследовании даже одного вида сырья, но собранных на различных территориях. Этот недостаток учтен авторами работы [252], в которой для элементов приводятся (в виде таблиц) интервалы от трех и более порядков ppm, что на наш взгляд кажется весьма обоснованным. Полученные в нашей работе данные хорошо согласуются с интервалами, приведенные в [252]. Практически все металлы за исключением Са, К, Mg находятся на уровне от 0,0n до 0,n мг/г, что позволяет сделать вывод, что исследуемый материал собран в регионах с благоприятной геохимической и экологической обстановкой.

В результате выполненных исследований была предложена унифицированная методика количественного определения элементов методом АЭС-ИСП.

Методика

Программа кислотного разложения образцов (Таблица 33), этапы приготовления стандартных растворов (Таблица 34), процедура определения элементов методом АЭС-ИСП приведены ниже.

Таблица 33 – Программа кислотного разложения образцов субстанций растительного происхождения в условиях МВ-нагрева

| <i>Этап</i> | <i>Время, мин</i> | <i>Температура, °С</i> |
|-------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 20 | 25 °С→170 °С |
| 2 | 20 | 170 °С |
| 3 | 50 | 170 °С→25 °С |

После проведения разложения образца ЛРС массой 0,5-1,0 г распечатывают сосуды и фильтруют содержимое в колбу объемом 100 мл через фильтровальную бумагу типа «Синяя лента», объем раствора доводят водой до метки. Испытуемый раствор используют свежеприготовленным. Полученные растворы далее анализируют методом АЭС-ИСП.

Раствор сравнения готовится аналогично испытуемому раствору. В пустой тefлоновый сосуд прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Сосуды тщательно укупоривают и помещают в МВ-печь. Разложение образцов ведут по программе, представленной в Таблице 33. Распечатывают сосуды и фильтруют содержимое в колбу объемом 100 мл через фильтровальную бумагу типа «Синяя лента», объем раствора доводят водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным. Стандартные растворы готовятся согласно таблице 34.

Таблица 34 – Приготовление стандартных растворов при определении элементов методом АЭС-ИСП

| <i>Тип раствора</i> | <i>Приготовление и применение</i> |
|------------------------------|---|
| <i>Стандартный раствор 1</i> | 2 мл мультиэлементного стандартного раствора IV для ИСП 1000 мг/л помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация элементов 20 мкг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 2</i> | 100 мкл раствора 1 помещают в мерную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация элементов 0,2 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Стандартный раствор 3</i> | 250 мкл раствора 1 помещают в мерную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация элементов 0,5 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Стандартный раствор 4</i> | 500 мкл раствора 1 помещают в мерную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация элементов 1,0 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Стандартный раствор 5</i> | 1000 мкл раствора 1 помещают в мерную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация элементов 2,0 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Стандартный раствор 6</i> | 2500 мкл раствора 1 помещают в мерную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация элементов 5,0 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Стандартный раствор 7</i> | 5000 мкл раствора 1 помещают в мерную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация элементов 10,0 мкг/мл). Раствор используют свежеприготовленным |

Для определения элементов методом АЭС-ИСП подготавливают прибор согласно инструкции по эксплуатации. Аналитические длины волн выбирают из базы данных прибора таким образом, чтобы обеспечить отсутствие/минимальное влияние со стороны иных эмиссионных линий аналита или эмиссионных линий других элементов. При анализе ЛРС, там, где это возможно, следует избегать использования в качестве аналитических эмиссионных линий, лежащих в видимой области спектра. Для особо точных измерений рекомендуется проводить определение элемента на двух длинах волн. В этом случае для расчета содержаний аналитов используется среднее арифметическое концентраций элементов в растворе сравнения и испытуемых растворах, измеренных по калибровочным кривым элементов, построенных для двух длин волн. Последовательно вводят в плазму раствор сравнения, стандартные растворы 1–7 и испытуемый раствор не менее 3 раз. По полученным калибровочным кривым определяют концентрацию каждого элемента в испытуемых растворах и растворе сравнения.

Содержание элементов в ЛРС (X , ppm) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot (C - C_0)}{a},$$

где C – концентрация элемента в испытуемом растворе, найденная по калибровочной кривой, мкг/мл;

C_0 – концентрация элемента в растворе сравнения, найденная по калибровочной кривой, мкг/мл;

a – масса навески сырья, г.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана и валидирована унифицированная АЭС-ИСП-методика, позволяющая определять микроэлементы на уровне мг/г. Точность (коэффициенты вариации) определения варьирует в зависимости от определяемого элемента и не превышает 1,50 %.

3.3. Разработка методики количественного определения кремния спектрофотометрическим методом

В настоящее время удовлетворительные методики количественного определения кремния в траве хвоща полевого отсутствуют. Поскольку определение кремния методом АЭС-ИСП затруднено, для разработки методик необходимо использовать иные инструментальные методы. Наиболее точные результаты определения Si могут быть получены при использовании спектрофотометрического метода. За основу была выбрана методика, представленная в работе [4], которая отличается высокой чувствительностью и используется в геохимических исследованиях для анализа руд, пород, почв, габбро, донных отложений. Определению не мешают кальций, магний, алюминий, железо, марганец, щелочные и щелочноземельные металлы, никель, кобальт, медь, цинк, свинец, олово, висмут, цирконий, редкоземельные металлы, торий, молибден, вольфрам, ванадий, хром. Определению мешают фосфор, мышьяк, германий, также образующие окрашенные комплексные соединения с молибдатов аммония. Титан образует с молибдатов аммония труднорастворимое соединение. Добавка винной кислоты позволяет эффективно замаскировать мешающие влияния элементов без предварительного отделения матрицы. Более того, винная кислота позволяет разрушить труднорастворимое соединение молибдата аммония и титана за счет образования легко растворимого комплексного соединения с ней. При содержании SiO_2 до 40 % в анализируемых образцах возможно определение аналита при длине волны 815 ± 5 нм методом прямой спектрофотометрии, что значительно упрощает процедуру анализа.

Поскольку фармакогностические стандарты кремнефильного ЛРС отсутствуют, в качестве стандарта был выбран геохимический стандарт ГСО 728-75 состава нефелиновой руды СНС-1 с содержанием SiO_2 40,2 %. Следует также отметить, что при отсутствии данного СО может быть использован любой геохимический стандарт руд и пород с содержанием кремнекислоты около 40 %. Необходимость сплавления образца при определении кремния (для перевода в растворимую форму) делает возможным разработку унифицированной методики,

так как все органические составляющие растения при такой пробоподготовке сгорают. Разработка методики определения кремния в ЛРС проведена на примере травы хвоща полевого.

Навеску СО массой 100 мг (точная навеска) помещали в платиновый тигель, тщательно перемешивали с 3 г смеси для плавления, представляющей собой 2 весовые части натрия карбоната безводного и 1 часть обезвоженного натрия тетрабората, и 5–10 мг калия нитрата. Смешанную с плавнем пробу в тигле накрывали платиновой крышкой и сплавляли 15–20 мин в муфеле при температуре 900 °С до получения жидкого плава. Вынув тигель из муфеля, быстрым вращением распределяли остывающий плав по стенкам тигля. По охлаждении тигель и крышку помещали в полиэтиленовый стакан объемом не менее 300 мл и заливали таким количеством кипящей воды, чтобы тигель был покрыт ею, но не менее 100 мл. Перемешивали пластмассовой палочкой 3-4 раза и оставляли на ночь. После полного распада плава добавляли в стакан (не более, чем в 2 стакана одновременно) при энергичном перемешивании сразу 100 мл раствора хлористоводородной кислоты 1:3 и продолжали перемешивание до полного растворения гидратов смешанных оксидов. Переносили раствор в мерную колбу на 500 мл, обмывая стакан, тигель и крышку водой очищенной, и, не дожидаясь доведения объема раствора в колбе до метки, перемешивали. Объем раствора доводили водой до метки, перемешивали.

Раствор сравнения готовили аналогично исходному стандартному раствору без добавления СО.

Испытуемый раствор получали аналогично исходному стандартному раствору за исключением того, что масса образца травы хвоща полевого, взятого на анализ, была увеличена в два раза.

«Для развития окраски в мерную колбу вместимостью 100 мл отбирали по 5 мл испытуемого и растворов сравнения, 5 мл раствора аммония молибдата 5%, перемешивали, оставляли на 8–10 мин для развития желтой окраски, добавляли 5 мл раствора винной кислоты 10 %, перемешивали и через 1-2 мин добавляли 20 мл раствора для восстановления, перемешивали, объем раствора доводили водой до

метки, перемешивали и оставляли на 2 часа» (Раменская Г. В., 2018, Приложение Г).

«Окрашивание раствора сравнения проводили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 мл отбирали 10 мл раствора сравнения, 5 мл раствора аммония молибдата 5 %, перемешивали, оставляли на 8–10 мин для развития желтой окраски, добавляли 5 мл раствора винной кислоты 10 %, перемешивали и через 1–2 мин добавляли 20 мл раствора для восстановления, перемешивали, объем раствора доводили водой до метки, перемешивали, оставляли на 2 часа» (Раменская Г. В., 2018, Приложение Г).

Для оценки специфичности были получены УФ/ВИД-спектры раствора сравнения (Рисунок 39), одного из стандартных растворов, используемых для построения линейности (Рисунок 40), и испытуемого раствора (Рисунок 41).

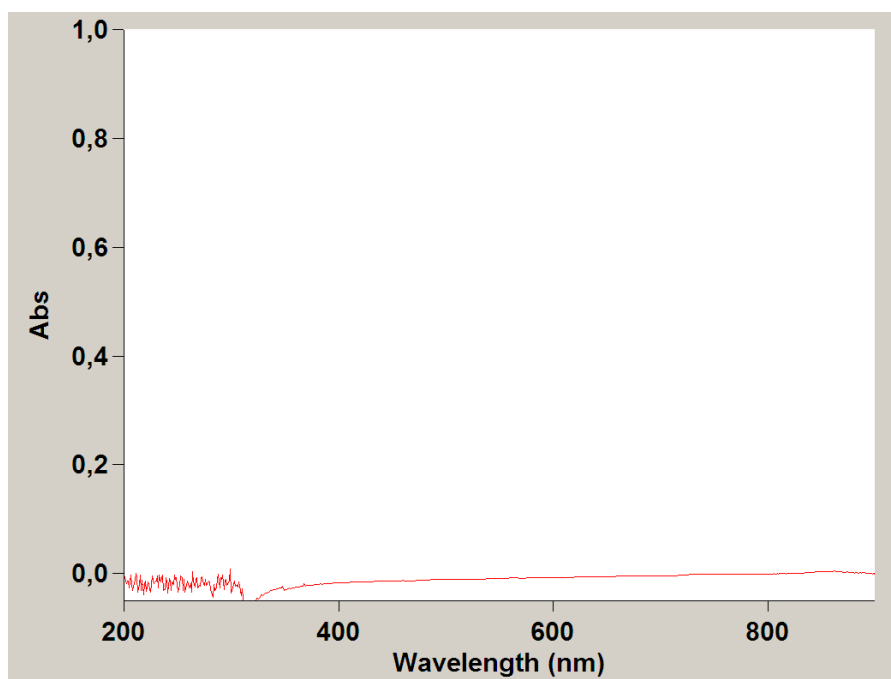


Рисунок 39 – Типичный УФ/ВИД-спектр раствора сравнения

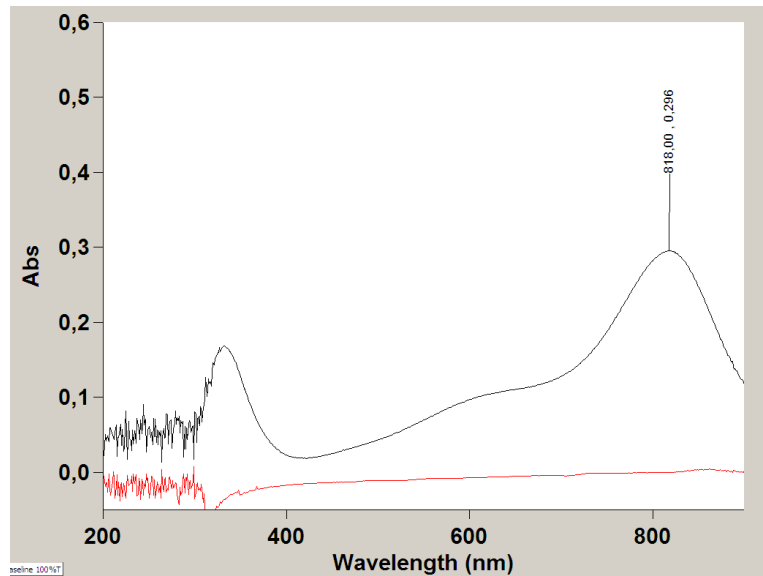


Рисунок 40 – Типичный УФ/ВИД-спектр стандартного раствора с содержанием кремния в пересчете на SiO₂ 4 %.

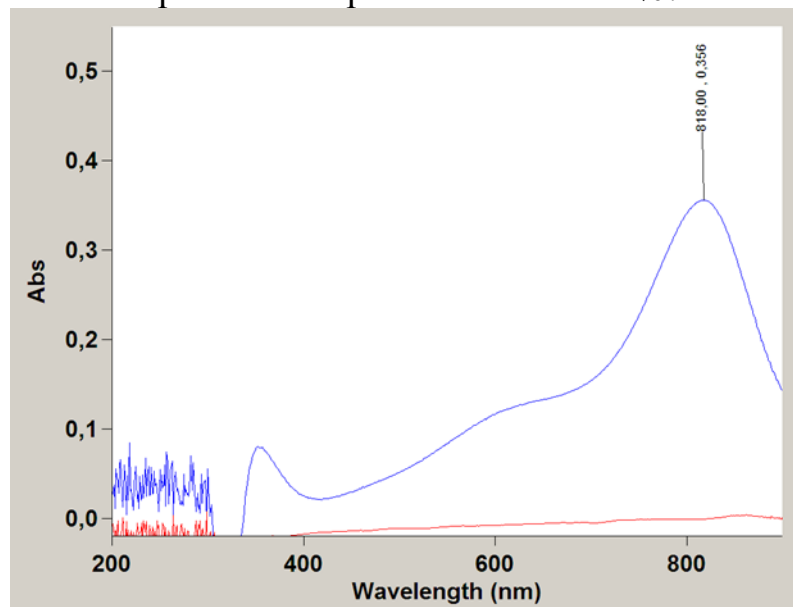


Рисунок 41 – Типичный УФ/ВИД-спектр испытуемого раствора

Из Рисунков 39–41 видно, что в области от 200 до 850 нм наблюдается интенсивное поглощение (для стандартных и испытуемых растворов) при длине волны 818 нм. Поглощение в указанной области УФ/ВИД-спектра раствора сравнения (Рисунок 39) отсутствует, что говорит об отсутствии влияний со стороны компонентов матрицы на аналитический сигнал определяемого элемента. Длины волн максимумов поглощения стандартного и испытуемого растворов представлены в Таблице 35.

Таблица 35 – Специфичность методики определения кремния в пересчете на SiO₂

| Измерение | Стандартный раствор | Испытуемый раствор | Совпадение, % |
|-----------|-------------------------------|-----------------------|---------------|
| | Длина волны (λ), нм | | |
| 1 | 818,0 | 818,0 | 100,0 |
| 2 | 818,0 | 820,0 | 100,2 |
| 3 | 818,0 | 818,0 | 100,0 |

Установлено, что максимумы поглощения совпадают с точностью более 99 %. Выполненные исследования подтверждают высокую специфичность определения кремния в субстанциях растительного происхождения спектрофотометрическим методом.

Для определения линейности методики количественного определения кремния (в пересчете на SiO₂) был приготовлена серия растворов разбавлением исходного стандартного раствора раствором сравнения. Содержание SiO₂ в приготовленных растворах варьировалось от 2 до 12 %. Значения оптических плотностей (A) представлены в Таблице 36.

Таблица 36 – Оценка линейности определения кремния в пересчете на SiO₂ (Nikulin A.V., 2019, Приложение Г)

| № | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A _{ср.} | Содержание SiO ₂ , % |
|---|----------------|----------------|----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 0,1477 | 0,1475 | 0,1475 | 0,1475 | 2 |
| 2 | 0,1968 | 0,1968 | 0,1968 | 0,1968 | 3 |
| 3 | 0,2953 | 0,2952 | 0,2952 | 0,2952 | 4 |
| 4 | 0,4424 | 0,4428 | 0,4424 | 0,4425 | 6 |
| 5 | 0,5830 | 0,5830 | 0,5830 | 0,5830 | 8 |
| 6 | 0,8849 | 0,8852 | 0,8849 | 0,8850 | 12 |

По данным, представленным в Таблице 36, был построен график, отражающий зависимость оптической плотности A от содержания кремния в пересчете на оксид (Рисунок 42).

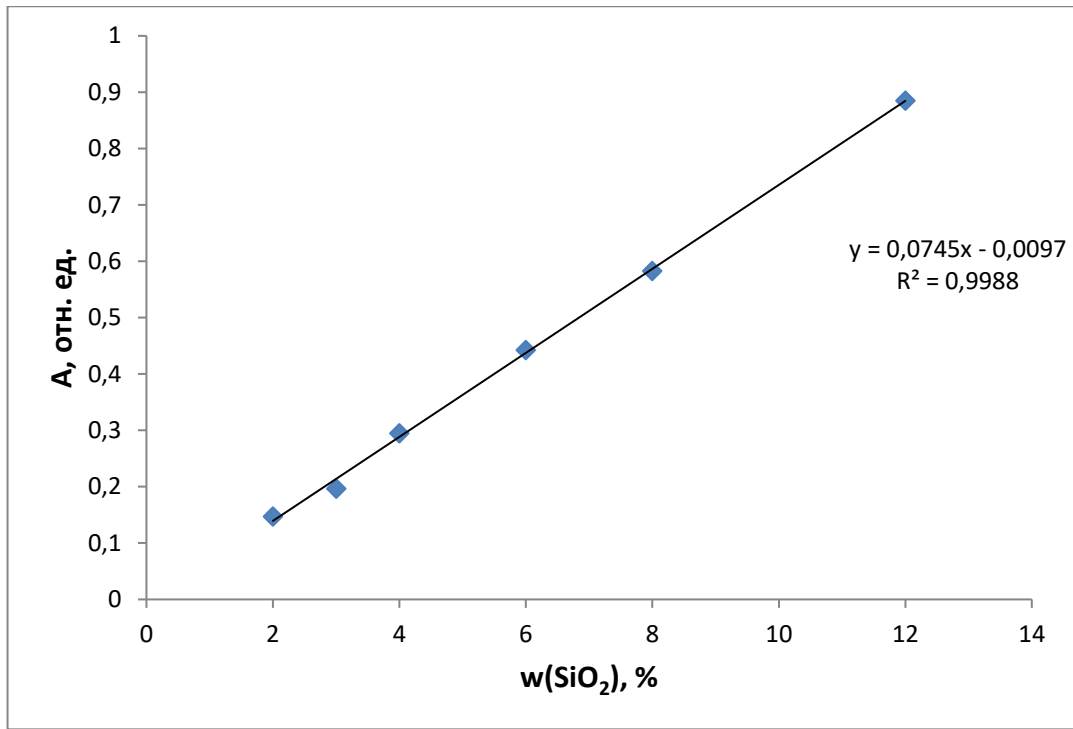


Рисунок 42 – Линейная зависимость аналитического сигнала от содержания SiO_2 (коэффициент $r^2 = 0,998$, коэффициент корреляции $r = 0,999$).

Коэффициент корреляции составил 0,9990, что позволяет сделать вывод о линейной зависимости между содержанием оксида кремния и величиной оптической плотности при содержании SiO_2 до 12 %. Выявленная линейная зависимость может быть использована в качестве калибровочного графика при определении аналита. Увеличение концентрации SiO_2 выше 12 % нежелательно, поскольку прямая пропорциональная зависимость между содержанием определяемого компонента и аналитическим сигналом нарушается.

Правильность доказывалась методом добавок путем введения точного объема раствора с известным содержанием аналита к испытуемому раствору. При этом важно следить, чтобы полученная итоговая концентрация определяемого элемента находилась в линейном диапазоне концентраций (см. Рисунок 42). Результаты определения кремния в пересчете на диоксид кремния в траве хвоща полевого, а также статистические характеристики представлены в Таблице 37.

Таблица 37 – Правильность определения кремния в пересчете на SiO_2 в траве хвоща полевого (*Equiseti arvensis herba*) ($A = 0,357$ отн. ед.)* (Nikulin A.V., 2019, Приложение Г)

| Содержание добавки, % | Оптическая плотность добавки, отн. ед. | Ожидаемая оптическая плотность, отн. ед. | Найдено, отн. ед. | Открываемость, % |
|--|--|--|-------------------|------------------|
| 1,0 | 0,074 | 0,431 | 0,438 | 101,6 |
| 1,0 | 0,075 | 0,432 | 0,437 | 101,2 |
| 1,0 | 0,074 | 0,431 | 0,438 | 101,6 |
| 2,0 | 0,148 | 0,505 | 0,506 | 100,2 |
| 2,0 | 0,147 | 0,504 | 0,506 | 100,4 |
| 2,0 | 0,148 | 0,505 | 0,507 | 100,4 |
| 3,0 | 0,198 | 0,555 | 0,581 | 104,7 |
| 3,0 | 0,195 | 0,552 | 0,580 | 105,1 |
| 3,0 | 0,197 | 0,554 | 0,580 | 104,7 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | <i>Результаты</i> | |
| Наименьшее значение, % | | | 100,2 | |
| Наибольшее значение, % | | | 105,1 | |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | 102,7 | |
| Стандартное отклонение (s) | | | 2,03 | |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{x}}$) | | | 0,68 | |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{x},\%}$), % | | | 1,98 | |
| Доверительный интервал (ΔX , $P=0,95$) | | | 1,56 | |

Примечание. * – в скобках приведены данные для кремния, содержащегося в испытуемом растворе

Из представленных данных видно, что открываемость находится в диапазоне от 100,2 до 105,1 %, а коэффициент вариации ($n = 9$) составляет 1,98 %.

При исследовании повторяемости рассчитывали коэффициент вариации, используя результаты количественного определения Si в пересчете на SiO_2 ($n = 6$). Поскольку кремний в траве хвоща полевого содержится на уровне нескольких процентов в отличие от примесных металлов, содержащихся в анализируемых образцах на микроуровне, то при расчете содержания кремния учитывалась влажность сырья. Результаты приведены в Таблице 38.

Таблица 38 – Оценка повторяемости методики количественного определения кремния в пересчете на SiO₂ в траве хвоща полевого (*Equiseti arvensis herba*) (n = 6, P = 0,95) (Nikulin A.V., 2019, Приложение Г)

| <i>A</i> | <i>W, %</i> | <i>Содержание, %</i> | $\bar{X}, \%$ | <i>Станд. отклон.</i> | <i>Коэффициент вариации, %</i> | <i>Доверительный интервал</i> |
|----------|-------------|----------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 0,358 | 13 | 5,70 | 5,66 | 0,085 | 1,50 | 0,09 |
| 0,362 | | 5,76 | | | | |
| 0,350 | | 5,58 | | | | |
| 0,348 | | 5,54 | | | | |
| 0,359 | | 5,71 | | | | |
| 0,354 | | 5,64 | | | | |

Анализ данных, представленных в Таблице 38, показывает, что коэффициент вариации (n = 6) составляет 1,50 %.

Таким образом, количественное определение кремния в пересчете на SiO₂ возможно в интервале содержаний от 2 до 12 % аналита. Правильность, линейность, повторяемость установлены для интервальных значений и значений внутри интервала: линейность (2–12 %), правильность (2–12 %), повторяемость (около 5,66 %). Методика количественного определения кремния в пересчете на SiO₂ в ЛРС представлена ниже.

Методика

Раствор аммония молибдата 5 %. 50 г аммония молибдата растворяют в 500–600 мл кипящей воды. По охлаждении раствор фильтруют в пластиковую мерную колбу объемом 1000 мл, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор винной кислоты 10 %. 100 г винной кислоты помещают в мерную колбу объемом 1000 мл, прибавляют 700 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

Раствор для восстановления. 20 г бесцветного метола растворяют в 800 мл воды, добавляют 13 г натрия сульфита безводного, полученный раствор фильтруют в мерную колбу объемом 1000 мл, объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Раствор сохраняют в темной склянке не более 8–10 дней.

Смесь для сплавления. Для приготовления смеси для сплавления 2 весовые части натрия карбоната безводного и 1 часть обезвоженного натрия тетрабората тщательно растирают в ямшевой или фарфоровой ступке. Растертую смесь тщательно перемешивают в стеклянной банке с притертой крышкой до получения однородной смеси.

Примечание. *Обезвоживание натрия тетрабората.* Для обезвоживания натрия тетраборат порциями по 8–10 г в фарфоровых чашках, помещают в муфельную печь. Поднимают температуру в течение 2 ч до 300–400 °С и выдерживают натрия тетраборат при этой температуре в течение 4 ч.

Раствор хлористоводородной кислоты 1:3. Один объем хлористоводородной кислоты концентрированной разбавляют тремя объемами воды.

Исходный стандартный раствор. Для приготовления исходного раствора используют ГСО 728–75 состава нефелиновой руды СНС-1 (содержание SiO_2 40,2 %) или другой геохимический стандарт с содержанием SiO_2 около 40 %.

Навеску СО массой 100 мг (точная навеска) помещают в платиновый тигель, тщательно перемешивают с 3 г смеси для сплавления и 5–10 мг калия нитрата. Смешанную с плавнем пробу в тигле накрывают платиновой крышкой и сплавляют 15–20 мин в муфеле при температуре 900 °С до получения жидкого плава. Вынув тигель из муфеля, быстрым вращением распределяют остывающий плав по стенкам тигля. По охлаждении тигель и крышку помещают в полиэтиленовый стакан объемом не менее 300 мл и заливают таким количеством кипящей воды, чтобы тигель был покрыт ею, но не менее 100 мл. Перемешивают пластмассовой палочкой 3–4 раза и оставляют на ночь. После полного распада плав добавляют в стакан (не более, чем в 2 стакана одновременно) при энергичном перемешивании сразу 100 мл раствора хлористоводородной кислоты 1:3 и продолжают перемешивание до полного растворения гидратов смешанных оксидов. Переносят раствор в мерную колбу на 500 мл, обмывая стакан, тигель и крышку водой очищенной, и, не дожидаясь доведения объема раствора в колбе до метки, перемешивают. Объем раствора доводят водой до метки, перемешивают.

Стандартные растворы. Стандартные растворы готовят разбавлением исходного стандартного раствора раствором сравнения в мерной колбе вместимостью 100 мл согласно Таблице 39. В таблице также приведены объемы реагентов, необходимые для окрашивания. Объемы растворов доводят водой до метки, перемешивают, выдерживают 2 ч.

Раствор сравнения. Готовят аналогично исходному стандартному раствору без добавления стандартного или испытуемого образца.

Испытуемый раствор. Получают аналогично исходному стандартному раствору при этом масса образца травы хвоща полевого должна составлять 200 мг (точная навеска).

Таблица 39 – Приготовление растворов для построения градуировочного графика

| № п/п | Объем исходного стандартного раствора, мл | Объем раствора сравнения, мл | Объемы реагентов, мл | Содержание SiO ₂ , % |
|-------|---|------------------------------|---|---------------------------------|
| 1 | 0,50 | 9,50 | 5 – раствор молибдата аммония 5 %; 5 – раствор винной кислоты 10 %; 20 – раствор для восстановления | 2 |
| 2 | 0,67 | 9,33 | | 3 |
| 3 | 1,00 | 9,00 | | 4 |
| 4 | 1,50 | 8,50 | | 6 |
| 5 | 2,00 | 8,00 | | 8 |
| 6 | 3,00 | 7,00 | | 12 |

Примечание. Объемы исходного и растворов сравнения корректируют в зависимости от содержания SiO₂ в ГСО

Процедура окрашивания растворов представлена ниже.

В мерную колбу вместимостью 100 мл отбирают по 5 мл испытуемого раствора и раствора сравнения, «5 мл раствора аммония молибдата 5 %, перемешивают, оставляют на 8-10 мин для развития желтой окраски, добавляют 5 мл раствора винной кислоты 10 %, перемешивают и через 1–2 мин добавляют 20 мл раствора для восстановления, перемешивают, объем раствора доводят водой до метки, перемешивают, оставляют на 2 ч.

Измеряют оптическую плотность стандартного и испытуемого растворов на длине волны 815 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Окрашивание раствора сравнения проводится следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 мл отбирают 10 мл раствора сравнения, 5 мл раствора аммония молибдата 5 %, перемешивают, оставляют на 8–10 мин для развития желтой окраски, добавляют 5 мл раствора винной кислоты 10 %, перемешивают и через 1–2 мин добавляют 20 мл раствора для восстановления, перемешивают, объем раствора доводят водой до метки, перемешивают, оставляют на 2 ч» (Раменская Г. В., 2018, Приложение Г).

Содержание кремния в ЛРС пересчете на SiO_2 (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a_0 \cdot \omega(\text{SiO}_2) \cdot 100}{a \cdot (100 - W)},$$

где $\omega(\text{SiO}_2)$ – содержание SiO_2 , определенное по калибровочному графику, %;
 a_0 – навеска ГСО 728-75 состава нефелиновой руды СНС-1 (содержание SiO_2 40,2 %), мг;
 a – навеска сырья, мг;
 W – влажность сырья, %.

Разработанная спектрофотометрическая методика позволяет проводить количественное определение кремния в пересчете на SiO_2 в субстанциях растительного происхождения с удовлетворительной точностью (относительная погрешность составляет 1,59 %).

С использованием разработанной методики были проанализированы образцы травы хвоща полевого от нескольких производителей. Результаты представлены в Таблице 40.

Таблица 40 – Результаты определения кремния (в пересчете на SiO_2) в траве хвоща полевого (*Equiseti arvensis herba*) различных производителей

| Производитель | X, % |
|--------------------------------------|-----------|
| «Русские корни» | 5,66±0,09 |
| «ФармаЦвет» (Красногорсклексредства) | 4,01±0,12 |

Продолжение таблицы 40

| | |
|------------------|-----------|
| «HealthЗдоровье» | 4,25±0,08 |
| «Фитофарм» | 3,78±0,11 |

На основании данных, представленных в Таблице 40, можно установить норму для кремния (в пересчете SiO₂), равную не менее 3,0 %.

3.4. Разработка методики количественного определения нанокolicеств кадмия, свинца, мышьяка методом ЭТААС

Для определения нанокolicеств кадмия, свинца, мышьяка методом ЭТААС были выбраны температурно-временные условия определения этих элементов.

Поскольку свинец (в форме Pb²⁺, присутствующий в растворах) и мышьяк (независимо от формы нахождения) обладают повышенной летучестью, то в условиях стадии термообработки в графитовой кювете атомно-абсорбционного спектрометра они будут теряться. Для купирования этого нежелательного процесса необходимо использовать модификаторы, которые, взаимодействуя с определенной формой элемента, дают в условиях стадии пиролиза нелетучие соединения и, тем самым, предотвращают потери аналитов. На стадии атомизации полученные соединения разлагаются, высвобождая в аналитическую зону графитового атомизатора атомы элемента. В качестве модификаторов были выбраны коммерчески доступные вещества – кислота аскорбиновая (для Pb²⁺) и никеля нитрат (для As). Аскорбиновую кислоту можно отнести к модификаторам восстанавливающего действия, поскольку она переводит при нагревании до 400 °С легко летучую форму Pb²⁺ в труднолетучую форму Pb⁰. Никеля нитрат образует с мышьяком трудно разлагаемые (вплоть до 1000–1500 °С) интерметаллиды.

Аналиты определяли на наиболее интенсивных длинах волн (кадмий – на 228,8 нм, свинец – на 283,3 нм, мышьяк – на 193,7 нм) в графитовых кюветах с пиропокрытием и с применением растворов модификаторов – раствора аскорбиновой кислоты 1 % (для свинца), раствора Ni(NO₃)₂ 1 % (для мышьяка). Для

обеспечения оптимального модифицирования объем аликвоты модификатора должен равняться объему аликвоты испытуемого образца. При определении элементов методом ЭТААС объем аликвоты обычно составляет 10–20 мкл.

Для выбора оптимальных условий определения были зарегистрированы кривые термообработки и атомизации (Рисунок 43–45, показания детектора умножены на 100). Из представленных данных видно, что наиболее оптимальной температурой термообработки является: 350 °С (для кадмия), 400 °С (для свинца), 1400 °С (для мышьяка); наиболее оптимальная температура атомизации – 1600 °С (для кадмия), 2100 °С (для свинца), 2500 °С (для мышьяка). Для кадмия при температуре атомизации 1600 °С возможна контаминация графитовой кюветы продуктами деструкции матрицы на стадии термообработки, поэтому температура атомизации была повышена до 1900 °С. Во избежание разбрызгивания аликвоты по поверхности пиропечи (и соответственно ухудшении метрологических характеристик определения) на стадии отгонки растворителя-сушки остатка было выбрано постепенное повышение температуры от 25 °С до 85 °С и далее до 95–120 °С. Температура отжига/очистки кюветы была выбрана увеличением температуры атомизации на 100 °С: 2000 °С (для кадмия), 2200 °С (для свинца), 2600 °С (для мышьяка). Использование температур выше 2700 °С нежелательно вследствие значительного увеличения износа графитовой печи. Температурно-временные условия определения кадмия, свинца, мышьяка представлены в Таблицах 41–44.

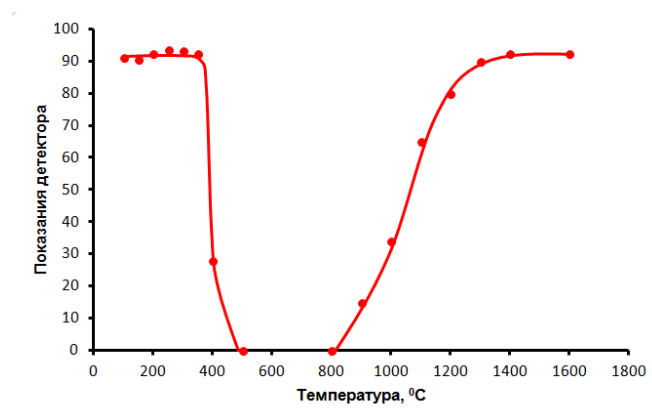


Рисунок 43 – Температурно-временные условия определения кадмия

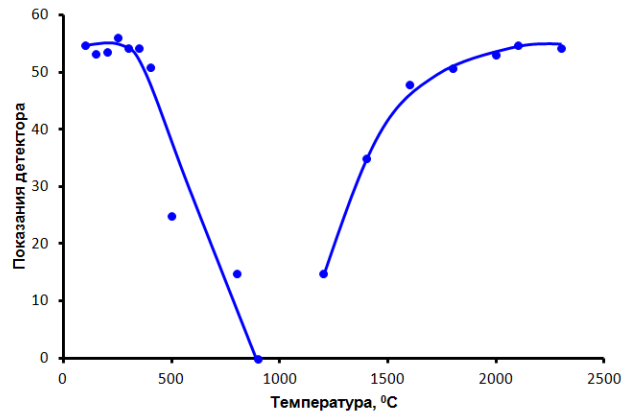


Рисунок 44 – Температурно-временные условия определения свинца

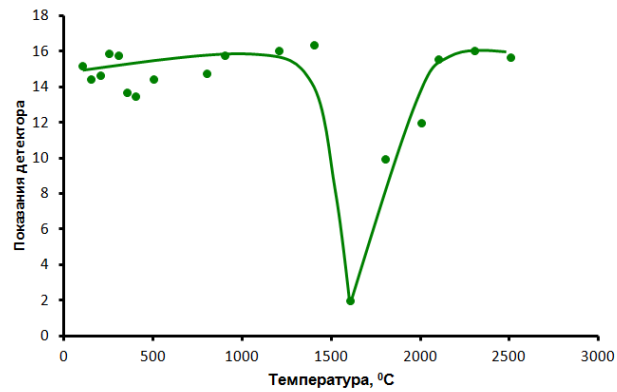


Рисунок 45 – Температурно-временные условия определения мышьяка

Таблица 41 – Температурно-временные условия определения кадмия в растворах, полученных азотнокислым разложением ЛРС в условиях МВ-нагрева

| <i>N</i> стадии | Температура, °C | Время, с | Расход агона, л/мин |
|-----------------|-----------------|----------|---------------------|
| 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| 4 | 350 | 5,0 | 0,3 |
| 5 | 350 | 1,0 | 0,3 |
| 6 | 350 | 2,0 | 0,0 |
| 7 | 1900 | 0,8 | 0,0 |
| 8 | 1900 | 2,0 | 0,0 |
| 9 | 2000 | 2,0 | 0,3 |

Таблица 42 – Температурно-временные условия определения свинца в растворах, полученных азотнокислым разложением ЛРС в условиях МВ-нагрева. Модификатор – раствор аскорбиновой кислоты 1 %

| <i>N</i> стадии | Температура, °С | Время, с | Расход агона, л/мин |
|-----------------|-----------------|----------|---------------------|
| 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| 4 | 400 | 5,0 | 0,3 |
| 5 | 400 | 1,0 | 0,3 |
| 6 | 400 | 1,0 | 0,0 |
| 7 | 2100 | 0,9 | 0,0 |
| 8 | 2100 | 2,0 | 0,0 |
| 9 | 2200 | 2,0 | 0,3 |

Таблица 43 – Температурно-временные условия определения мышьяка в растворах, полученных азотнокислым разложением ЛРС в условиях МВ-нагрева. Модификатор – раствор Ni(NO₃)₂ 1 %

| <i>N</i> стадии | Температура, °С | Время, с | Расход агона, л/мин |
|-----------------|-----------------|----------|---------------------|
| 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| 4 | 1400 | 5,0 | 0,3 |
| 5 | 1400 | 1,0 | 0,3 |
| 6 | 1400 | 1,0 | 0,0 |
| 7 | 2500 | 0,6 | 0,0 |
| 8 | 2500 | 2,0 | 0,0 |
| 9 | 2600 | 2,0 | 0,3 |

Определение элементов может быть проведено как по высоте, так и по площади сигнала. В настоящем исследовании в качестве аналитического сигнала использовалась высота пика абсорбции. Условия определения кадмия, свинца, мышьяка обобщены в Таблице 44.

Таблица 44 – Условия определения кадмия, свинца и мышьяка методом ЭТААС

| Элемент | Длина волны, нм | Модификатор | Температурно-временные условия | | | |
|---------|-----------------|---|--------------------------------|--------|--------|-------------|
| | | | Номер стадии | T*, °C | t**, с | v***, л/мин |
| Cd | 228,8 | Отсутствует | 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| | | | 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| | | | 4 | 350 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 5 | 350 | 1,0 | 0,3 |
| | | | 6 | 350 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 7 | 1900 | 0,8 | 0,0 |
| | | | 8 | 1900 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 9 | 2000 | 2,0 | 0,3 |
| Pb | 283,3 | Раствор аскорбиновой кислоты (1 %) | 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| | | | 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| | | | 4 | 400 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 5 | 400 | 1,0 | 0,3 |
| | | | 6 | 400 | 1,0 | 0,0 |
| | | | 7 | 2100 | 0,9 | 0,0 |
| | | | 8 | 2100 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 9 | 2200 | 2,0 | 0,3 |
| As | 193,7 | Раствор Ni(NO ₃) ₂ (1 %) | 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| | | | 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| | | | 4 | 1400 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 5 | 1400 | 1,0 | 0,3 |
| | | | 6 | 1400 | 1,0 | 0,0 |
| | | | 7 | 2500 | 0,6 | 0,0 |
| | | | 8 | 2500 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 9 | 2600 | 2,0 | 0,3 |

* – температура, ** – время, *** – расход аргона

Выбранные условия определения были использованы в дальнейшем для выяснения работоспособности разрабатываемой методики.

Испытуемый раствор и раствор сравнения получали аналогично испытуемому раствору и раствору сравнения для определения элементов методом АЭС-ИСП (см. раздел 3.1).

При определении кадмия, свинца, мышьяка методом ЭТААС строили градуировочную зависимость для каждого элемента, путем введения в электротермический атомизатор стандартных растворов не менее 3 раз. По полученной градуировочной кривой определяли концентрацию аналитов в испытуемых растворах и растворах сравнения.

При использовании высокоселективного метода ЭТААС для анализа ЛРС специфичность определения достигается по умолчанию вследствие физико-химических особенностей самого метода, в частности практически полного отсутствия спектральных влияний [74]. Тем не менее, нами было проведено дополнительное исследование специфичности путем ввода растворителя (подкисленной воды), стандартных и испытуемого растворов в графитовую печь атомизатора и последующей регистрации сигнала абсорбции. На Рисунках 46–48 показано отсутствие сигналов абсорбции в растворителе. На Рисунках 49–51 в качестве примера приведены сигналы некоторых растворов, используемых для построения калибровочной кривой: раствор кадмия (0,25 нг/мл), раствор свинца (10 нг/мл) и раствор мышьяка (20 нг/мл), а также аналитические сигналы испытуемых растворов (Рисунок 52–54).

Полученные результаты подтверждают специфичность разрабатываемой методики.

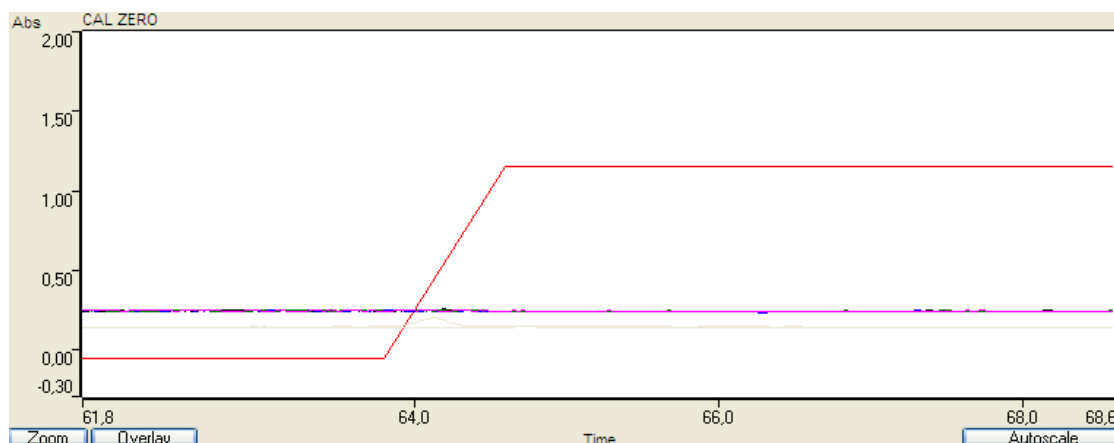


Рисунок 46 – Аналитические сигналы Cd в растворителе

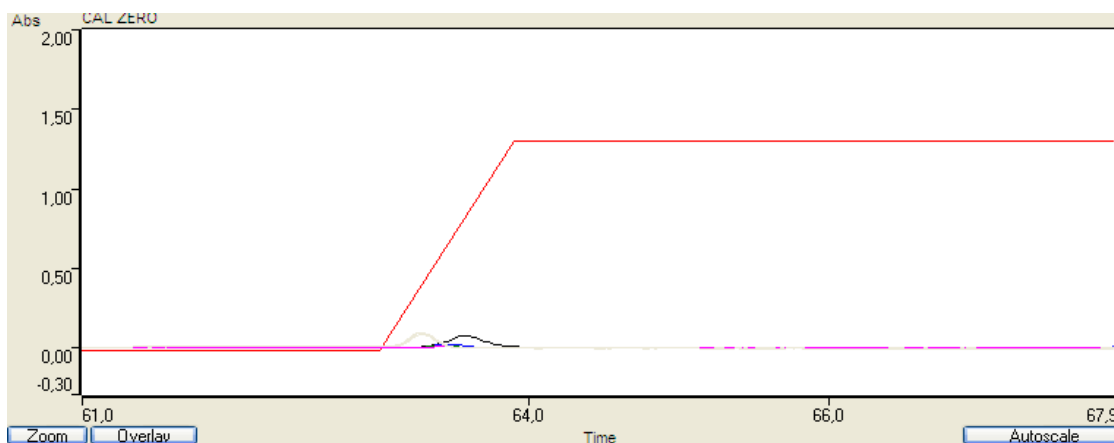


Рисунок 47 – Аналитические сигналы Pb в растворителе

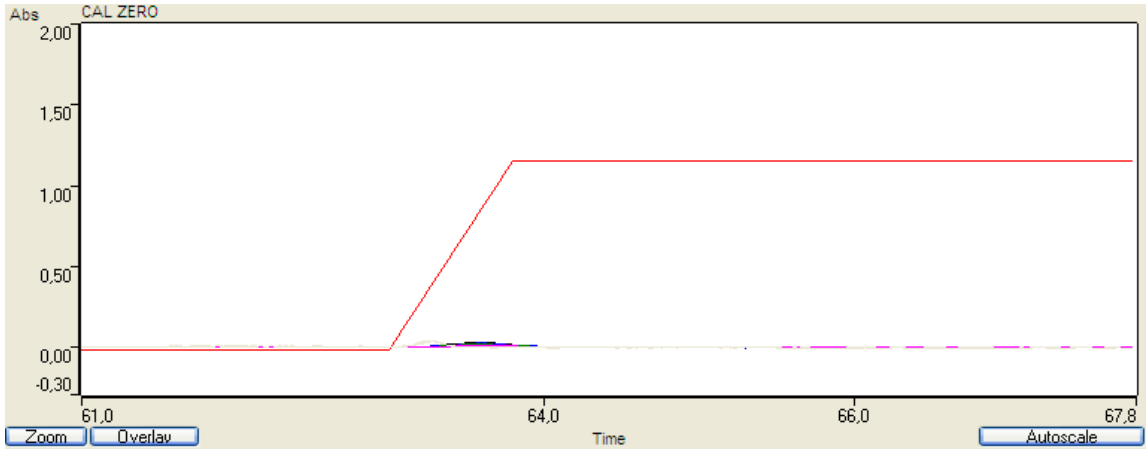


Рисунок 48 – Аналитические сигналы As в растворителе

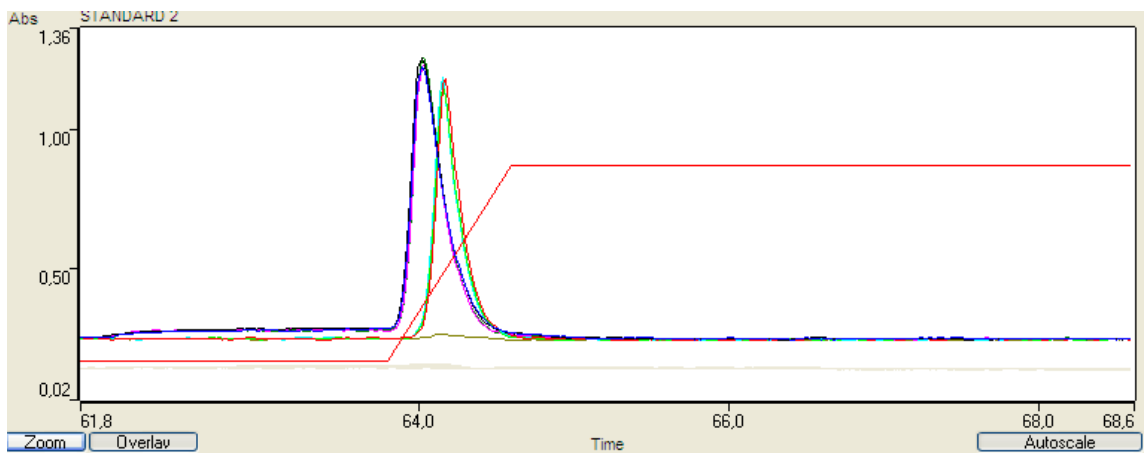


Рисунок 49 – Аналитические сигналы кадмия, $C(\text{Cd}) = 0,25 \text{ нг/мл}$

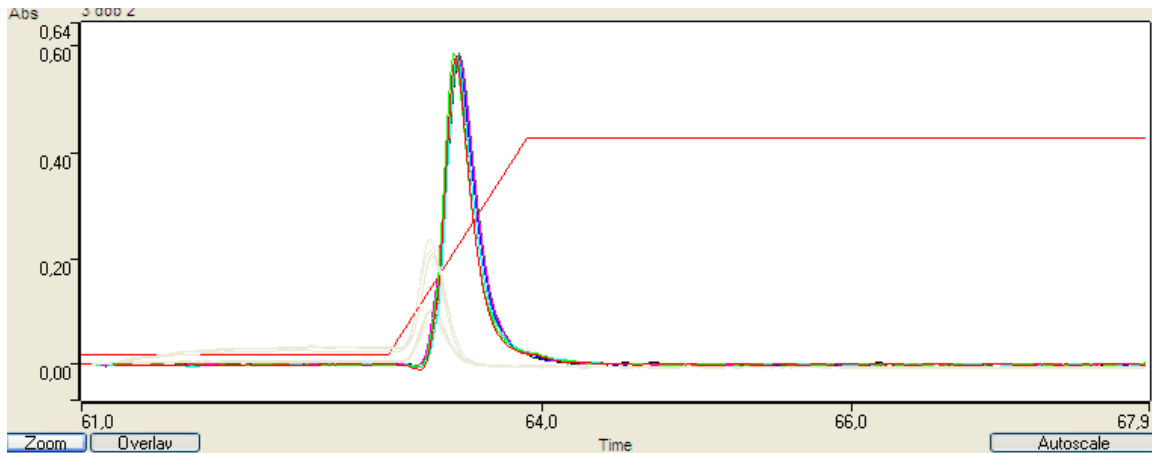


Рисунок 50 – Аналитические сигналы свинца, $C(\text{Pb}) = 10 \text{ нг/мл}$

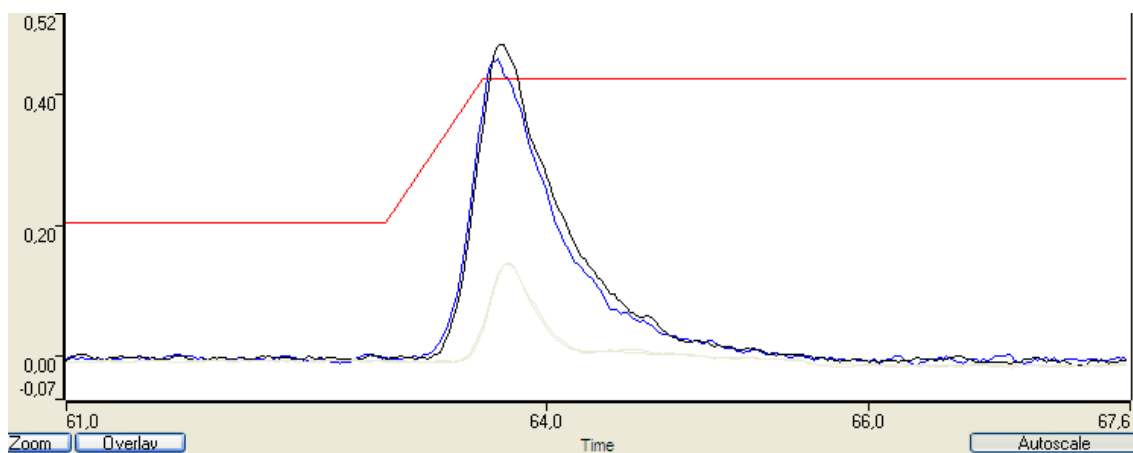


Рисунок 51 – Аналитические сигналы мышьяка, $C(As) = 20$ нг/мл

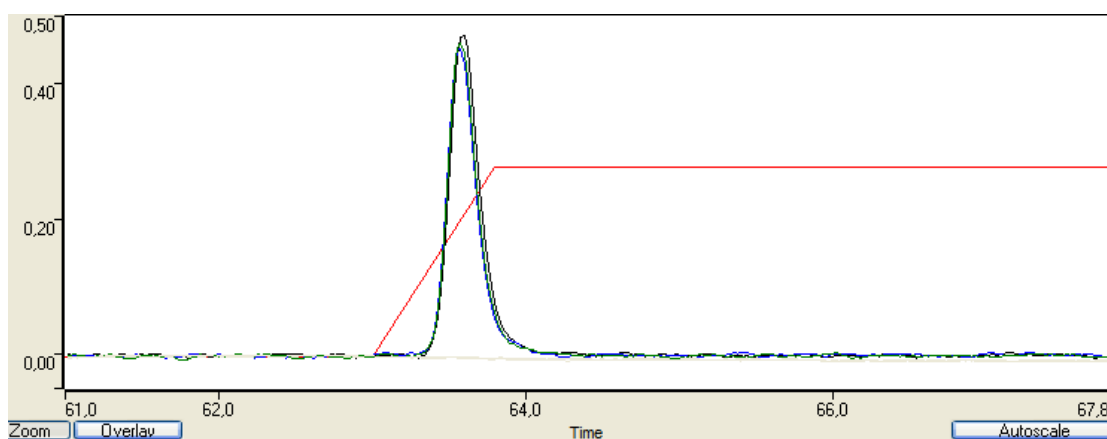


Рисунок 52 – Аналитические сигналы кадмия, испытуемый раствор (трава фиалки)

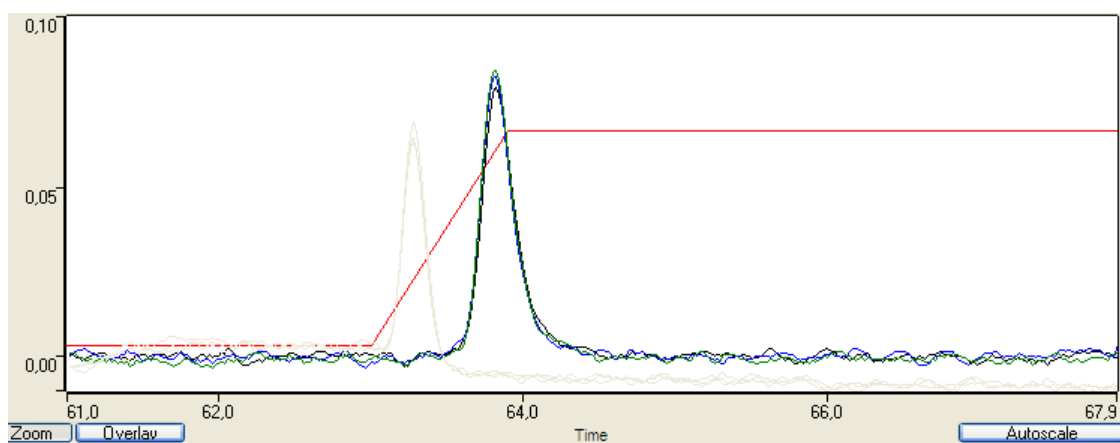


Рисунок 53 – Аналитические сигналы свинца, испытуемый раствор (трава мелиссы лекарственной)

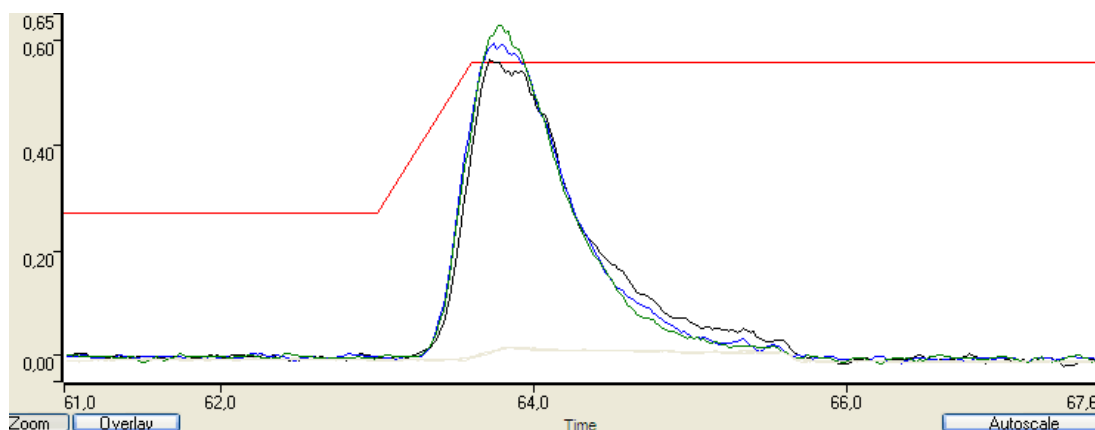


Рисунок 54 – Аналитические сигналы мышьяка, испытуемый раствор (слоевица ламинарии)

Линейность исследовали посредством измерения величин абсорбции стандартных растворов в диапазоне от 0,1 до 1 нг/мл для кадмия, от 2,5 до 20 нг/мл для свинца, от 5 до 40 нг/мл для мышьяка (Таблица 45–47).

Таблица 45 – Линейность определения Cd

| Длина волны, нм | C, нг/мл | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|
| | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| 228,8 | 0,397298 | 0,934471 | 1,419270 | 1,738070 |
| | 0,399584 | 0,908168 | 1,396090 | 1,705710 |
| | 0,422580 | 0,929055 | 1,425880 | 1,723590 |
| A _{ср} | 0,406487 | 0,923898 | 1,413740 | 1,722450 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\sigma},\%}$), % | 4,87 | 1,50 | 1,10 | 0,90 |

Таблица 46 – Линейность определения Pb

| Длина волны, нм | C, нг/мл | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|
| | 2,5 | 5 | 10 | 20 |
| 283,3 | 0,137774 | 0,286309 | 0,542646 | 0,948204 |
| | 0,136783 | 0,292915 | 0,556134 | 0,956935 |
| | 0,144038 | 0,295396 | 0,551992 | 0,956428 |
| A _{ср} | 0,139532 | 0,291540 | 0,549942 | 0,946369 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\sigma},\%}$), % | 2,80 | 1,60 | 1,00 | 1,60 |

Таблица 47 – Линейность определения As

| Длина волны, нм | C, нг/мл | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|
| | 5 | 10 | 20 | 40 |
| 193,7 | 0,041067 | 0,085374 | 0,156015 | 0,307373 |
| | 0,040964 | 0,083691 | 0,140099 | 0,308991 |
| | 0,043581 | 0,078041 | 0,149354 | 0,295475 |
| A _{ср} | 0,041870 | 0,082369 | 0,148489 | 0,303946 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{\sigma},\%}$), % | 3,50 | 4,70 | 5,40 | 2,40 |

По данным Таблиц 45–47 были построены графики зависимости аналитических сигналов металлов от их концентрации в растворе (Рисунок 55–57).

На Рисунках 55 и 56 видно, что линейная зависимость между величиной аналитического сигнала нарушается: при концентрации кадмия выше 0,3 нг/мл, при концентрации свинца выше 10 нг/мл. В процессе работы графитовой кюветы линейность через 200–300 циклов увеличивается до 0,5 нг/мл (для кадмия), 20 нг/мл (для свинца), что должно учитываться при определении элементов методом ЭТААС. Общее число циклов термообработки-атомизации в графитовой кювете с пиропокрытием обычно не превышает 800–1000.

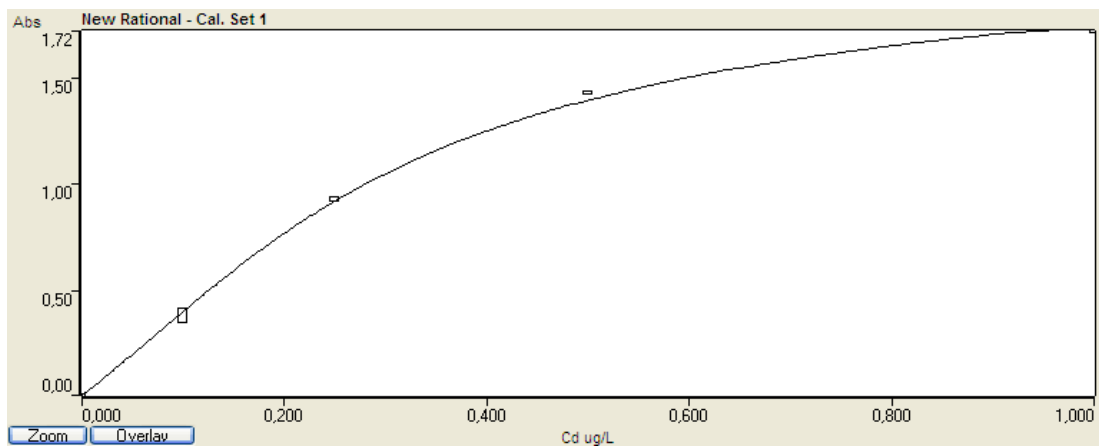


Рисунок 55 – Зависимость аналитического сигнала Cd от концентрации стандартных растворов

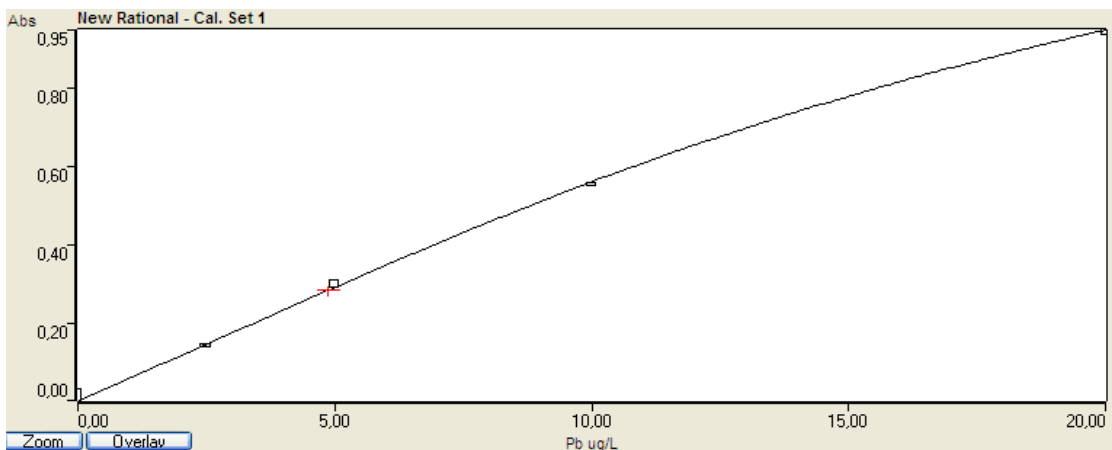


Рисунок 56 – Зависимость аналитического сигнала Pb от концентрации стандартных растворов

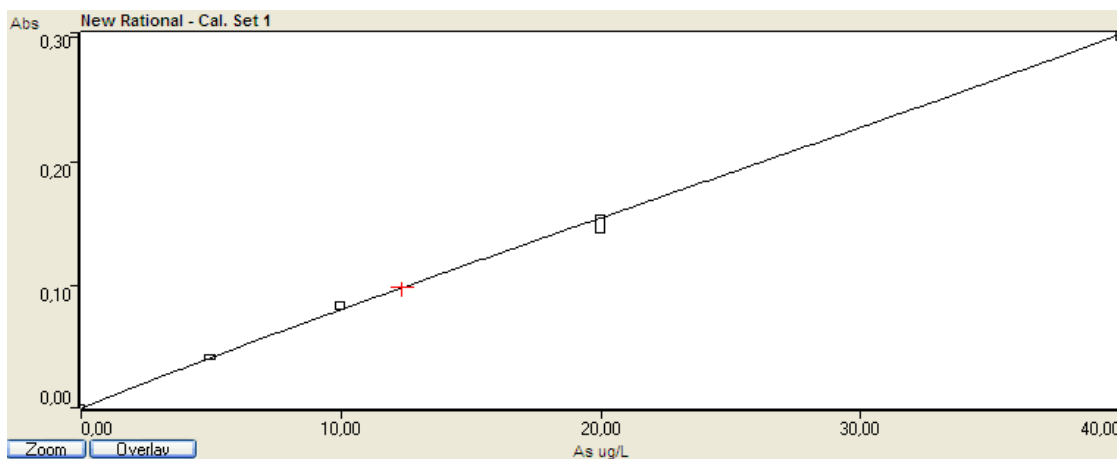


Рисунок 57 – Зависимость аналитического сигнала As от концентрации стандартных растворов

Коэффициенты корреляции r , вычисленные на основе линейных участков калибровочных кривых представлены в Таблице 48.

Таблица 48 – Коэффициенты корреляции

| Элемент | r |
|---------|--------|
| Cd | 0,9994 |
| Pb | 1,0000 |
| As | 1,0000 |

Таким образом, анализ полученных данных позволяет заключить, что значение коэффициентов корреляции для линейных участков зависимостей для кадмия, свинца и мышьяка составили более 0,995, что подтверждает линейность количественного определения кадмия – до 0,3 нг/мл, свинца – до 10 нг/мл, мышьяка – до 40 нг/мл включительно.

Правильность была изучена методом добавок, путем прибавления точных количеств элементов к испытываемому раствору, полученному кислотным разложением плодов шиповника, так как содержание кадмия, свинца и мышьяка в нем находилось ниже предела обнаружения. Проводили по три параллельных определения для каждой добавки (9 измерений, 3 концентрации внутри определяемого диапазона).

Испытуемый раствор получали по процедуре, описанной в разделе 3.1. После перенесения растворов в три мерные колбы, прибавляли 20 мл воды, далее

определенный объем раствора добавки, доводили объемы растворов до метки водой, перемешивали. Результаты определения правильности представлены в Таблице 49.

Таблица 49 – Правильность определения Cd, Pb, As

| Длина волны, нм | Введено, нг/мл | A, отн. ед. | Найдено, нг/мл | A, отн. Ед. | Открываемость, % |
|--|----------------|-------------|----------------|-------------|------------------|
| Cd (228,8)* | 0,10 | 0,397298 | 0,07 | 0,281245 | 70,8 |
| | 0,10 | 0,399584 | 0,07 | 0,278109 | 69,6 |
| | 0,10 | 0,422580 | 0,07 | 0,283591 | 67,1 |
| | 0,25 | 0,934471 | 0,28 | 1,003170 | 107,4 |
| | 0,25 | 0,908168 | 0,28 | 1,003090 | 110,5 |
| | 0,25 | 0,929055 | 0,28 | 0,980287 | 105,5 |
| | 0,50 | 1,419270 | 0,44 | 1,384000 | 97,5 |
| | 0,50 | 1,396090 | 0,44 | 1,265060 | 90,6 |
| | 0,50 | 1,425880 | 0,44 | 1,285190 | 90,1 |
| Pb (283,3) | 5 | 0,286390 | 4,89 | 0,284639 | 99,4 |
| | 5 | 0,292915 | 4,89 | 0,296152 | 101,1 |
| | 5 | 0,295396 | 4,89 | 0,287367 | 97,3 |
| | 10 | 0,542646 | 9,86 | 0,550960 | 101,5 |
| | 10 | 0,556134 | 9,86 | 0,556922 | 100,1 |
| | 10 | 0,551992 | 9,86 | 0,552188 | 100,0 |
| | 20 | 0,948204 | 15,2 | 0,778332 | 82,1 |
| | 20 | 0,956935 | 15,2 | 0,773113 | 80,8 |
| | 20 | 0,956428 | 15,2 | 0,786918 | 82,3 |
| As (193,7) | 10 | 0,085374 | 12,4 | 0,096412 | 112,9 |
| | 10 | 0,083691 | 12,4 | 0,104536 | 124,9 |
| | 10 | 0,078041 | 12,4 | 0,091354 | 117,1 |
| | 20 | 0,156015 | 22,8 | 0,179334 | 114,9 |
| | 20 | 0,140099 | 22,8 | 0,180298 | 128,7 |
| | 20 | 0,149354 | 22,8 | 0,163539 | 109,5 |
| | 40 | 0,307373 | 44,5 | 0,332867 | 108,3 |
| | 40 | 0,308991 | 44,5 | 0,342783 | 110,9 |
| | 40 | 0,295475 | 44,5 | 0,339324 | 114,8 |
| Статистические характеристики | | | Cd | Pb | As |
| Наименьшее значение, % | | | 67,1 | 80,8 | 108,3 |
| Наибольшее значение, % | | | 110,5 | 101,1 | 128,7 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | 88,8 | 91,0 | 118,5 |
| Стандартное отклонение (s) | | | 17,1 | 9,17 | 6,90 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{x}}$) | | | 5,70 | 3,06 | 2,30 |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{x},\%}$), % | | | 19,3 | 10,1 | 5,82 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | 13,2 | 7,06 | 5,31 |

* – в скобках приведены аналитические длины волн (нм)

На основании данных Таблицы 49 было показано, что открываемость (с учетом следового уровня содержаний аналитов) находится в диапазоне от 70,0 до 130,0 % для всех трех добавок. Установлено, что коэффициент вариации для кадмия, свинца и мышьяка на выбранных длинах волн не превышает 7,0 %.

Для определения повторяемости рассчитывали коэффициент вариации по результатам количественного определения металлов в испытуемых растворах с следующими добавками элементов: 0,5 нг/мл для кадмия, 10 нг/мл для свинца, 20 нг/мл для мышьяка ($n = 6$). Результаты приведены в Таблице 50.

Таблица 50 – Оценка повторяемости методики количественного определения элементов в растворах с концентрацией металлов: 0,5 нг/мл для кадмия, 10 нг/мл для свинца, 20 нг/мл для мышьяка ($n = 6$, $P = 0,95$)

| <i>Элемент</i> | <i>A, отн. Ед.</i> | <i>A_{ср}</i> | <i>Станд. Откл.</i> | <i>Коэффициент вариации, %</i> | <i>Доверительный интервал</i> |
|----------------|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Cd | 1,30946 | 1,29441 | 4,85 | 3,75 | 5,09 |
| | 1,27504 | | | | |
| | 1,38400 | | | | |
| | 1,26506 | | | | |
| | 1,28519 | | | | |
| | 1,24769 | | | | |
| Pb | 0,550960 | 0,551154 | 0,59 | 1,07 | 0,62 |
| | 0,556922 | | | | |
| | 0,552188 | | | | |
| | 0,558158 | | | | |
| | 0,544621 | | | | |
| | 0,544074 | | | | |
| As | 0,186513 | 0,181250 | 0,45 | 2,48 | 0,48 |
| | 0,179334 | | | | |
| | 0,180298 | | | | |
| | 0,186930 | | | | |
| | 0,178953 | | | | |
| | 0,175474 | | | | |

Результаты, приведенные в Таблице 50, свидетельствуют, что коэффициент вариации не превышает 5 % для всех элементов.

Таким образом определение Cd, Pb, As методом ЭТААС применимо в интервале концентраций от 0,0 до 0,3 (0,5) нг/мл для Cd, от 0,5 до 15 (20) нг/мл – для Pb, от 10 до 40 нг/мл для As в испытуемом растворе.

Разработанная методика была апробирована для определения кадмия, свинца и мышьяка в ЛРС различных морфологических групп. Данные представлены в Таблице 51.

Таблица 51 – Результаты определения кадмия, свинца и мышьяка в субстанциях растительного происхождения, нг/г

| Образец | Cd | Pb | As |
|--|-------|--------|---------|
| Трава пустырника (<i>Leonuri herba</i>) | 15±5 | –* | – |
| Цветки ромашки аптечной (<i>Chamomillae recutita flores</i>) | 9±3 | 122±12 | – |
| Цветки пижмы обыкновенной (<i>Tanaceti vulgaris flores</i>) | 4±2 | – | – |
| Трава эрвы шерстистой (<i>Aervae lanatae herba</i>) | 25±10 | – | – |
| Трава зверобоя (<i>Hyperici herba</i>) | – | 150±21 | – |
| Слоевница ламинарии (<i>Laminariae thalli</i>) | 21±6 | – | 8481±12 |
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginis farfarae folia</i>) | 14±5 | – | – |
| Цветки бессмертника песчаного (<i>Helichrysi arenarii flores</i>) | 15±7 | – | – |
| Листья березы (<i>Betulae folia</i>) | 14±7 | – | – |
| Трава Melissa лекарственной (<i>Melissae officinalis herba</i>) | – | 263±30 | – |
| Листья ортосифона тычиночного (<i>Orthosiphonis staminei folia</i>) | – | 95±30 | – |
| Кора дуба (<i>Quercus cortex</i>) | 8±3 | 104±20 | – |
| Трава душицы обыкновенной (<i>Origanum vulgare herba</i>) | – | – | – |
| Трава горца птичьего (<i>Polygonum aviculare herba</i>) | – | 90±25 | – |
| Листья сенны (<i>Senna folia</i>) | – | 106±39 | – |
| Трава золототысячника (<i>Centaurea herba</i>) | – | – | – |
| Корни и корневища кровохлебки лекарственной (<i>Sanguisorba officinalis</i>) | – | 128±31 | – |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inula helenium rhizomata et radices</i>) | 6±2 | – | – |
| Цветки липы (<i>Tiliae flores</i>) | 4±2 | – | – |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxacum officinale radices</i>) | 8±2 | – | – |
| Листья подорожника большого (<i>Plantago major folia</i>) | 4±2 | 91±23 | – |
| Корни алтея (<i>Althaea radices</i>) | 4±2 | – | – |
| Трава фиалки (<i>Viola herba</i>) | 27±11 | – | – |
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimi semina</i>) | 11±4 | – | – |
| Корни лопуха (<i>Arctium radices</i>) | 8±4 | – | – |
| Листья толокнянки обыкновенной (<i>Arctostaphylos uva-ursi folia</i>) | 1±1 | – | – |
| Листья брусники обыкновенной (<i>Vaccinium vitis-idaea folia</i>) | – | – | – |

Продолжение таблицы 51

| Образец | Cd | Pb | As |
|---|------|--------|----|
| Трава боровой матки (<i>Orthiliae secundae herbae</i>) | 9±4 | – | – |
| Трава зимолюбки (<i>Chimaphilae umbellatae herbae</i>) | 16±3 | – | – |
| Ферментированные листья бадана (Чигирский чай) (<i>Bergeniae crassifoliae folia fermentato</i> (ферментированные)) | 10±4 | 231±38 | – |
| Корневища бадана толстолистного (<i>Bergeniae crassifoliae rhizomata</i>) | 8±3 | 112±13 | – |
| Трава чистотела большого (<i>Chelidonii majoris herba</i>) | – | 144±23 | – |
| Листья шалфея лекарственного (<i>Salviae officinalis folia</i>) | – | – | – |
| Побеги багульника болотного (<i>Ledi palustris cormus</i>) | – | – | – |

* – Содержание аналита ниже ПО

Принимая во внимание ультранизкие содержания (нг/г) определяемых элементов и их крайне неравномерное распределение по объему даже измельченных природных образцов, можно уверенно утверждать, что данные, приведенные в Таблице 51, показывают удовлетворительную работоспособность методики. Наибольшее содержание кадмия отмечается в траве эрвы шерстистой (25 нг/г), в слоевищах ламинарии (21 нг/г), в траве фиалки (27 нг/г), свинца – в чигирском чае (231 нг/г), в траве мелиссы лекарственной (263 нг/г). Значительное количество мышьяка обнаружено только в слоевищах ламинарии (8481 нг/г). Тем не менее, во всех исследованных образцах содержание Cd, Pb, As не превышало установленных ГФ XIV норм.

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения кадмия, свинца, мышьяка (на уровне нг/г) методом ЭТААС. Коэффициенты вариации составляют 3,75 %, 1,07 %, 2,48 % для кадмия, свинца и мышьяка соответственно (относительная погрешность не превышает 7,0 %).

Методика

Для приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения применена температурная программа для разложения образцов аналогичная температурной программе использованной при определении элементов методом АЭС-ИСП (Таблица 52).

Таблица 52 – Программа кислотного разложения образцов субстанций растительного происхождения в условиях МВ-нагрева (аналогично АЭС-ИСП)

| <i>Этап</i> | <i>Время, мин</i> | <i>Температура, °С</i> |
|-------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 20 | 25°С→170 °С |
| 2 | 20 | 170 °С |
| 3 | 50 | 170°С→25 °С |

Для приготовления испытуемого раствора 0,30-0,50 г (точная навеска) субстанций растительного происхождения помещают в тефлоновые сосуды, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Сосуды тщательно укупоривают и помещают в МВ-печь. Разложение образцов ведут по программе, представленной в Таблице 52. Распечатывают сосуды и фильтруют содержимое в колбу объемом 100 мл через фильтровальную бумагу типа «Синяя лента», объем раствора доводят водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Для приготовления раствора сравнения в пустой тефлоновый сосуд прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Сосуды тщательно укупоривают и помещают в МВ-печь. Разложение образцов ведут по программе, представленной в Таблице 52. Распечатывают сосуды и фильтруют содержимое в колбу объемом 100 мл через фильтровальную бумагу типа «Синяя лента», объем раствора доводят водой до метки. Полученные растворы далее анализируют методом ЭТААС по описанной ниже методике. Раствор используют свежеприготовленным. Приготовление растворов модификаторов и стандартных растворов представлено в Таблицах 53, 54.

Таблица 53 – Приготовление стандартных растворов для количественного определения кадмия, свинца, мышьяка (на уровне нг/г) в ЛРС методом ЭТААС

| Тип раствора | Приготовление и применение* |
|-------------------------------|--|
| <i>Стандартный раствор 1</i> | 2 мл раствора СО состава ионов кадмия 1000 мг/л помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация кадмия 20 мкг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 2</i> | 1 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация кадмия 200 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 3</i> | 500 мкл стандартного раствора 2 помещают в мерную колбу, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация кадмия 10 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 4</i> | 2 мл раствора СО состава ионов свинца 1000 мг/л помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация свинца 20 мкг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 5</i> | 2,5 мл стандартного раствора 4 помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация свинца 500 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 6</i> | 2 мл раствора СО состава ионов мышьяка 1000 мг/л помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация мышьяка 20 мкг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 7</i> | 2,5 мл стандартного раствора 6 помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация мышьяка 500 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 8</i> | 1000 мкл стандартного раствора 3, 400 мкл стандартного раствора 5, 800 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 1 нг/мл, свинца – 20 нг/мл, мышьяка – 40 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 9</i> | 500 мкл стандартного раствора 3, 200 мкл стандартного раствора 5, 400 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 0,5 нг/мл, свинца – 10 нг/мл, мышьяка – 20 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 10</i> | 250 мкл стандартного раствора 3, 100 мкл стандартного раствора 5, 200 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 0,25 нг/мл, свинца – 5 нг/мл, мышьяка – 10 нг/мл) |
| <i>Стандартный раствор 11</i> | 100 мкл стандартного раствора 3, 50 мкл стандартного раствора 5, 100 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 0,1 нг/мл, свинца – 2,5 нг/мл, мышьяка – 5 нг/мл) |

*- все растворы используются свежеприготовленными

Таблица 54 – Приготовление растворов модификаторов для количественного определения кадмия, свинца, мышьяка (на уровне нг/г) в ЛРС методом ЭТААС

| Тип раствора | Приготовление и применение |
|------------------------------------|---|
| Раствор аскорбиновой кислоты (1 %) | 1 г аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу объемом 100 мл, прибавляют 70 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. |
| Раствор $Ni(NO_3)_2$ (1 %) | 1,6 г никеля (II) азотнокислого 6-водного помещают в мерную колбу объемом 100 мл, прибавляют 70 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают |

Последовательно вводят в графитовую печь атомизатора стандартные растворы 8-11, холостой и испытуемый растворы, а также одновременно растворы модификаторов объемом 10 мкл не менее 3 раз. По полученным калибровочным кривым определяют концентрацию каждого элемента в испытуемом растворе и растворе сравнения.

Содержание кадмия, свинца, мышьяка в ЛРС (X, ppb) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot (C - C_0)}{a},$$

где C – концентрация элемента в испытуемом растворе, найденная по калибровочной кривой, нг/мл;

C_0 – концентрация элемента в растворе сравнения, найденная по калибровочной кривой, нг/мл;

a – масса навески сырья, г.

Нормы, приведенные в ГФ XIV (1,0 мг/кг – для кадмия, 6,0 мг/кг – свинца, (0,5 мг/кг – мышьяка) могут быть рекомендованы для оценки качества субстанций природного происхождения. По результатам проведенных исследований подготовлен проект ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье» (см. Приложение Б).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Разработана унифицированная методика пробоподготовки ЛРС в условиях МВ-нагрева. Методика включает в себя нагрев в закрытой системе (тефлоновый сосуд) смеси субстанций природного происхождения и азотной кислоты с небольшой добавкой водорода пероксида для повышения окислительного потенциала системы. Полное разложение органической матрицы образца достигается за 20 минут при температуре 170 °С. Использование МВ-системы позволило существенно автоматизировать и ускорить процесс пробоподготовки к определению, а также исключить потери определяемых элементов, получить аналиты в форме наиболее удобной для последующего спектрального определения.

2. Предложена методика определения элементов, находящихся в ЛРС на макроуровне (мг/г), методом АЭС-ИСП. Сформулированы основные принципы выбора аналитических длин волн. На примере Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Sr, Zn продемонстрирована работоспособность методики, включающей предварительное кислотное разложение образца в условиях МВ-нагрева, посредством изучения специфичности, линейности, правильности, повторяемости. Показаны удовлетворительные метрологические характеристики (с учетом уровня содержаний и неравномерности распределения элементов в природном образце). Общность методики подтверждена анализом растительных объектов различных морфологических групп.

3. Разработана и валидирована методика количественного определения кремния (в пересчете на SiO_2) в траве хвоща полевого. В качестве метода пробоподготовки было использовано сплавление в платиновых тиглях. Для окрашивания применялся раствор аммония молибдата; полученный неустойчивый комплекс далее восстанавливался раствором, содержащим метол и натрия сульфит, до ярко синего устойчивого комплекса. Исследованы специфичность, линейность, правильность, повторяемость разработанной методики и показаны удовлетворительные метрологические характеристики. Адекватность методики

продемонстрирована анализом сырья травы хвоща полевого. Установлена норма содержания кремния в траве хвоща полевого (не менее 2 %).

4. Разработана методика определения следовых количеств (нг/г) Cd, Pb, As методом ЭТААС в растворах, полученных кислотным разложением растительных объектов в условиях МВ-нагрева. Во избежании потерь свинца и мышьяка на стадии термообработки было предложено использование модификаторов – аскорбиновой кислоты (для свинца), $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (для мышьяка). Исследованы специфичность, линейность, правильность, повторяемость и продемонстрированы удовлетворительные метрологические характеристики. Унифицированность методики подтверждена определением кадмия, свинца, мышьяка в ЛРС, относящимся к различным морфологическим группам. Подготовлен проект ФС для ГФ РФ (Приложение Б).

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ, БРОМИДОВ, ЙОДИДОВ МЕТОДОМ ИОНОМЕТРИИ

4.1. Определение нитратов и бромидов в субстанциях природного происхождения

При разработке ионометрических методик необходимо учитывать, что для удовлетворительной работы ионоселективных электродов необходима область рН от 2 до 10 в противном случае, будут наблюдаться явления разрушения полупроницаемых мембран электродов. Поэтому получаемые из ЛРС извлечения нуждаются в тщательном контроле величины рН перед помещением в испытуемый раствор ионоселективных электродов. Особенно чувствительны к изменению условий нитрат-селективные электроды, поскольку их селективная мембрана пропитана тонкой пленкой раствора электролита.

В ионометрии потенциал электрода зависит от активности заряженных форм аналита, присутствующего в водных растворах. При этом при малых концентрациях определяемого компонента активность пропорциональна концентрации.

Поскольку влияние ионной силы анализируемого раствора на величины коэффициента активности иона значительно, то и поддержание ее постоянства является необходимым условием получения адекватных результатов анализа. Обычно постоянство ионной силой обеспечивается добавкой фонового электролита. При этом желательно, чтобы фоновый электролит представлял собой раствор наиболее простых неорганических соединений, например одномолярные растворы средних солей, которые наиболее часто рекомендуются в ионометрии. В настоящей работе фоновыми электролитами служили растворы, рекомендованные производителем электродов: 1 М KNO_3 (для бромидов), 0,5 М Na_2SO_4 (для нитратов).

Процедура измерений заключалась в следующем: к 45 мл водных извлечений ЛРС прибавляли 5 мл соответствующего фонового электролита. Концентрации определяемых компонентов определяли по калибровочным графикам.

Водные извлечения получали следующим образом: к точно взвешенной навеске сырья (от 1,5 до 15 г, степень измельчения – 1 мм) прибавляли 200 мл воды, нагретой до температуры 90 °С и выдерживали 1 ч при комнатных условиях, фильтровали через фильтровальную бумагу типа «Белая лента».

Разработку методики определения бромидов и нитратов осуществляли на примере извлечений из плодов шиповника.

Поскольку извлечения из природных объектов характеризуются чрезвычайно сложным составом, то исследование специфичности при разработке ионометрической методики затруднено, так как аналитический сигнал выражается только в форме числа, характеризующего установившийся равновесный электродный потенциал высокоселективного индикаторного электрода относительно электрода сравнения. Так как индикаторные электроды в методе ионометрии проявляют высокую селективность по отношению к аналиту в присутствии наиболее широко распространенных в природе анионов – хлоридов, то принимается по умолчанию, что определение бромидов и нитратов специфично. В отличие от специфичности исследование линейности, правильности и повторяемости проводилось напрямую.

При исследовании линейности методики определения бромидов и нитратов готовили серии стандартных растворов бромидов и нитратов. Концентрации варьировались от 0,00001 до 0,1 моль/л согласно инструкции к прибору. Молярные концентрации автоматически пересчитывались прибором в концентрации, выраженные в мкг/мл.

В Таблицах 55 и 56 приведены значения стандартного электродного потенциала при измерении концентрации бромидов и нитратов в растворе.

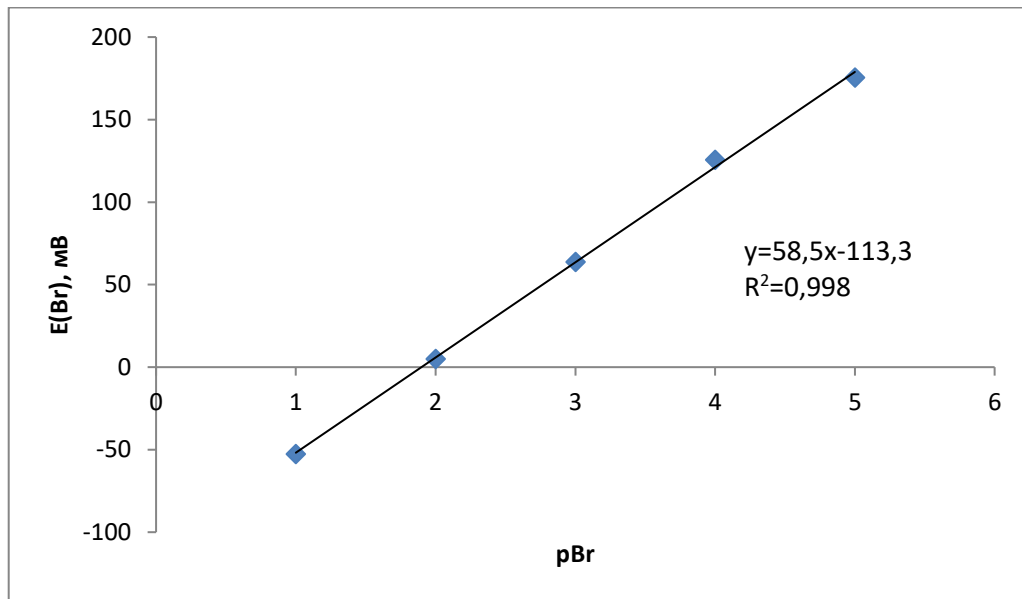
По значениям, представленным в Таблицах 55 и 56, были построены графики зависимости величины равновесного потенциала индикаторного электрода от р-функции (Рисунки 58-59).

Таблица 55 – Оценка линейности определения бромидов

| Аналитический сигнал | pBr | | | | |
|--|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | 1 (0,1 моль/л) | 2 (0,01 моль/л) | 3 (0,001 моль/л) | 4 (0,0001 моль/л) | 5 (0,00001 моль/л) |
| E, мВ | -57,5 | 3,50 | 66,4 | 123,7 | 175,1 |
| | -56,8 | 3,61 | 66,2 | 123,5 | 175,5 |
| | -58,3 | 3,40 | 66,5 | 123,9 | 174,1 |
| $E_{ср}$ | -57,5 | 3,5 | 66,4 | 123,7 | 174,9 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 1,30 | 3,00 | 0,23 | 0,16 | 0,41 |

Таблица 56 – Оценка линейности определения нитратов

| Аналитический сигнал | pNO_3 | | | | |
|--|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | 1 (0,1 моль/л) | 2 (0,01 моль/л) | 3 (0,001 моль/л) | 4 (0,0001 моль/л) | 5 (0,00001 моль/л) |
| E, мВ | 251,3 | 324,0 | 378,5 | 424,8 | 485,2 |
| | 248,3 | 327,1 | 374,9 | 425,4 | 489,1 |
| | 252,1 | 324,8 | 387,0 | 426,1 | 480,9 |
| $E_{ср}$ | 250,5 | 325,5 | 380,1 | 425,4 | 485,1 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 0,80 | 0,50 | 1,64 | 0,15 | 0,85 |

Рисунок 58 – Зависимость величины равновесного потенциала от p -функции для бромид-иона

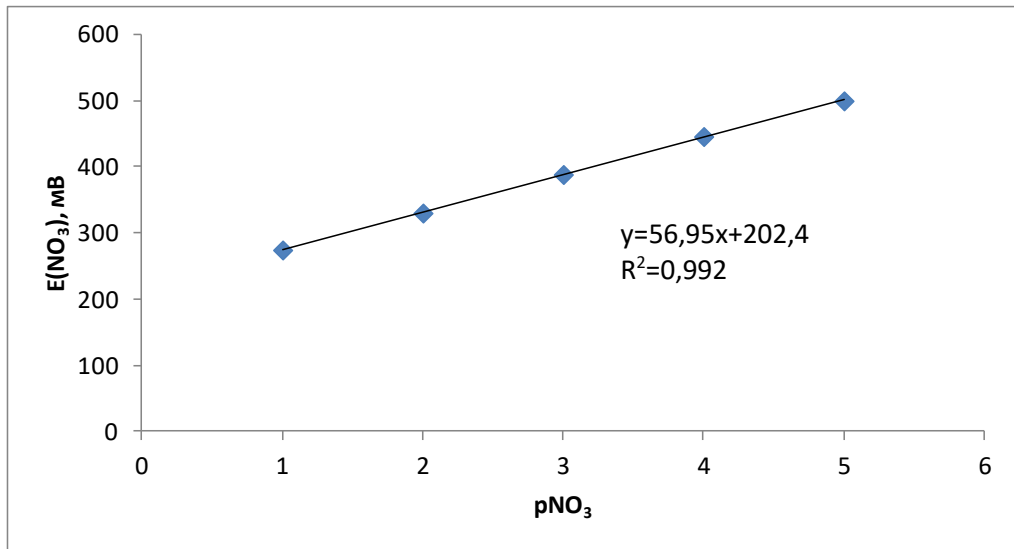


Рисунок 59 – Зависимость величины равновесного потенциала от р-функции для нитрат-иона

Из представленных данных видно, что аналитический сигнал прямо пропорционален р-функции аналита во всем рабочем диапазоне ионселективного электрода – коэффициенты корреляции, составляют 0,9990 для бромидов и 0,9960 для нитратов.

Правильность исследована методом добавок путем прибавления к испытываемому раствору точного объема раствора добавки. Результаты приведены в Таблице 57.

Таблица 57 – Правильность определения бромидов и нитратов методом ионометрии в плодах шиповника ([60] – данные автора)

| Анион | Содержание в образце, ррт | Введено, ррт | Найдено, ррт | Открываемость, % |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------|------------------|
| Br ⁻ | 3,5 | 25,0 | 27,0 | 108,0 |
| | | 50,0 | 52,5 | 105,0 |
| | | 250,0 | 252,2 | 100,9 |
| | | Среднее значение открываемости | | 104,6 |
| NO ₃ ⁻ | 137 | 250,0 | 395,0 | 158,0 |
| | | 535,0 | 680,2 | 127,1 |
| | | 1015,0 | 1165,0 | 114,8 |
| | | Среднее значение открываемости | | 133,3 |

Показано, что для бромидов в присутствии матричных компонентов извлечения наблюдается удовлетворительное согласование найденных значений концентраций с введенными. В тоже время установлено, что при определении нитратов рекомендуемый в качестве фонового электролита 0,5 М раствор натрия сульфата не позволяет достичь необходимых для количественного определения характеристик открываемости (95-105 %), однако может быть использован для полуколичественной оценки содержания нитратов в субстанциях растительного происхождения. Еще одной причиной получения недостаточно хороших результатов определения нитратов в водных извлечениях из ЛРС с помощью нитрат-селективного электрода кроется, по-видимому, в составе его полупроницаемой мембраны, содержащей жидкие ионообменные составляющие (органическая мембранная фаза), которые способны взаимодействовать с органическими компонентами извлечений, что приводит к необратимому загрязнению мембранной поверхности и, соответственно, порче электрода. Тем не менее, ионометрия может быть использована для полуколичественного определения содержания бромидов и нитратов в субстанциях природного происхождения. Результаты представлены в Таблице 58.

Видно, что рН полученных водных извлечений находится в диапазоне от 4,0 до 7,0 (область нормальной работы электродов); содержание нитратов колеблется в широких пределах, достигая максимума для слоевищ ламинарии (122,8 мг/г) и травы Melissa (101,0 мг/г); содержание бромидов крайне мало – наибольшее содержание наблюдалось для листьев подорожника большого (0,46 мг/г). Во всех остальных видах сырья содержание бромидов, как правило, не превышало 0,2 мг/г. Сравнение полученных в настоящей работе данных по содержанию нитратов в ЛРС с приведенными в литературе данными для наиболее обогащенных нитратами пищевых растений (2,0-4,5 мг/г для свежего салата, шпината, щавеля, капусты салатных сортов, петрушки, сельдерея, кинзы, укропа) [26], показало, что содержание нитратов в анализируемых образцах превышает нормы, установленные для пищевой промышленности.

Таблица 58 – Результаты оценки содержания бромидов и нитратов в ЛРС методом ионометрии ([52,57,60,64] – данные получены автором)

| Образец | pH водного извлечения | Содержание бромидов, мг/г | Содержание нитратов, мг/г |
|--|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Трава душицы обыкновенной (<i>Origani vulgaris herba</i>) | 5,89 | 0,06±0,01 | 28,6±0,91 |
| Трава горца птичьего (<i>Polygoni avicularis herba</i>) | 5,35 | 0,12±0,03 | 6,90±0,50 |
| Листья сенны (<i>Sennae folia</i>) | 5,83 | 0,17±0,03 | 18,9±1,42 |
| Кора дуба (<i>Quercus cortex</i>) | 4,73 | –* | 6,54±1,05 |
| Трава золототысячника (<i>Centaurii herba</i>) | 5,27 | 0,10±0,02 | 4,86±1,10 |
| Корни и корневища кровохлебки лекарственной (<i>Sanguisorbae officinalis</i>) | 4,37 | – | 85,5±1,11 |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inulae helenii rhizomata et radices</i>) | 5,70 | 0,07±0,02 | 3,35±0,07 |
| Цветки липы (<i>Tiliae flores</i>) | 5,62 | 0,04±0,01 | 1,22±0,04 |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaci officinalis radices</i>) | 5,40 | – | 4,13±0,98 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginis majoris folia</i>) | 5,50 | 0,46±0,09 | 4,77±0,74 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | 6,18 | 0,08±0,02 | 17,3±1,21 |
| Трава фиалки (<i>Violae herba</i>) | 5,32 | 0,10±0,02 | 22,0±0,55 |
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimi semina</i>) | 5,87 | – | 0,09±0,03 |
| Корни лопуха (<i>Arctii radices</i>) | 4,79 | 0,13±0,04 | 33,2±1,06 |
| Побеги багульника болотного (<i>Ledi palustris cormus</i>) | 4,92 | – | 1,62±0,25 |
| Цветки бессмертника песчаного (<i>Helichrysi arenarii flores</i>) | 5,53 | 0,06±0,01 | 1,32±0,13 |
| Листья березы (<i>Betulae folia</i>) | 5,28 | – | 20,9±0,07 |
| Листья ортосифона тычиночного (<i>Orthosiphonis staminei folia</i>) | 6,34 | 0,11±0,01 | 63,1±0,11 |

Продолжение таблицы 58

| Образец | pH водного извлечения | Содержание бромидов, мг/г | Содержание нитратов, мг/г |
|--|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Трава мелиссы лекарственной (<i>Melissae officinalis herba</i>) | 6,38 | 0,10±0,01 | 101,0±5,07 |
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginifarfarae folia</i>) | 5,64 | 0,10±0,03 | 86,0±1,73 |
| Плоды шиповника (<i>Rosae fructus</i>) | 4,78 | – | 0,15±0,03 |
| Листья шалфея лекарственного (<i>Salviae officinalis folia</i>) | 6,23 | 0,09±0,01 | 18,0±0,28 |
| Трава пустырника (<i>Leonuri herba</i>) | 6,07 | 0,07±0,01 | 13,9±0,21 |
| Цветки ромашки аптечной (<i>Chamomillae recutita flores</i>) | 5,82 | 0,12±0,03 | 1,64±0,01 |
| Трава чистотела большого (<i>Chelidonii majoris herba</i>) | 6,06 | 0,08±0,01 | 5,94±0,08 |
| Трава зверобоя (<i>Hyperici herba</i>) | 4,83 | – | 0,86±0,03 |
| Цветки пижмы обыкновенной (<i>Tanacetivulgaris flores</i>) | 5,20 | 0,09±0,01 | 13,5±0,17 |
| Трава эрвы шерстистой (<i>Aervae lanatae herba</i>) | 5,89 | 0,21±0,03 | 3,72±0,02 |
| Слоевница ламинарии (<i>Laminariae thalli</i>) | 6,35 | 3,76±0,02 | 122,8±0,20 |
| Листья толокнянки обыкновенной (<i>Arctostaphylos uvae-ursi folia</i>) | 4,61 | 0,05±0,01 | 22,2±0,09 |
| Листья брусники обыкновенной (<i>Vaccinii vitis-idaeae folia</i>) | 5,34 | – | 5,11±0,02 |
| Трава боровой матки (<i>Orthiliae secundae herbae</i>) | 5,30 | 0,21±0,07 | 14,5±0,22 |
| Трава зимолюбки (<i>Chimaphilae umbellatae herbae</i>) | 5,37 | 0,08±0,02 | 41,7±0,21 |
| Листья бадана ферментированные (Чигирский чай) (<i>Bergeniae crassifoliae folia fermentato (ферментированные)</i>) | 4,49 | 0,03±0,01 | 10,4±0,08 |
| Корневища бадана толстолистного (<i>Bergeniae crassifoliae rhizomata</i>) | 5,13 | 0,04±0,01 | 65,8±1,34 |

- содержание аналита ниже ПО

Сравнение с нормативами [26] уместно, поскольку иных требований по содержанию нитратов применительно к ЛРС в настоящее время не существует. В то же время необходимо учитывать, что разработанные требования относятся к свежему сырью (не высушенному). Более того, необходимо принимать во внимание, что количество суточного потребления листовых овощей/зелени обычно несравнимо больше рекомендованных доз лекарственных препаратов, изготовленных из ЛРС (в форме настоев, отваров, настоек, экстрактов); само ЛРС при этом непосредственно человеком не применяется.

4.2. Разработка методики определения йодидов в слоевищах ламинарии

Ионометрия – один из немногих методов, позволяющих определять элемент в определенной форме с высокой селективностью. Особенно пригодна ионометрия для определения йодидов, так как селективность определения галогенидов повышается в ряду: $F^- < Br^- < I^-$. Более того, при определении йодидов в качестве индикаторного используются твердотельные электроды, включающие химически и механически устойчивые кристаллические мембраны (например, изготовленные из Ag_2S), допированные AgI [51, 46, 322]. Такой тип ионоселективных электродов сохраняется в рабочем состоянии длительное время даже при анализе сложных природных объектов.

Сами кристаллические мембраны твердотельных ионселективных электродов отличаются очень высокой селективностью по отношению к иодидам. Это связано с тем, что селективность достигается за счет вакансионного механизма переноса заряда, при котором вакансии заполняются только определенным подвижным ионом (Ag^+), так как форма, размер, распределение заряда вакансии, соответствуют только определенному подвижному иону. В результате посторонние ионы (NO_3^- , ClO_4^- , SO_4^{2-} и многие другие), не дающие осадков с ионом Ag^+ , практически не влияют на потенциал такого электрода; ионы других галогенидов также не оказывают существенного влияния на аналитический сигнал определяемого компонента из-за существенной разницы в произведениях растворимости между AgI и $AgBr$, $AgCl$. Сказанное хорошо иллюстрируется

Таблицей 59, в которой представлены ориентировочные коэффициенты селективности, представляющие собой отношение произведения растворимости соли серебра определяемого элемента – йода к произведению растворимости серебряной соли мешающего компонента X [51].

Таблица 59 – Коэффициенты селективности ($K_{I/X}$) йодселективного твердотельного мембранного электрода [51]

| <i>Мешающий ион X</i> | $K_{I/X}$ |
|---|---------------------|
| Cl ⁻ | $6,6 \cdot 10^{-6}$ |
| Br ⁻ | $6,5 \cdot 10^{-5}$ |
| CN ⁻ | 0,34 |
| CO ₃ ²⁻ | $1,2 \cdot 10^{-4}$ |
| CrO ₄ ²⁻ | $3,7 \cdot 10^{-3}$ |
| S ₂ O ₃ ²⁻ | $7,1 \cdot 10^{-4}$ |

Из представленных данных видно, что селективность йодселективного электрода по отношению к аналиту в присутствии мешающих ионов чрезвычайно высока. Так, йодид определяется в 1000000 раз чувствительнее, чем хлорид – матричный ион, наиболее широко распространенный в природе, в том числе и в субстанциях растительного происхождения.

Несмотря на то, что слоевица бурых водорослей многоклеточные, строгая дифференцировка клеток по тканям, как у высших растений суши, отсутствует. Результатом этого является относительно равномерное распределение йодидов в клетках таллома и продемонстрировано в настоящей работе на примере изучения влияния степени измельчения слоевищ ламинарии на извлечение I. Данные приведены в Таблице 60.

Таблица 60 – Влияние степени измельчения слоевищ ламинарии (*Laminariae thalli*) на выход иодидов

| <i>Степень измельчения, мм</i> | $X(I), \%$ |
|--------------------------------|-----------------|
| 1 | $0,44 \pm 0,04$ |
| 2 | $0,46 \pm 0,03$ |
| 3 | $0,45 \pm 0,03$ |
| 5 | $0,45 \pm 0,02$ |

Данные, представленные в Таблице 60, позволяют сделать вывод о том, что влияние степени измельчения в исследуемом диапазоне на выход йодидов в водную фазу невелико. Полученные результаты могут быть также объяснены чрезвычайной гидрофильностью неорганической формы I по сравнению с органическими биологически активными соединениями, содержащимися в высших растениях, что и обуславливает легкость перехода аналита в извлечение.

При химическом анализе таллома ламинарии изучение влияния на извлечение йодидов таких показателей как: соотношение сырье:экстрагент, кратность экстракции затруднено вследствие особенностей применяемого физико-химического метода определения. При уменьшении объема экстрагента растет вязкость извлечения, что затрудняет установление равновесного мембранного потенциала и, как следствие, ухудшает правильность определения аналита; при увеличении объема экстрагента, а также разбавлении метрологические характеристики методики существенно ухудшаются – ошибка определения значительно возрастает и может превышать 10 %.

Так как бурые водоросли являются морскими фитоорганизмами, то при прибавлении воды к высушенному сырью происходит интенсивное поглощение последней растительными клетками, что влияет на конечный объем извлечения. Этот эффект необходимо учитывать при количественном определении йода в форме йодида в слоевищах ламинарии с помощью введения специального коэффициента (ϕ). Коэффициент ϕ определяли следующим образом: 5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в коническую колбу объемом 500 мл, прибавляли 200 мл воды с температурой 90 °С и выдерживали 1 ч при комнатных условиях. Полученное извлечение фильтровали через пять слоев марли в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, сырье отжимали, измеряли объем полученного извлечения. Далее рассчитывали ϕ как отношение воды, поглощенное сырьем к первоначальному количеству экстрагента.

В Таблице 61 приведены данные, отражающие определение коэффициента, учитывающего поглощение воды сырьем (ϕ).

Таблица 61 – Определение коэффициента поглощения воды (φ) слоевищами ламинарии (*Laminariae thalli*)

| Масса сырья, г | Объем извлечения, мл | φ | $\varphi_{ср}$ |
|----------------|----------------------|-----------|----------------|
| 5,0058 | 158 | 0,789 | 0,798 |
| 5,0081 | 158 | 0,789 | |
| 5,0065 | 162 | 0,809 | |
| 5,0045 | 162 | 0,809 | |
| 5,0018 | 160 | 0,800 | |
| 5,0049 | 158 | 0,789 | |

Таким образом, анализ полученных данных показывает, что коэффициент φ равен 0,798 – объем конечного извлечения отличается на 20 % от первоначального объема добавленного экстрагента.

В процессе разработки методики определения йодидов в слоевищах ламинарии были исследованы: линейность, правильность, повторяемость. Для этого был приготовлен испытуемый раствор: 5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в коническую колбу объемом 500 мл, прибавляли 200 мл воды с температурой 90 °С и выдерживали 1 ч при комнатных условиях, фильтровали через фильтровальную бумагу типа «Белая лента» или центрифугировали, полученный фильтрат или надосадочную жидкость оставляли на 24 ч и далее анализировали.

В качестве раствора сравнения использовали воду.

Линейность исследовали посредством последовательного измерения электродного потенциала стандартных растворов, pI которых изменяется от 1 до 5. В Таблице 62 приведены значения стандартного электродного потенциала.

По данным Таблицы 62 был построен график зависимости равновесного потенциала индикаторного электрода от p -функции (Рисунок 60).

Таблица 62 – Оценка линейности определения йодидов

| Аналитический сигнал | pI | | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Е, мВ | -283,1 | -220,8 | -159,1 | -98,2 | -39,3 |

Продолжение таблицы 62

| Аналитический сигнал | pI | | | | |
|--|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | -283,3 | -220,6 | -160,5 | -98,6 | -40,1 |
| | -283,0 | -221,1 | -157,8 | -96,8 | -38,6 |
| E_{cp} | -283,1 | -220,8 | -159,1 | -97,9 | -39,3 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 0,05 | 0,11 | 0,85 | 0,97 | 1,91 |

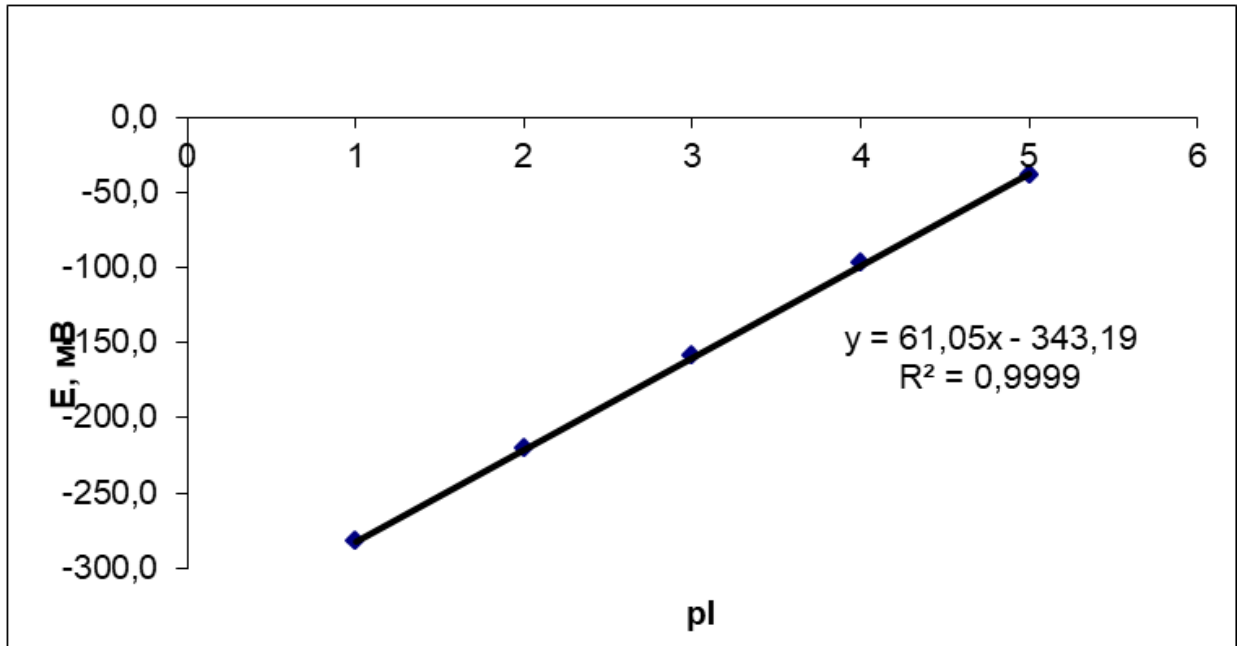


Рисунок 60 – Зависимость между p -функцией от равновесной концентрации йодидов и потенциалом электрода

Полученные результаты позволяют заключить, что аналитический сигнал (E) прямо пропорционально зависит от p -функции (pI) во всем рабочем диапазоне ионселективного электрода – коэффициент корреляции составляет более 0,9995.

Правильность определения йода в форме йодидов оценивали методом добавок, путем прибавления точного объема раствора добавки к испытуемому раствору. Проводили по три параллельных определения для каждой добавки. Показатель правильности оценивали путем расчета открываемости. Результаты определения правильности представлены в Таблице 63.

Таблица 63 – Правильность определения йода в форме иодидов в слоевищах ламинарии (*Laminariae thalli*) методом ионометрии

| Содержание иодида в извлечении, мкг/мл | Введено, мкг/мл | Рассчитанное содержание иодида, мкг/мл | Найдено, мкг/мл | Открываемость, % |
|--|-----------------|--|-----------------|------------------|
| 105,2 | 12,7 | 117,4 | 118,6 | 101,0 |
| | 12,4 | 117,6 | 118,3 | 100,6 |
| | 12,2 | 117,4 | 118,3 | 100,8 |
| | 38,8 | 144,0 | 147,6 | 102,5 |
| | 41,4 | 146,6 | 146,5 | 99,9 |
| | 43,1 | 148,3 | 147,7 | 99,6 |
| | 116,1 | 221,3 | 215,9 | 97,5 |
| | 119,2 | 224,4 | 221,1 | 98,5 |
| | 116,6 | 221,8 | 225,9 | 101,9 |
| Статистические характеристики | | | Результаты | |
| Наименьшее значение, % | | | 97,5 | |
| Наибольшее значение, % | | | 102,5 | |
| Среднее значение(\bar{X}), % | | | 100,0 | |
| Стандартное отклонение (s) | | | 1,58 | |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{x}}$) | | | 0,53 | |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{x},\%}$), % | | | 1,58 | |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | 1,22 | |

Из данных, приведенных в Таблице 63, следует, что правильность количественного определения йодидов для средней величины каждого из трех определений находится в диапазоне от 95,0 до 105,0 %, коэффициент вариации ($n = 9$) составляет 1,58 %. Изучение повторяемости проводилось путем количественного определения йодидов ($n = 6$) в анализируемом объекте. В Таблице 64 представлены метрологические результаты.

Таблица 64 – Оценка повторяемости методики количественного определения иодидов в слоевищах ламинарии (*Laminariae thalli*) ($n = 6$, P = 0,95)

| W, % | Содержание, % | X_{cp} , % | Станд. отклон. | Коэффициент вариации, % | Доверительный интервал |
|------|---------------|--------------|----------------|-------------------------|------------------------|
| 15 | 0,42 | 0,42 | 0,028 | 6,67 | 0,03 |
| | 0,47 | | | | |
| | 0,39 | | | | |
| | 0,40 | | | | |
| | 0,41 | | | | |
| | 0,43 | | | | |

Анализ данных, представленных в Таблице 64, показывает, что коэффициент вариации результатов количественного определения йодидов в талломе ламинарии ($n = 6$) составляет 6,67 %.

Проведенные исследования подтвердили, что количественное определение йодидов методом ионометрии с удовлетворительной точностью применимо в интервале содержаний от 0,03 до 209,4 мкг/мл определяемого компонента в испытуемом растворе; правильность, линейность, повторяемость, установлены для интервальных значений и значений внутри интервала: линейность (0,03-209,4 %), правильность (0,03-209,4 %), повторяемость (около 0,42 %).

Сравнение данных, полученных с помощью разработанной методики, с данными, приведенными в [201], а также с данными, полученными по методике, приведенной в ГФ XIV [7], представлено в Таблице 65.

Таблица 65 – Содержание йода в слоевищах ламинарии (*Laminariae thalli*)

| <i>Определение йода в форме йодидов по разработанной методике</i> | <i>Определение йода по титриметрической методике, приведенной в ГФ XIV</i> | <i>Данные, приведенные в [201] (НАА)</i> |
|---|--|--|
| 0,42±0,03 | 1,05±0,16 | 0,40 |

Результаты, приведенные в Таблице 65, свидетельствуют, что разработанная методика позволяет определять йод в форме йодидов с точностью, сравнимой с точностью нейтроно-активационного анализа. В тоже время полученный результат не совпадает с результатом, полученным с помощью титриметрической методики, приведенной в ГФ XIV, – он оказывается завышенным почти в 2,5 раза. Причина столь существенного расхождения заключается в том, что титруется не только неорганический йод в форме йодида, но йодид, полученный после сжигания йодорганических соединений, входящих в состав ламинарии.

Таким образом, была разработана и валидирована прямая ионометрическая методика определения йодидов в слоевищах ламинарии, которая позволяет

определять иодиды с относительной погрешностью 7,14 %, что обусловлено особенностями ионометрического метода.

Методика

Приготовление необходимых растворов и процедура определения коэффициента водопоглощения представлены в Таблице 66.

Таблица 66 – Приготовление раствора фонового электролита, стандартных и испытуемого растворов, определение коэффициента φ при определении йодидов в слоевищах ламинарии методом ионометрии

| <i>Этап</i> | <i>Описание этапа</i> |
|---|--|
| <i>Раствор фонового электролита</i> | 101 г (точная навеска) калия азотнокислого количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 600 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, объем раствора доводят до метки тем же растворителем, перемешивают |
| <i>Стандартный раствор 1</i> | 16,6 г (точная навеска) калия иодида, предварительно высушенного при температуре 105–110 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 600 мл воды, перемешивают, объем раствора доводят до метки тем же растворителем, перемешивают (концентрация $\Gamma 10^{-1}$ моль/л) |
| <i>Стандартный раствор 2</i> | 10 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводят до метки водой, перемешивают (концентрация $\Gamma 10^{-2}$ моль/л) |
| <i>Стандартный раствор 3</i> | 10 мл стандартного раствора 2 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводят до метки водой, перемешивают (концентрация $\Gamma 10^{-3}$ моль/л) |
| <i>Стандартный раствор 4</i> | 10 мл стандартного раствора 3 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводят до метки водой, перемешивают (концентрация $\Gamma 10^{-4}$ моль/л) |
| <i>Стандартный раствор 5</i> | 10 мл стандартного раствора 4 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводят до метки водой, перемешивают (концентрация $\Gamma 10^{-5}$ моль/л) |
| <i>Раствор сравнения</i> | Представляет собой воду, с помощью которой проводится извлечение Γ таллома ламинарии |
| <i>Испытуемый раствор</i> | 5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу объемом 500 мл, прибавляют 200 мл воды с температурой 90 °С и выдерживают 1 ч при комнатных условиях, фильтруют через фильтровальную бумагу типа «Белая лента» или центрифугируют, полученный фильтрат или надосадочную жидкость оставляют на 24 ч и далее анализируют |
| <i>Определение коэффициента, учитывающего поглощение воды сырьем (φ)</i> | 5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 3мм, помещают в коническую колбу объемом 500 мл, прибавляют 200 мл воды с температурой 90 °С и выдерживают 1 ч при комнатных условиях. Полученное извлечение фильтруют через пять слоев марли в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, сырье отжимают, измеряют объем полученного извлечения |

Рассчитывают коэффициент φ следующим образом:

$$\varphi = \frac{5 \cdot V}{200 \cdot m} = \frac{V}{40 \cdot m},$$

где V – объем полученного извлечения, мл;
 m – навеска слоевищ ламинарии, г.

Процедура инструментального определения аналитов представлена ниже.

К 45 мл стандартных и испытуемого растворов, а также раствора сравнения прибавляют 5 мл раствора фонового электролита и измеряют концентрацию иодидов в испытуемом растворе по калибровочному графику.

Содержание иодидов в ЛРС (X , %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(C - C_0) \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{1000000 \cdot a \cdot (100 - W)} \cdot \varphi = \frac{2 \cdot (C - C_0)}{a \cdot (100 - W)} \cdot \varphi, \text{ где}$$

где C – концентрация иодидов в анализируемом растворе, мкг/мл;
 C_0 – концентрация йодидов в растворе сравнения, мкг/мл;
 φ – коэффициент, учитывающий поглощение воды сырьем;
 a – масса навески, г;
 W – влажность сырья, %

Разработанная методика может быть полезна в тех случаях (в частности, в научных исследованиях), когда необходимо отдельно определять неорганическую, представленную преимущественно йодидами, и органическую формы йода. В этом случае можно рекомендовать следующую процедуру: сначала определяется общий йод по титриметрической методике, рекомендованной в ГФ XIV, затем определяются йодиды по разработанной в настоящей работе ионометрической методике; органический йод вычисляется как разность между содержанием общего йода и содержанием йодидов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Исследованы возможности ионометрии для определения бромидов и нитратов в водных извлечениях, полученных из ЛРС. Установлено, что использование растворов 1 М KNO_3 (для бромидов) и 0,5 М Na_2SO_4 (для нитратов), наиболее часто рекомендуемых производителями

соответствующих ион-селективных электродов в качестве фоновых электролитов, не позволяет получать результаты количественного анализа с удовлетворительной точностью. Тем не менее, использование бромид- и нитрат-селективных электродов в сочетании с указанными фоновыми электролитами позволяют получать полуколичественные оценки о содержании определяемых компонентов в водных извлечениях.

2. Полуколичественная оценка содержания бромидов в субстанциях растительного происхождения, показала, что их содержание в исследуемом сырье невелико и не превышает 0,46 мг/г. По этой причине исследованное сырье не может быть источником бромидов, т.е. обладать седативными свойствами. Содержание потенциально опасных нитратов во всех типах ЛРС значительно превышало нормы, установленные для пищевой промышленности. Однако нормы в пищевой промышленности даны к свежему сырью, которое используется в пищу неограниченно, в нашем случае высушенное ЛРС, из которого готовят в основном водные извлечения и применяют дозированно.
3. Поскольку йодид-селективный электрод отличается наибольшей селективностью по отношению к аналиту среди электродов для определения галогенидов, он в сочетании с рекомендуемым производителем раствором 1 М KNO_3 в качестве фонового электролита может быть использован для разработки методики количественного определения йодидов в слоевищах ламинарии. Для этого проводили извлечение йодидов горячей водой из растительного материала, определяли, количество воды, поглощенное сырьем, определяли количество йодидов в извлечении и пересчитывали на сырье с учетом коэффициента водопоглощения. Исследовали линейность, правильность, повторяемость разработанной методики. Показано, что разработанная методика имеет удовлетворительные метрологические характеристики.

ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

5.1. Разработка спектрофотометрической методики определения суммы восстанавливающих сахаров

Разработка спектрофотометрической методики определения суммы восстанавливающих сахаров (на основе метода Дюбуа) проведена на примере слизесодержащего сырья – листьев мать-и-мачехи обыкновенной. В качестве стандарта использовали раствор глюкозы, поскольку в состав слизи преимущественно входят гексозы в форме пираноз [35]. Далее под словом «пиранозы» будут указаны образующиеся после кислотного гидролиза сахара, подобные по структуре глюкозе (преобладание в растворе пиранозной формы), под словом «фуранозы» - сахара, подобные по структуре фруктозе (преобладание в растворе фуранозной формы).

Предварительными экспериментами было продемонстрировано влияние концентрации фенола на аналитический сигнал определяемого компонента. Данные представлены в Таблице 67.

Таблица 67 – Влияние концентрации фенола на оптическую плотность (A) ([59] – данные, полученные автором)

| <i>Концентрация фенола, %</i> | <i>A</i> |
|-------------------------------|----------|
| 2,5 | 0,443 |
| 5,0 | 0,445 |
| 6,0 | 0,335 |
| 8,0 | 0,371 |

Данные, приведенные в Таблице 67, свидетельствуют, что при концентрации фенола выше 5 % происходит уменьшение оптической плотности

примерно на 20 %. Таким образом, концентрация фенола в растворе для окрашивания не должна превышать 5 %.

Было установлено (см. Таблицы 72, 73), что для листьев мать-и-мачехи обыкновенной наиболее оптимальными были следующие условия извлечения/гидролиза определяемых веществ из ЛРС: степень измельчения 5 мм, соотношение сырье:экстрагент 1:20, время извлечения 60 мин, кратность 2.

«Для получения испытуемого раствора отвешивали около 2,0 г (точная навеска) листьев мать-и-мачехи, измельченных до размера частиц, проходящих через отверстия 5 мм, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли воду очищенную, объемом 40 мл, 7 мл кислоты хлористоводородной концентрированной и помещали на кипящую водяную баню с обратным холодильником. Извлечение вели в течении 60 мин. Колбу охлаждали до комнатной температуры под струей холодной воды» (Дул В. Н., 2014, Приложение Г). Содержимое колбы пропускали через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл, марлю отжимали, помещали в коническую колбу и повторно проводили извлечение. Объем раствора доводили водой до метки. Полученное извлечение пропускали через фильтровальную бумагу «Синяя лента».

«Далее 1 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл; объем раствора доводили водой очищенной до метки (раствор А).

Стандартный раствор был приготовлен следующим образом: 0,1 г (точная навеска) СО глюкозы помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 60 мл воды очищенной, перемешивали до растворения, объем раствора доводили до метки тем же растворителем. Далее, 1,25 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем доводили до метки водой очищенной (раствор В)» (Раменская Г. В., 2021, Приложение Г).

Раствор сравнения готовился аналогично испытуемому раствору за исключением того, что навеска образца не прибавлялась.

Для проведения окрашивания использовали три пробирки вместимостью 15 мл. В первую пробирку прибавляли 1 мл раствора А, во вторую – 1 мл раствора В,

а в третью – 1 мл раствора сравнения, в каждую пробирку последовательно прибавляли по 1 мл раствора фенола 5 %, по 5 мл кислоты серной концентрированной. Все три пробирки с содержимым перемешивали, «охлаждали под струей холодной воды и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. Оптическую плотность полученных растворов первой и второй пробирок измеряли на спектрофотометре при длине волны 487 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали содержимое третьей пробирки» (Дул В. Н., 2014, Приложение Г).

Для оценки специфичности методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров были получены УФ/ВИД-спектры раствора сравнения (Рисунок 61), стандартных растворов, используемых при исследовании линейности (Рисунок 62), и испытуемого раствора (Рисунок 63).

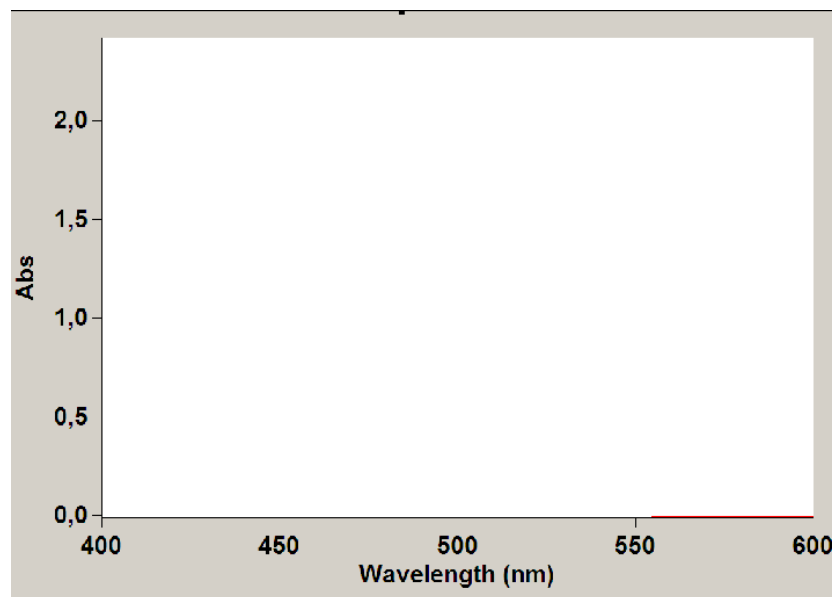


Рисунок 61 – Типичный УФ/ВИД-спектр раствора сравнения

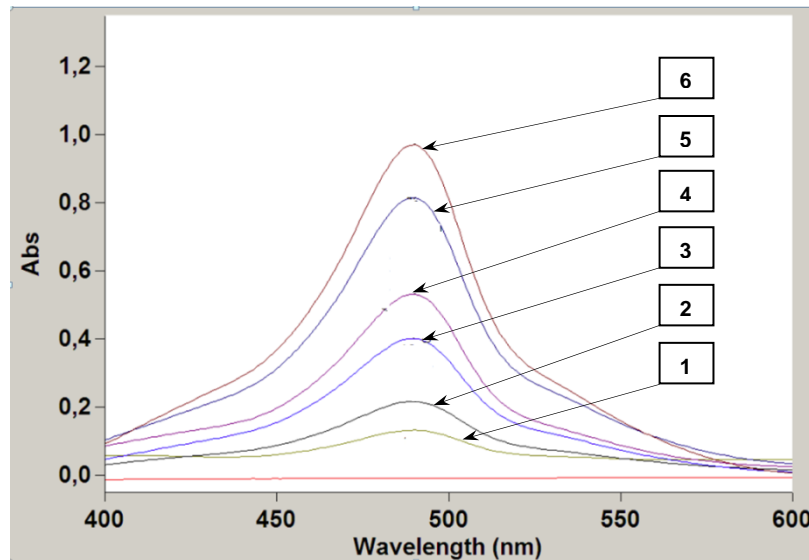


Рисунок 62 – Типичные УФ/ВИД-спектры стандартных растворов (1 – 10 мкг/мл, 2 – 20 мкг/мл, 3 – 40 мкг/мл, 4 – 50 мкг/мл, 5 – 80 мкг/мл, 6 – 100 мкг/мл)

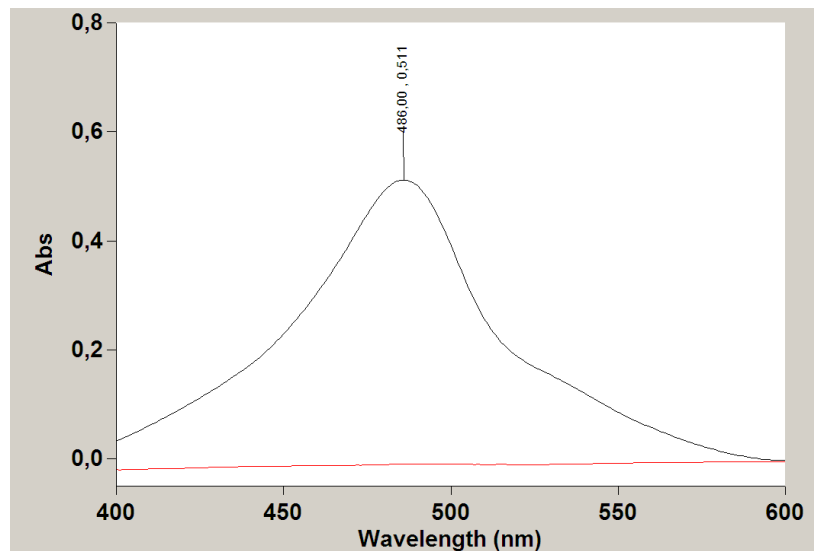


Рисунок 63 – Типичный УФ/ВИД-спектр испытуемого раствора

На спектрах стандартных и испытуемого растворов (Рисунок 61-63) присутствует максимум поглощения на длине волны 487 нм. На спектре раствора сравнения (Рисунок 61) какие-либо максимумы поглощения отсутствуют. Последнее свидетельствует об отсутствии влияния компонентов реакционной смеси на результаты количественного определения. Результаты исследования специфичности методики представлены в Таблице 68.

Таблица 68 – Специфичность методики определения суммы восстанавливающих сахаров

| Измерение | Стандартный раствор | Испытуемый раствор | Совпадение, % |
|-----------|-------------------------------|--------------------|---------------|
| | Длина волны (λ), нм | | |
| 1 | 487,0 | 486,0 | 99,8 |
| 2 | 487,0 | 488,0 | 100,2 |
| 3 | 487,0 | 489,0 | 100,4 |

Из представленных в Таблице 68 данных видно, что максимумы поглощения находятся при 487 ± 5 нм и совпадают с точностью более 99 %.

Для определения линейности методики была приготовлена серия растворов СО глюкозы в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл. Данные по изменению оптических плотностей при изменении концентрации глюкозы представлены в Таблице 69.

Таблица 69 – Оценка линейности определения глюкозы

| № | A_1 | A_2 | A_3 | $A_{cp.}$ | $C, \text{ мкг/мл}$ |
|---|-------|-------|-------|-----------|---------------------|
| 1 | 0,095 | 0,094 | 0,095 | 0,094 | 10 |
| 2 | 0,201 | 0,200 | 0,202 | 0,201 | 20 |
| 3 | 0,413 | 0,413 | 0,416 | 0,414 | 40 |
| 4 | 0,520 | 0,517 | 0,518 | 0,518 | 50 |
| 5 | 0,852 | 0,850 | 0,859 | 0,854 | 80 |
| 6 | 1,105 | 1,104 | 1,105 | 1,105 | 100 |

По полученным данным был построен график, отражающий зависимость оптической плотности от концентрации глюкозы (Рисунок 64).

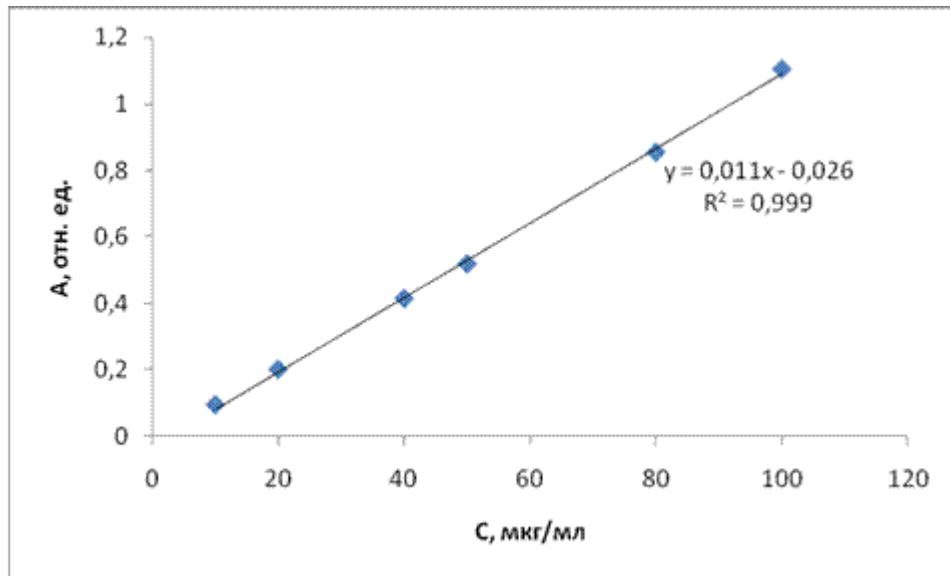


Рисунок 64 – Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации глюкозы в растворе (коэффициент корреляции $r = 0,9995$)

Значение коэффициентов корреляции для линейной зависимости составляет 0,9995, что подтверждает линейность методики в области от 5 до 100 мкг/мл сахаров в испытуемом растворе.

Правильность методики доказывали методом добавок путем добавления известного количества глюкозы. Проводили по три параллельных определения для каждой добавки. Показатель правильности оценивали путем расчета открываемости. Результаты определения правильности представлены в Таблице 70.

Таблица 70 – Правильность определения суммы восстанавливающих сахаров в листьях мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilaginis farfarae folia*) ($A = 0,217$ отн. ед.)*

| Концентрация раствора добавки, мкг/мл | Оптическая плотность добавки, отн. ед. | Ожидаемая оптическая плотность, отн. ед. | Найдено, отн. ед. | Открываемость, % |
|---------------------------------------|--|--|-------------------|------------------|
| 20,0 | 0,172 | 0,389 | 0,402 | 103,3 |
| 20,0 | 0,174 | 0,390 | 0,404 | 103,6 |
| 20,0 | 0,172 | 0,392 | 0,403 | 102,8 |
| 50,0 | 0,484 | 0,701 | 0,760 | 108,4 |
| 50,0 | 0,482 | 0,699 | 0,758 | 108,4 |
| 50,0 | 0,484 | 0,701 | 0,760 | 108,4 |

Продолжение таблицы 70

| | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------------------|
| 70,0 | 0,678 | 0,895 | 0,862 | 96,3 |
| 70,0 | 0,679 | 0,896 | 0,866 | 97,2 |
| 70,0 | 0,674 | 0,891 | 0,865 | 97,1 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты</i> |
| Наименьшее значение, % | | | | 96,3 |
| Наибольшее значение, % | | | | 108,4 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 102,4 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 5,01 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{x}}$) | | | | 1,67 |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{x},\%}$), % | | | | 4,89 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 3,86 |
| Примечание. *- в скобках приведены данные для суммы свободных сахаров и полисахаридов, содержащимся в извлечении из листьев мать-и-мачехи, разбавленного в два раза | | | | |

Результаты, представленные в Таблице 70, свидетельствуют, что правильность находится в диапазоне от 95,0 до 105,0 %, коэффициент вариации составляет 4,89 %.

Результаты по определению повторяемости приведены в Таблице 71.

Таблица 71 – Оценка повторяемости методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в листьях мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilaginifarfaraefolia*) (n = 6, P = 0,95)

| A | W, % | Содержание, % | \bar{X} , % | Станд. Отклон. | Коэффициент вариации,% | Доверительный интервал |
|--|---------|------------------|------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,647 | 13 | 28,7 | 29,0 | 1,47 | 5,07 | 1,54 |
| 0,627 | | 27,8 | | | | |
| 0,700 | | 31,0 | | | | |
| 0,624 | | 27,7 | | | | |
| 0,713 | | 31,6 | | | | |
| 0,640 | | 28,4 | | | | |
| <i>CO</i> | | | | | | <i>A₀</i> |
| 1 | | | | | | 0,650 |
| 2 | | | | | | 0,654 |
| 3 | | | | | | 0,653 |
| 4 | | | | | | 0,650 |
| 5 | | | | | | 0,651 |
| Среднее значение | | | | | | 0,652 |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{x},\%}$), % | | | | | | 0,28 |

Данные, представленные в Таблице 71, показывают, что коэффициент вариации результатов количественного определения восстанавливающих сахаров в листьях мать-и-мачехи обыкновенной ($n = 6$) составляет 5,07 %.

Для фураноз наблюдается аналогичная картина, что дает возможность использовать фруктозу в качестве СО для определения углеводов в растительном сырье, содержащего преимущественно пентозы и инулин.

Очевидно, что методика позволяет давать адекватные результаты и применима в интервале концентраций от 10 до 100 мкг/мл аналитов в испытуемом растворе.

Разработанная методика была использована для определения суммы восстанавливающих сахаров в ЛРС различных морфологических групп, содержащих аналиты как в форме гексоз, так и в форме пентоз.

Так, было исследовано влияние степени измельчения ЛРС на извлечение аналитов (Таблица 72).

Таблица 72 – Влияние степени измельчения растительного материала на извлечение суммы восстанавливающих сахаров (X, %) ([58] – данные, полученные автором)

| Субстанция растительного происхождения | СО | Измельченность, мм | | | |
|---|----------|--------------------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 5 |
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginifarfaraefolia</i>) | глюкоза | 15,9±1,9 | 19,2±2,5 | 19,8±1,9 | 24,4±2,7 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginimajorisfolia</i>) | глюкоза | 24,2±3,1 | 23,6±2,4 | 21,4±2,9 | 19,3±2,1 |
| Цветки липы (<i>Tiliaeflores</i>) | глюкоза | 38,4±5,9 | 39,6±4,6 | 38,8±5,2 | 37,2±5,8 |
| Трава фиалки (<i>Violaeherba</i>) | глюкоза | 32,0±4,2 | 29,5±3,6 | 30,3±3,5 | 28,4±2,7 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | глюкоза | 66,3±5,4 | 55,8±5,1 | 59,2±4,8 | 56,1±5,4 |
| Корни лопуха (<i>Arctiiradices</i>) | фруктоза | 19,8±2,4 | 18,2±1,8 | 14,7±1,6 | 13,0±1,6 |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaciofficinalisradices</i>) | фруктоза | 39,4±2,7 | 31,7±2,8 | 34,0±1,7 | 34,3±2,0 |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inulaehelenii rhizomata et radices</i>) | фруктоза | 25,5±3,5 | 18,2±2,4 | 14,7±1,9 | 15,9±2,3 |

Как видно из представленных в Таблице 72 данных, наиболее высокое извлечение сахаров наблюдается при степени измельчения 1 мм для всех типов

сырья, за исключением листьев мать-и-мачехи обыкновенной, для которой наиболее оптимальна степень измельчения 5 мм. Семена льна не были исследованы по этому показателю, поскольку при измельчении данного материала возрастает риск перехода жирных масел и белковых веществ, содержащихся внутри семян, в извлечение, что может приводить к ошибкам при последующем определении [327]. Полученные данные были использованы далее для определения влияния соотношения массы сырья к объему экстрагента на выход аналитов.

Результаты исследования влияния соотношения массы сырья к объему экстрагента на выход определяемых веществ представлены в Таблице 73.

Данные, представленные в Таблице 73, свидетельствуют, что наилучшее извлечение суммы восстанавливающих сахаров наблюдается при соотношении сырье:экстрагент 1:20 для листьев мать-и-мачехи обыкновенной, листьев подорожника большого, травы фиалки, корней алтея, 1:40 для цветков липы и семян льна посевного, 1:55 для корней лопуха, корней одуванчика лекарственного, корней и корневищ девясила высокого. При спектрофотометрическом определении сахаров, входящих в состав сырья, рекомендованного к медицинскому применению, наибольшая полнота перехода определяемых веществ в извлечение наблюдается при двукратной экстракции в течение 30–60 мин на каждой стадии [68].

Таблица 73 – Влияние соотношения массы сырья к объему экстрагента на извлечение суммы восстанавливающих сахаров (X, %) ([58] – данные, полученные автором)

| Субстанция | СО | Степень измельчения, мм | Сырье:экстрагент | | | |
|---|---------|-------------------------------|------------------|----------|----------|----------|
| | | | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 40 | 1 : 55 |
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginifarfarae folia</i>) | глюкоза | 5 | 17,1±1,3 | 25,2±2,4 | 24,9±1,9 | 22,2±1,7 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginismajoris folia</i>) | глюкоза | 1 | 25,4±2,2 | 27,1±2,5 | 18,2±1,8 | 18,0±2,0 |
| Цветки липы (<i>Tiliaeflores</i>) | глюкоза | 1 | 33,1±3,5 | 34,2±4,4 | 41,6±5,1 | 41,9±4,8 |

Продолжение таблицы 73

| | | | | | | |
|---|----------|---|----------|----------|----------|----------|
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimi semina</i>) | глюкоза | 1 | 27,6±3,0 | 24,4±1,8 | 35,1±3,2 | 30,0±2,7 |
| Трава фиалки (<i>Violae herba</i>) | глюкоза | 1 | 29,1±2,4 | 34,7±1,7 | 31,6±2,0 | 29,7±2,3 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | глюкоза | 1 | 48,3±1,9 | 51,2±1,7 | 52,4±1,6 | 49,0±1,9 |
| Корни лопуха (<i>Arctii radices</i>) | фруктоза | 1 | 6,30±1,0 | 19,2±2,0 | 37,1±3,1 | 43,0±3,4 |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaci officinalis radices</i>) | фруктоза | 1 | 18,3±2,2 | 40,0±4,2 | 45,3±1,7 | 46,2±1,9 |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inulae helenii rhizomata et radices</i>) | фруктоза | 1 | 21,4±2,5 | 36,9±3,4 | 43,0±2,7 | 48,4±1,9 |

Повторные исследования субстанций растительного происхождения показывали, что разработанная методика может быть использована для ЛРС различных морфологических групп (Таблица 74).

Установлено (Таблица 74), что наибольшее количество суммы восстанавливающих сахаров (в форме пентоз) содержится в корнях и корневищах девясила (46,1 %). Наибольшее содержание гексоз наблюдается в цветках липы (47,8 %).

Таблица 74 – Содержание суммы восстанавливающих сахаров (X, %) в субстанциях растительного происхождения

| Образец | СО | Влажность, % | X, % |
|---|----------|--------------|----------|
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginis farfarae folia</i>) | глюкоза | 13 | 29,0±2,4 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginis majoris folia</i>) | глюкоза | 14 | 31,5±2,5 |
| Цветки липы (<i>Tiliae flores</i>) | глюкоза | 13 | 47,8±5,1 |
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimi semina</i>) | глюкоза | 13 | 40,4±3,2 |
| Трава фиалки (<i>Violae herba</i>) | глюкоза | 14 | 40,4±1,7 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | глюкоза | 14 | 39,7±1,7 |
| Корни лопуха (<i>Arctii radices</i>) | фруктоза | 14 | 45,0±3,4 |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaci officinalis radices</i>) | фруктоза | 14 | 45,8±1,9 |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inulae helenii rhizomata et radices</i>) | фруктоза | 13 | 46,1±1,9 |

Методика

Приготовление стандартного, испытуемого растворов и раствора сравнения представлены в Таблице 75.

Таблица 75 – Приготовление раствора реагента, стандартного, испытуемого растворов и раствора сравнения при количественном определении суммы восстанавливающих сахаров в ЛРС методом УФ/ВИД-спектрофотометрии

| <i>Этап</i> | <i>Описание этапа</i> |
|----------------------------|---|
| <i>Раствор фенола 5 %</i> | Около 5 г (точная навеска) кристаллического фенола помещают в термостойкий стакан и подогревают, к полученной жидкости прибавляют 80 мл воды очищенной, перемешивают до полного растворения навески и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Доводят объем раствора в колбе <u>водой</u> очищенной до метки и перемешивают |
| <i>Испытуемый раствор</i> | Около 2,0 г (точная навеска) растительного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют воду очищенную, объем которой должен быть прописан в соответствующей фармакопейной статье и исходя из соотношения <u>сырье:экстрагент</u> , 7 мл кислоты хлористоводородной концентрированной и помещают на кипящую водяную баню с обратным холодильником. Извлечение ведут в течении 60 мин. Колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды. Содержимое колбы пропускают через пять слоев марли в мерную колбу, вместимость которой должна быть указана в соответствующей фармакопейной статье, марлю отжимают, помещают в коническую колбу и повторно проводят извлечение. Полученное извлечение пропускают через фильтровальную бумагу «Синяя лента». 1 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл; объем раствора доводят <u>водой</u> очищенной до метки (раствор А) |
| <i>Стандартный раствор</i> | Около 0,1 г (точная навеска) СО глюкозы или фруктозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 60 мл воды очищенной, перемешивают до растворения, объем раствора доводят до метки тем же растворителем (раствор Б). 1,25 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем доводят до метки водой очищенной (раствор В). При определении гексоз в качестве СО используют глюкозу, при определении пентоз (для <u>инулинсодержащего сырья</u>) – фруктозу. |
| <i>Раствор сравнения</i> | Готовится аналогично испытуемому раствору за исключением того, что навеска образца не прибавлялась |

Процедура окрашивания представлена ниже.

Для определения используют три пробирки вместимостью 15 мл.

В первую пробирку прибавляют 1 мл раствора А, во вторую – 1 мл раствора В, а в третью – 1 мл раствора сравнения, в каждую пробирку последовательно прибавляют по 1 мл раствора фенола 5 %, по 5 мл кислоты серной концентрированной.

Все три пробирки с содержимым перемешивают, охлаждают под струей холодной воды и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин.

Оптическую плотность полученных растворов первой и второй пробирок измеряют на спектрофотометре при длине волны 487 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве раствора сравнения используют содержимое третьей пробирки.

Содержание суммы сахаров и полисахаридов в ЛРС (X , %) в пересчете на глюкозу или фруктозу вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1,25 \cdot V_k \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 \% = \frac{A \cdot a_0 \cdot 5 \cdot V_k \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где a – навеска растительного материала, г;

a_0 – навеска СО глюкозы или фруктозы, г;

V_k – объем мерной колбы с извлечением, мл;

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

P – содержание основного вещества в СО, %;

W – влажность сырья, %.

Таким образом, разработана и валидирована методика, которая позволяет определять сумму восстанавливающих сахаров с удовлетворительной точностью – относительная погрешность не превышает 5 %. Нормы, установленные в ГФ XIV для ЛРС (не менее 2,0 % для цветков липы, не менее 10,0 % для листьев мать-и-мачехи), в которых нормативной документацией рекомендовано определение суммы восстанавливающих сахаров (с пикриновой кислотой) могут быть рекомендованы и при определении аналитов с фенолом (по методу Дюбуа). Сопоставляя данные по содержанию определяемых веществ в цветках липы, приведенные в настоящей работе (47,8 %), с данными, имеющиеся в литературе (31,2 %) [73], можно заключить, что норма, которая приведена в ГФ XIV, нуждается в пересмотре – это будет темой дальнейших исследований.

По результатам проведенных исследований подготовлена ОФС «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом».

5.2. Квантово-химическое исследование спектрофотометрической методики определения сахаров

Из литературных данных известно, что в результате дегидратации молекулы сахаров образуются гидроксильные производные фурфурола, которые далее реагируя с молекулами фенола, образуют ярко окрашенные соединения [138]. Механизм этой реакции полностью не изучен. Обычно эта реакция записывается, либо с углеводами, находящимися в открытой форме, либо в пиранозной форме. В данном случае нас интересовал возможный механизм протекания этой реакции (с точки зрения квантовой механики) с использованием фуранозной формы сахаров. Проходящие процессы теоретически можно выразить схемой, представленной на Рисунке 65 на примере фруктозы.

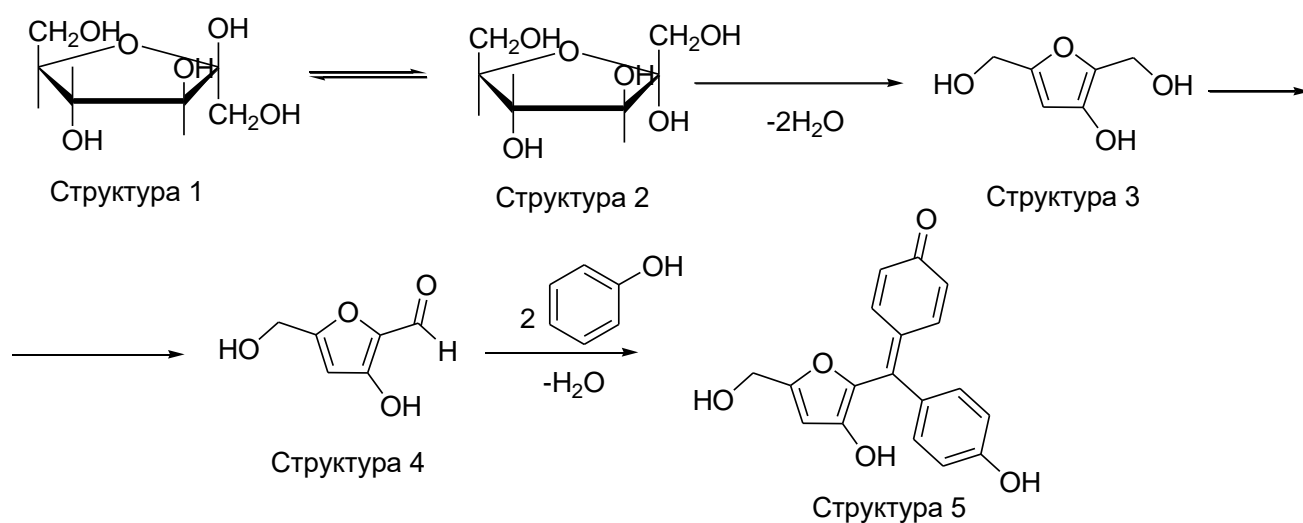


Рисунок 65 – Предполагаемая схема образования (5)

На первом этапе молекула фруктозы (1) эпимеризируется, давая (2). Такая взаимная ориентация водородов и гидроксильных групп делает возможным протекание реакции дегидратации (2) в среде концентрированной серной кислоты, что приводит к образованию метоксигидроксифурфурола (3). Далее (3) окисляется до альдегида (4), который за счет частичного положительного заряда на атоме углерода карбонильной группы вступает в реакцию нуклеофильного присоединения с двумя молекулами фенола (по пара-положению), давая

окрашенный продукт (5). Проведенный термодимический расчет подтверждает выгодность такой схемы (Таблица 76).

Таблица 76 – Рассчитанные термодимические параметры

| Соединение | H_f^0, Eh | $C_v^{**}, \text{Дж/моль}\cdot\text{K}$ | $S^{***}, \text{Дж/моль}\cdot\text{K}$ |
|------------|--------------------|---|--|
| 1 | -687,0 | 199,3 | 455,8 |
| 2 | -687,0 | 202,0 | 461,0 |
| 3 | -534,2 | 151,9 | 412,6 |
| 4 | -533,0 | 140,4 | 398,8 |
| 5 | -1070,2 | 321,5 | 615,8 |

Примечание.

* H_f^0 – стандартная энтальпия образования (Sum of electronic and thermal enthalpies); ** C_v – молярная теплоемкость при постоянном объеме; *** S – стандартная энтропия образования

График изменения стандартных теплот образования (величина обратная по знаку стандартной энтальпии образования), построенный по данным Таблицы 76, представлен на Рисунке 66.

Действительно, разница в значениях стандартных теплот образования молекул 1, 2 не превышает по модулю 0,01 Eh, что указывает на легкость перехода между (1) и (2). В то же время обращает на себя внимание повышенная стабильность соединения (5) – при его образовании выделяется наибольшее количество теплоты по сравнению со всеми изученными соединениями ($-H_f^0 = 1070,2 \text{ Eh}$). Как и следовало ожидать, из всех изученных соединений наименее стабильны спирт (3) ($-H_f^0 = 534,2 \text{ Eh}$) и альдегид (4) ($-H_f^0 = 533,0 \text{ Eh}$), который в кислых условиях легко реагирует с нуклеофильной частицей (фенолом) с образованием красителя (5).

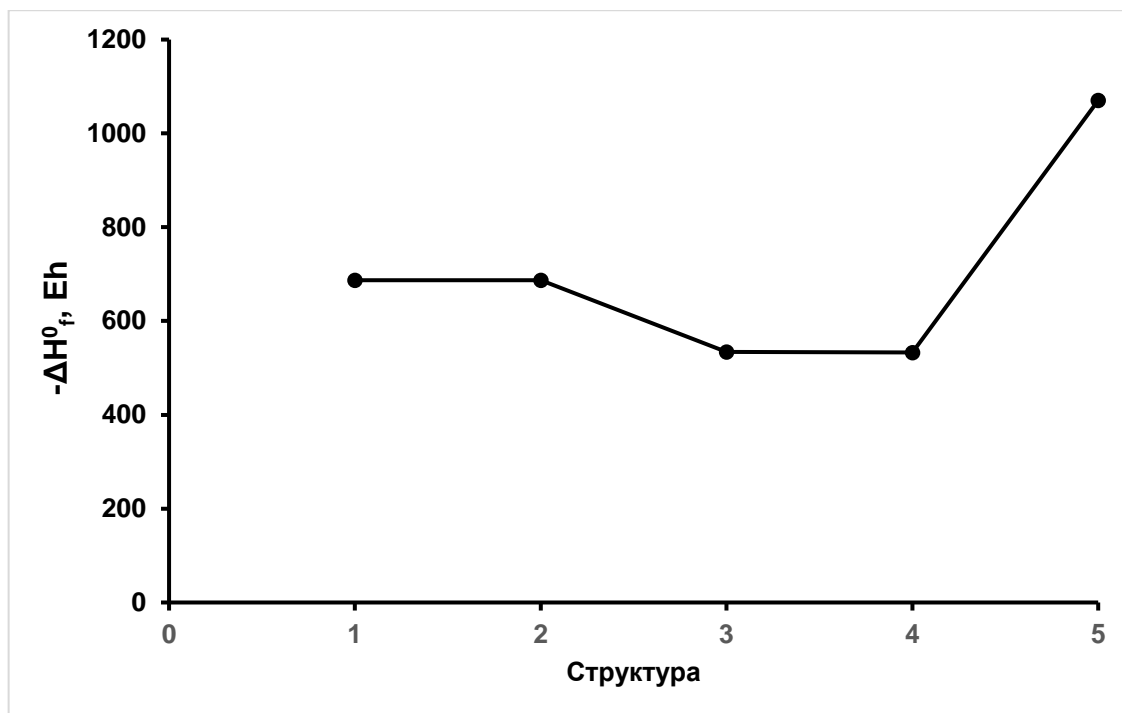
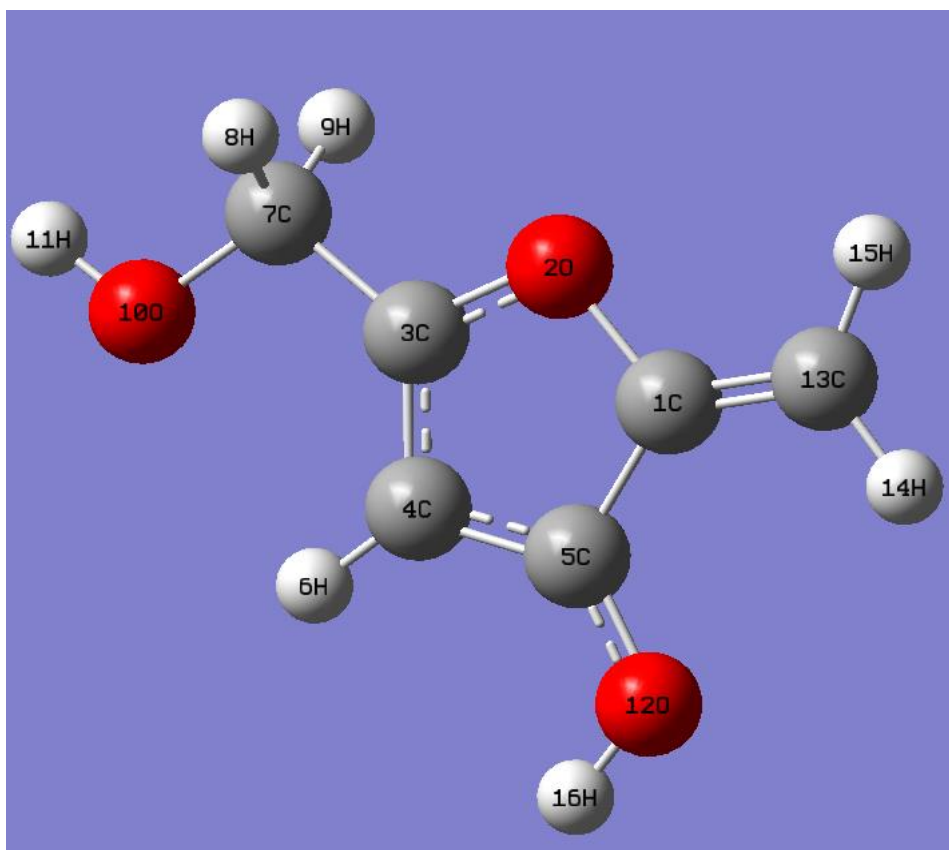


Рисунок 66 – Изменения в теплотах образования для соединений 1-5.

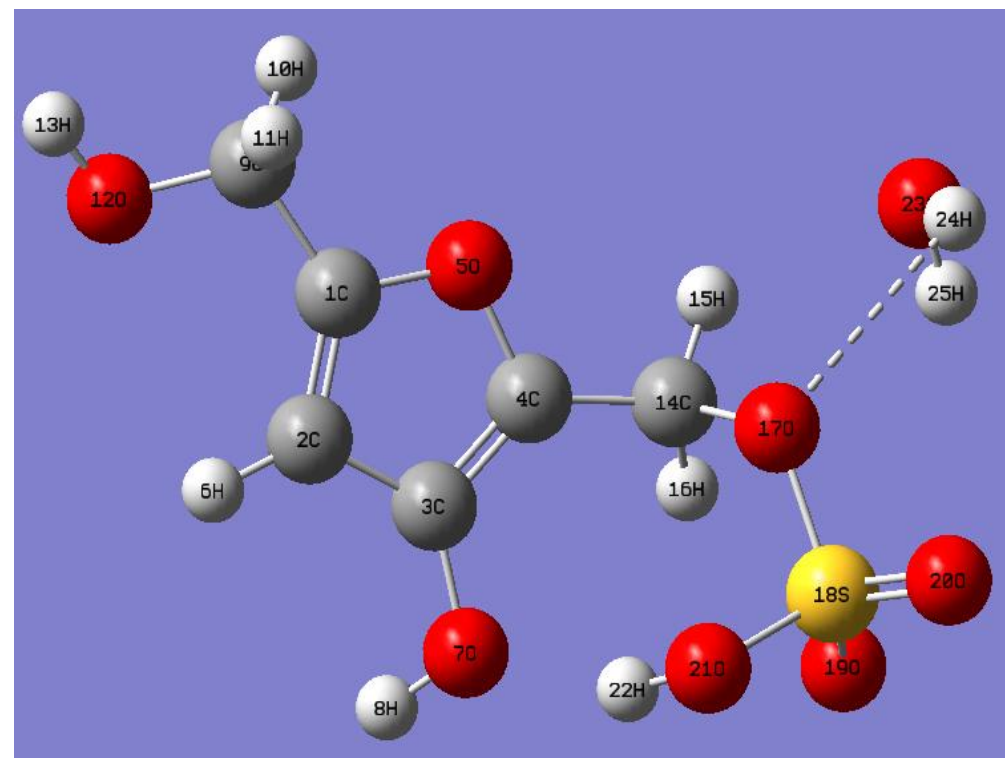
Из всех представленных на Рисунке 65 превращений наиболее интересны превращения 3-4 и 4-5, которые далее были подробно изучены.

Проведенные расчеты показали, что при переходе (3) в (4) в результате дегидратации образуется карбокатион с зарядом +1, содержащий двойную связь 1C-13C (длина – 1,33 Å), который далее вступает в реакцию с серной кислотой, давая сульфэфир (Рисунок 67).

Заряды для атомов 1C и 13C (Рисунок 67 А) равны 0,127 и -0,047 соответственно, то есть частичный заряд, распределенный между 1C и 13C, положителен, но составляет малую величину – около 0,08. Тем не менее, этого достаточно для нуклеофильной атаки молекулой H_2SO_4 , приводящей к сульфэфиру (Рисунок 67 Б). В присутствии свободной воды реакция смещена в сторону взаимодействующих веществ. Однако в условиях фенол-сернокислого метода определения сахаров вода находится в связанном с серной кислотой виде. На Рисунке 67 Б это смоделировано с помощью учета одной молекулы воды, которая образует слабую водородную связь 17O-24H (длина связи – 2,81 Å).



А



Б

Рисунок 67 – Структуры карбокатиона (А) и сульфозэфира (Б)

В результате направление реакции существенно меняется. Так, частичные заряды на атомах 17O и 18S составляют -0,465 и 1,206 соответственно, что приводит к заметному увеличению длины связи между 17O и 18S (1,63 Å) и, как следствие, ее легкому разрыву в условиях анализа по методу Дюбуа.

Влияние изменения длины связи 17O-18S на общую энергию системы, выполненную сканированием от 1,63 до 3,35 Å с шагом 0,1, представлено на Рисунке 68. В каждой точке итерации проводилась оптимизация геометрии частицы.

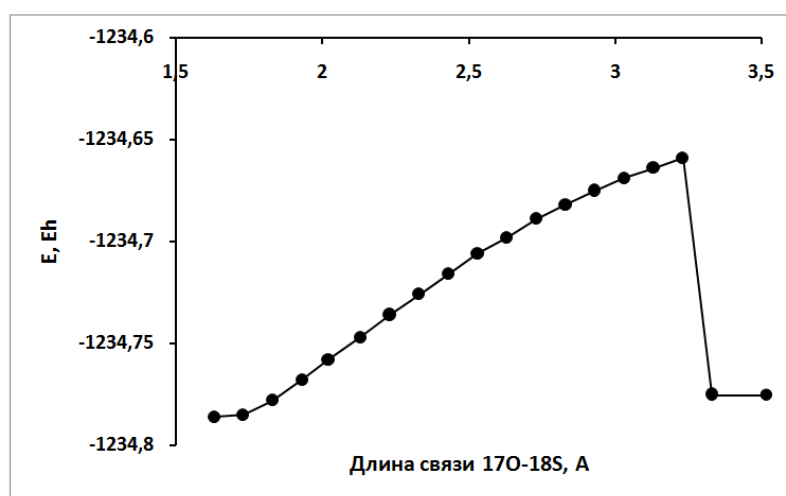
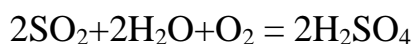


Рисунок 68 – Влияние увеличения длины связи 17O-18S на изменение энергии системы

Из Рисунка 68 видно, что в начале процесса разрыва связи между атомами 17O и 18S общая энергия системы составляет около -1234,786 Eh и далее закономерно плавно возрастает. При длине равной 1,83 Å (энергия системы 1234,784 Eh) связь 17O-18S ослабевает настолько, что частица HSO_3^- начинает отщепляться от молекулы сульфозифира, в тоже время водородная связь 17O-24H укорачивается до 2,08 Å. Система начинает вести себя как совокупность трех отдельных, но все еще энергетически связанных частиц. При длине связи 17O-18S равной 3,23 Å, 17O-24H – 1,93 Å общая энергия системы составляет -1234,659 Eh; также отмечается образование довольно сильной электростатической межмолекулярной водородной связи 7O-22H (длина – 1,71 Å), которая также вносит некоторый вклад в частичную стабилизацию системы частиц (Рисунок 69

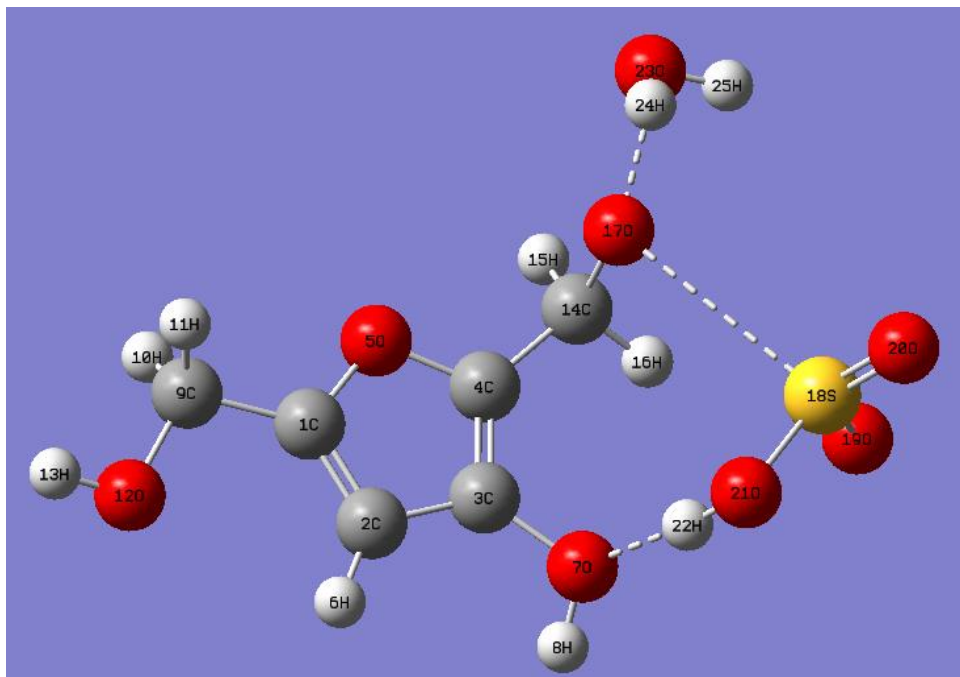
А). Дальнейшее увеличение длины связи 17O-18S приводит к полному распаду сульфозэфира с образованием молекулы альдегида (4), молекулы сернистой кислоты и воды (Рисунок 69 Б); общая энергия при этом закономерно сильно падает до -1234,775 Eh, поскольку образующаяся новая система представляет собой смесь невзаимодействующих друг с другом продуктов. При этом сернистая кислота, как хорошо известно, изомеризуется в гидрат диоксида серы и далее вступает в реакцию с водой в присутствии кислорода воздуха по уравнению [41]:



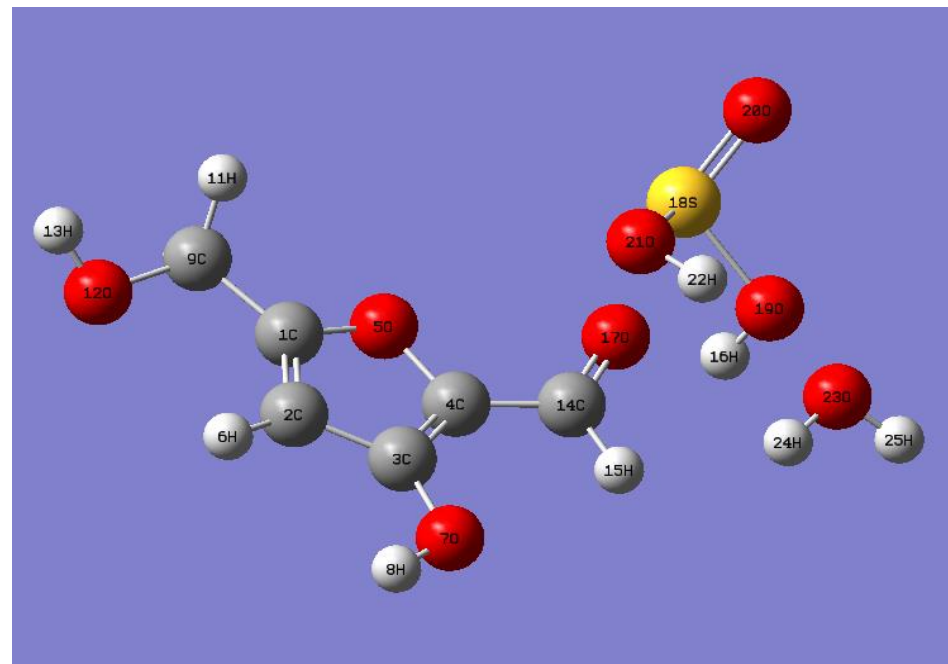
В результате образуется серная кислота – среда проведения реакции в методе Дюбуа. Этот процесс протекает более интенсивно при подводе теплоты, источником которой в фенол-сернокислом методе является реакция смешения среды (H_2SO_4) с водными растворами восстанавливающих сахаров и фенола.

Образование окрашенного соединения (5) из (4) проходит посредством двух последовательных атак альдегида (4) молекулами фенола. Сначала происходит нуклеофильная атака электрофильного центра карбонильной группы первой молекулой фенола. Соответствующее переходное (ПС) состояние и образующийся полупродукт представлены на Рисунке 70.

Расчет ПС (см. Рисунок 70 А) показал, что частичный заряд на атоме 16O, имеющий величину 0,333, приводит к притяжению и ориентированию атома 24H (частичный заряд 0,362) молекулы фенола по отношению к 16O за счет электростатических сил (в центре ПС расстояние 18C-24H – 1,61 Å, расстояние 16O-24H – 1,06 Å, угол 16O-24H-18C – 127,88°). Подобная геометрия ПС (см. Рисунок 70 А) обуславливает выгодность образования полупродукта (см. Рисунок 70 Б). Действительно, энтальпия активации составляет довольно низкую для ПС величину примерно 0,12 Eh. Для сравнения, например, энергия разрыва реакционноспособной двойной связи в молекуле этилена, склонной к реакциям электрофильного присоединения в очень мягких условиях за счет разрыва менее прочной (по сравнению с σ -связью) π -связи, составляет 0,26 Eh [21]. Этим можно объяснить наблюдаемый экспериментальный факт отсутствия стадии дополнительного нагревания реакционной массы для развития окрашивания.

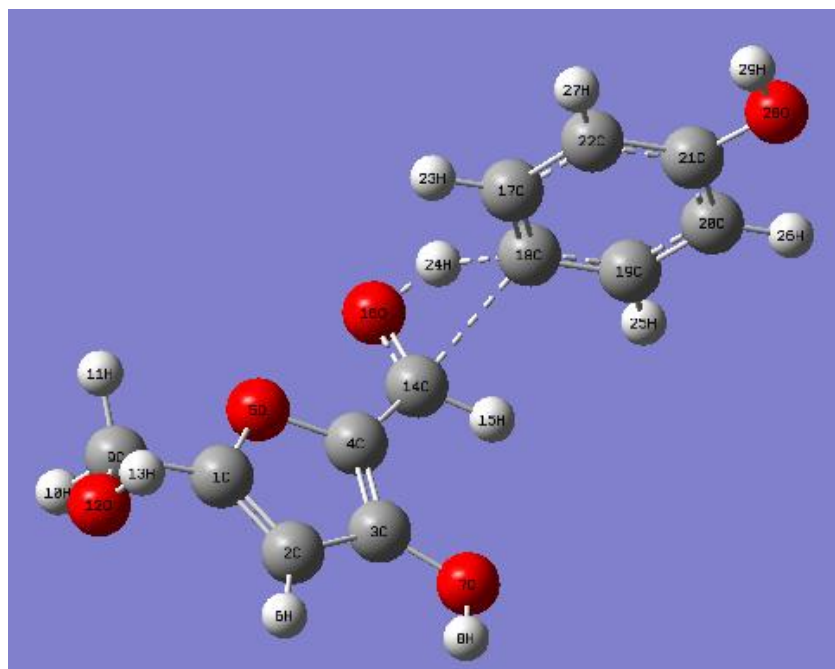


А

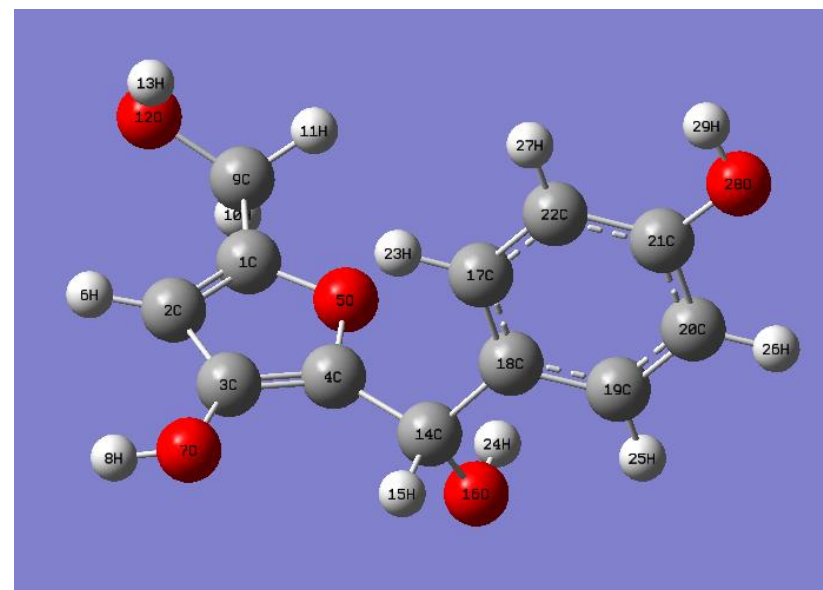


Б

Рисунок 69 – Структура системы частиц перед распадом (А) и продукты реакции разложения сульфозэфира (альдегид (5), H_2SO_3 , H_2O)



А



Б

Рисунок 70 – Переходное состояние (А) и полупродукт (Б), получающийся после нуклеофильной атаки первой молекулой фенола

Полученный в результате присоединения одной молекулы фенола полупродукт имеет на атомах 16O и 5O самые большие отрицательные заряды, равные $-0,387$. Поскольку реакция идет в сильнокислой среде, то возможно протонирование как 5O, так и 16O. Однако протонирование 5O приводит к разрушению и осмолению соединений фурфурола, в тоже время протонирование 16O (Рисунок 71) приводит к отщеплению молекулы воды и образованию за счет делокализации электронной плотности между фурфурол- и фенольным заместителями, включая атом 14C, достаточно устойчивого вторичного карбокатиона. Исследование процесса дегидратации протонированного полупродукта (Рисунок 71) выполнено сканированием связи 14C-16O от 1,43 Å до 3,43 Å с шагом 0,1. В каждой точке итерации проводилась оптимизация геометрии частицы (Рисунок 72).

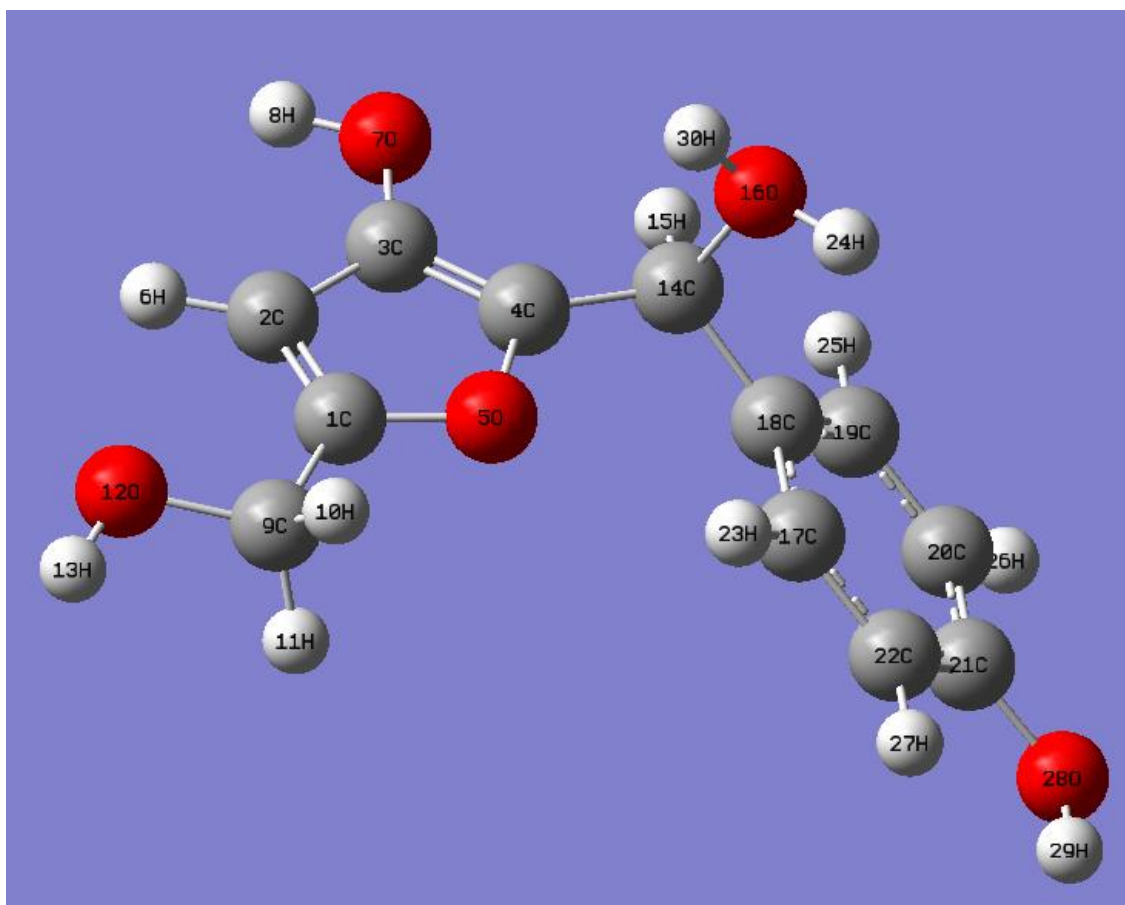


Рисунок 71 – Структура протонированного полупродукта

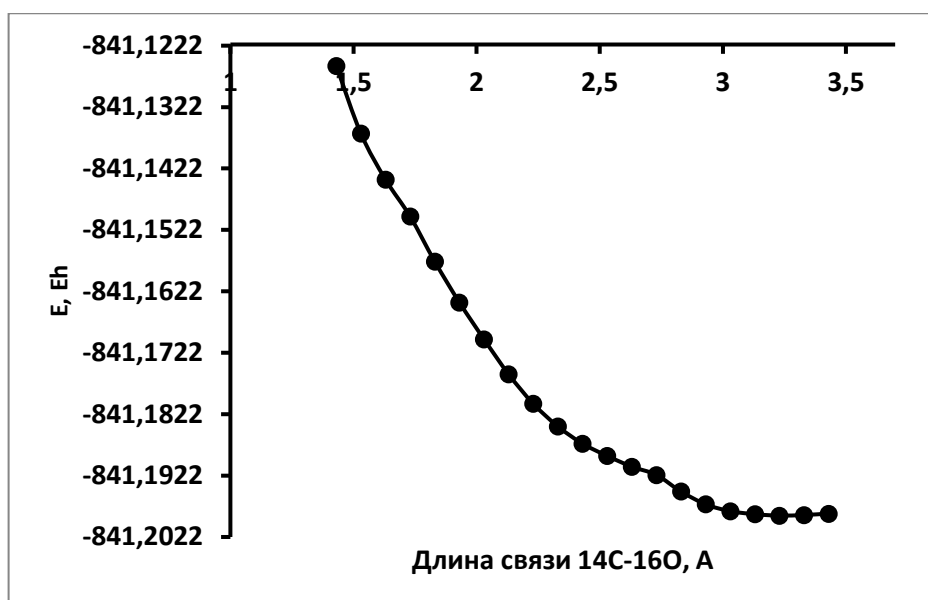


Рисунок 72 – Влияние увеличения длины связи 14C-16O на изменение общей энергии системы

Установлено, что при увеличении расстояния между атомами 14C-16O происходит не только существенное понижение общей энергии системы, но и изменение угла 4C-14C-18C. Увеличение длины связи 14C-16O выше 2,43 А обуславливает образование карбокатиона, имеющего плоское строение (Рисунок 73).

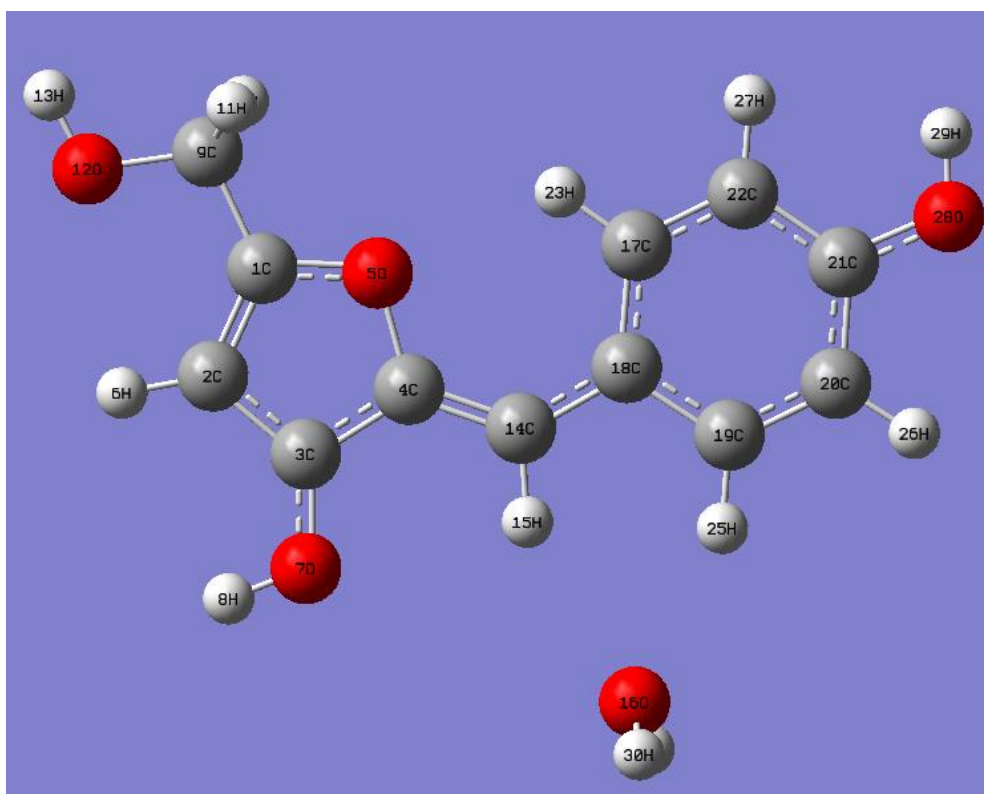


Рисунок 73 – Структура карбокатиона, образующегося после дегидратации полупродукта, изображенного на Рисунке 71.

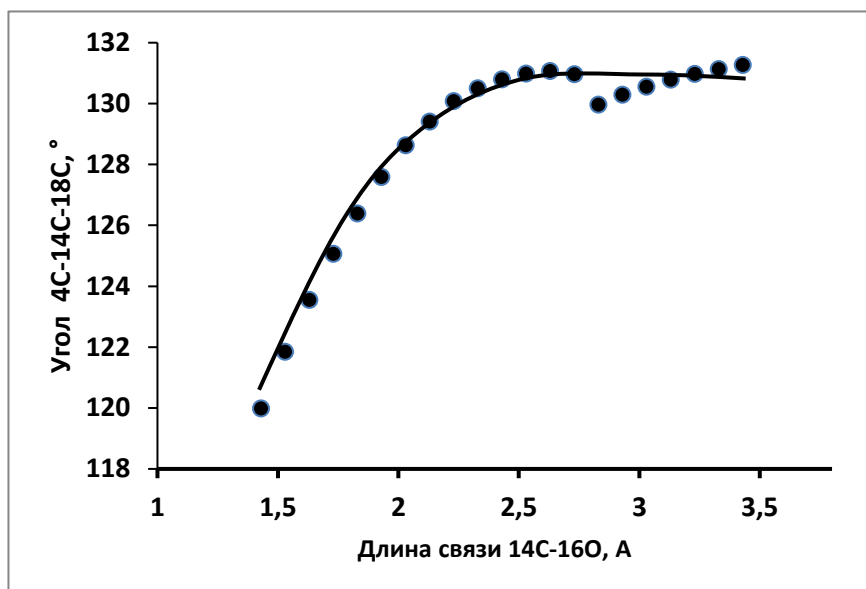


Рисунок 74 – Влияние увеличения длины связи 14С-16О на изменение угла 4С-14С-18С

Дальнейшее изменение длины связи 14С-16О не приводит к изменению угла 4С-14С-18С, а следовательно и геометрии частицы. На Рисунке 74 это выражается прямолинейным участком кривой, параллельным оси абсцисс.

Расчет ПС (Рисунок 75) показал, что трехгранный угол 31С-14С-4С-18С при вершине 14С равен 128,15°, угол 31С-14С-4С равен 113,07°, угол 14С-31С-42Н – 106,49°.

Выявлено наличие слабых водородных связей 15Н-16О и 16О-13Н, длины которых равны 2,58 и 2,50 А соответственно. Отмечено формирование прочной ковалентной связи 31С-14С, длина которой в переходном комплексе равна 1,55 А. Заряд на атоме кислорода 5О, входящего в структуру фурфурольного заместителя снижается практически до нуля и соответственно вероятность осмоления понижается. Основными концентраторами частичного отрицательного заряда являются атомы 12О и 41О (-0,311 и -0,308 соответственно). Увеличение концентрации отрицательного заряда на 41О атакующей молекулы фенола приводит к тому, что ароматическая система последнего при сближении с карбокатионом перераспределяется с образованием хиноидной формы фенола. При этом плоская геометрия карбокатиона нарушается. Отрыв протонов 15Н и 42Н от 14С и 31С соответственно способствует образованию двойной связи и в конечном итоге получению соединения (5), представленному на Рисунках 65 и 76.

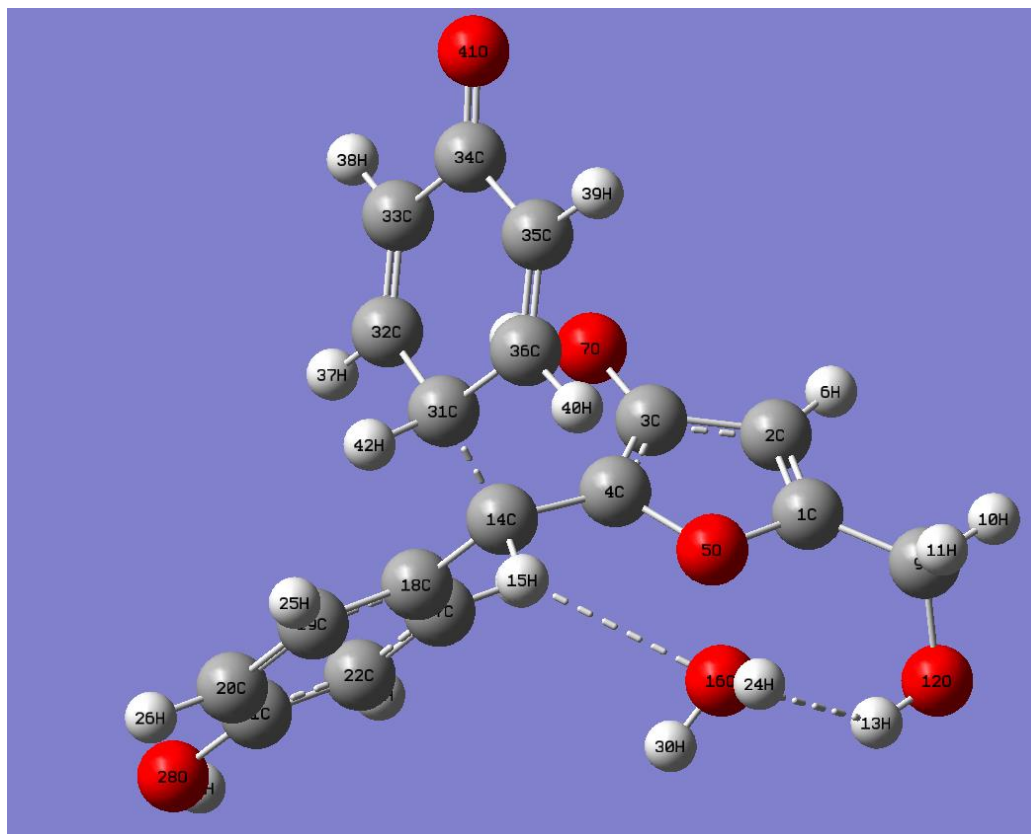


Рисунок 75 – Структура ПС частицы, образующейся при атаке полупродукта второй молекулой фенола

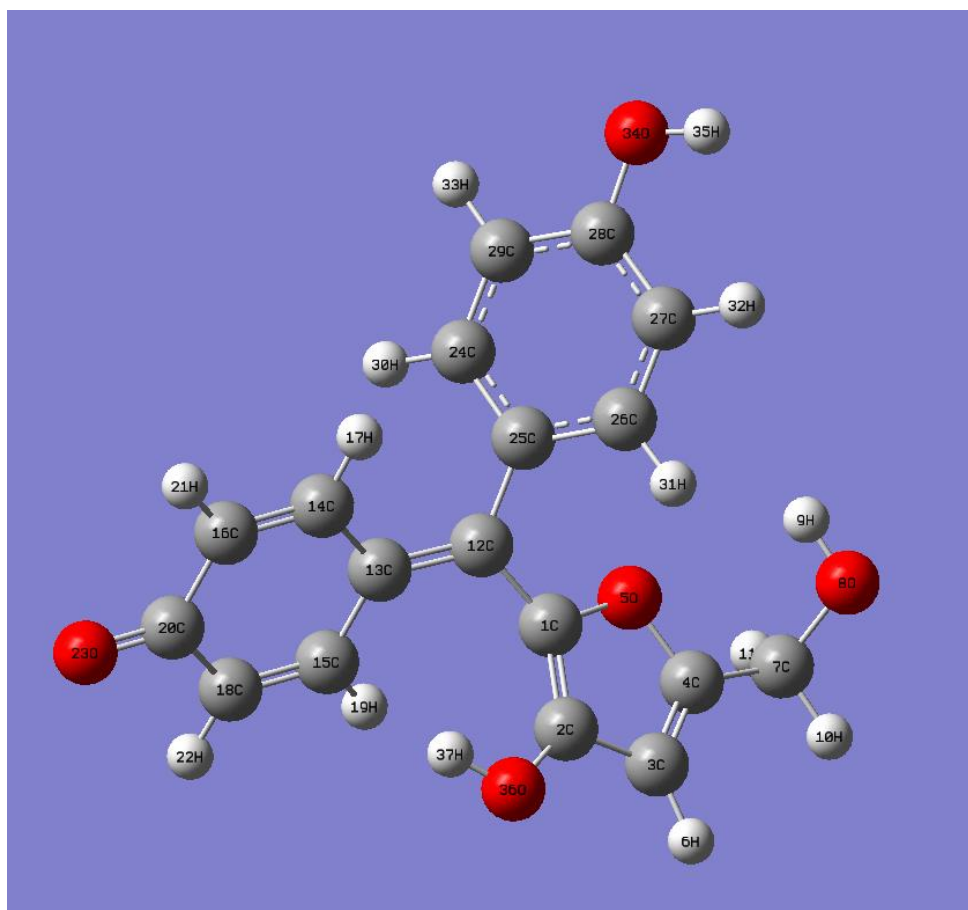


Рисунок 76 – Структура соединения (5)

Анализ данных, полученных в результате квантово-химического моделирования, позволяет сделать вывод, что образование красителя (5) подобно образованию красителя, который образуется в реакции Селиванова (реакция с резорцином).

На Рисунке 77 приведен теоретический спектр соединения (5) рассчитанный с использованием метода РМЗ.

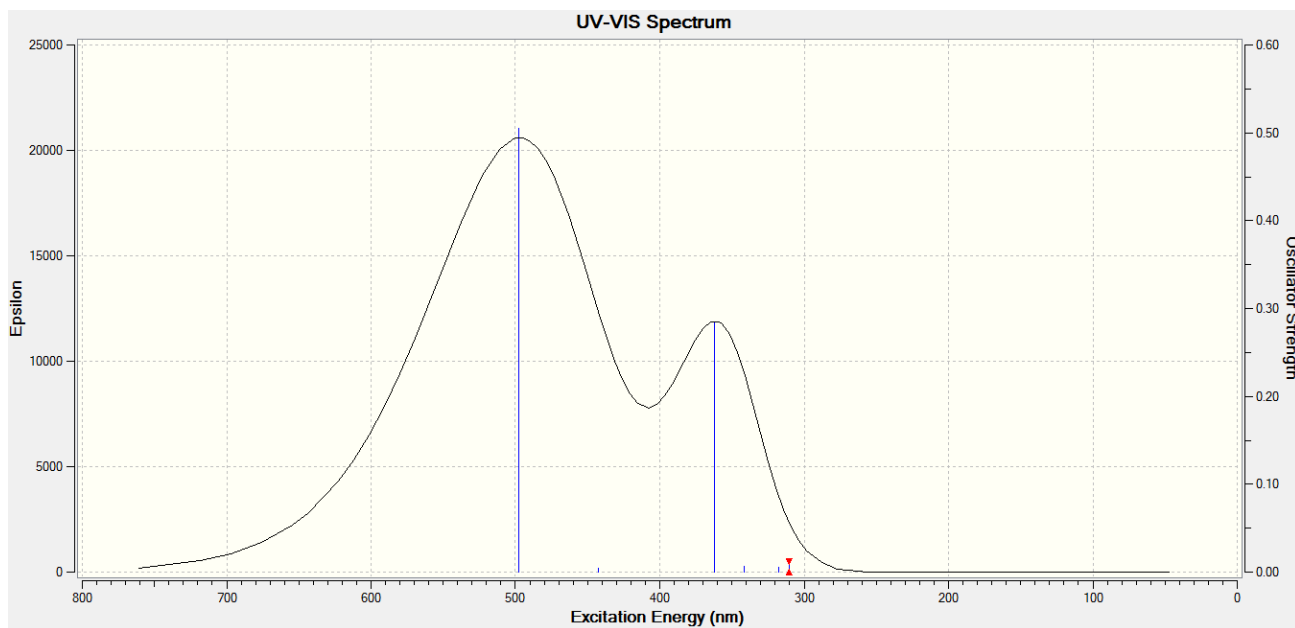


Рисунок 77 – Теоретически рассчитанный УФ/ВИД-спектр красителя (6)

Из Рисунка 77 видно, что в видимой области спектра наблюдается интенсивная линия поглощения при длине волны 497 нм, что всего лишь на 10 нм отличается от длины волны поглощения, наблюдаемой в экспериментальном спектре, что подтверждает адекватность структуры (5).

Таким образом, проведенные квантово-химические исследования показали, что реакции, приведенные на Рисунке 65, удовлетворительно отражают суть происходящих изменений при фенол-серноокислом методе определения суммы восстанавливающих сахаров. Методы квантовой химии также позволили существенно уточнить детали происходящих при этом процессов на молекулярном уровне.

5.3. Гравиметрическое определение полисахаридов

Для определения полисахаридов в субстанциях растительного происхождения наиболее часто используются гравиметрические методики, основными недостатками которых являются длительность, трудоемкость, проблемы, связанные с получением удовлетворительной гравиметрической формы (загрязненность осадков), недостаточно полное высаждение аналитов (наиболее часто в качестве осадителя используется этиловый спирт), большой расход сырья и реагентов. Поскольку метод востребован, было интересно его оптимизировать с целью определения полисахаридов в ЛРС. Одним из возможных решений существующих проблем является подбор осадителя и способов дополнительной очистки гравиметрической формы, обеспечение максимально возможной для гравиметрического метода автоматизации. Поэтому в настоящей работе были проведены исследования по выбору осадителя, метода очистки осадка полисахаридов, возможностям автоматизации анализа.

«Около 2,0 г (точная навеска) растительного материала помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли воду очищенную объемом, соответствующим Таблице 71, помещали на кипящую водяную баню с обратным холодильником. Извлечение вели в течении 60 мин. Колбу охлаждали до комнатной температуры под струей холодной воды. Содержимое колбы пропускали через пять слоев марли в мерную колбу» (Харлампович Т. А., 2015, Приложение Г), марлю отжимали, помещали в коническую колбу и повторно проводили извлечение. 50 мл извлечения помещали в пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл и центрифугировали в течении 10 мин при скорости 4000 об/мин. Для очистки от моносахаров надосадочную жидкость пропускали через картридж, заполненный сорбентом с аминными группами, марки «Диапак Амин» из расчета 1 картридж на 10 мл жидкости. К полученному раствору прибавляли окись алюминия из расчета 1 г на 5 мл жидкости. Смесь перемешивали на шейкере в течении 15 мин, помещали в пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл и центрифугировали в течении 10 мин при скорости 4000 об/мин. 10 мл надосадочной жидкости помещали в пластиковую

пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл, прибавляли 0,1 мл кислоты муравьиной 99 % и 40 мл ацетона (ацетона или спирта этилового 95 %) перемешивали, выдерживали при температуре +4°C до полного выпадения осадка полисахаридов. Полученный осадок центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, осадок четырежды промывали ацетоном объемом 20 мл, сушили в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течении 5 ч.

Содержание полисахаридов рассчитывали по формуле:

$$X(\%) = \frac{V_k \cdot (m - m_0) \cdot 100}{10 \cdot a \cdot (100 - W)} \cdot 100 \% = \frac{V_k \cdot (m - m_0) \cdot 10}{a \cdot (100 - W)} \cdot 100 \%,$$

где а – навеска растительного материала, г;

V_k – объем мерной колбы с извлечением, мл;

m – масса пробирки с осадком полисахаридов;

m_0 – масса пустой пробирки;

W – влажность сырья, %.

Исключение составляли корни алтея и семена льна. Извлечение из корней алтея получали посредством перемешивания навески материала с водой при комнатной температуре в течение часа, а семян льна – в течение суток.

При гравиметрическом определении полисахаридов в качестве осадителя наибольшее распространение получил этанол, поскольку он обладает несомненным достоинством – образующийся осадок полисахаридов одновременно является осаждаемой и гравиметрической формой. Это дает возможность существенно уменьшить расходы реактивов и потери анализа в процессе перевода осаждаемой формы в гравиметрическую. В настоящей работе высаживание определяемых веществ из одних и тех же извлечений осуществлялось спиртом этиловым 95 %, ацетоном, ацетоном с добавкой коагулянта (муравьиной кислоты 99 %). Выбор данного коагулянта обусловлен высокой летучестью муравьиной кислоты, позволяющей легко и быстро удалить ее следы в процессе высушивания.

Дополнительно улучшить ситуацию позволяет эффективное сочетание стадии осаждения и стадии центрифугирования выпавшего в осадок полисахарида (вместо традиционного фильтрования). Основными параметрами, влияющими на

отделение осадка от надосадочной жидкости, являются скорость и время центрифугирования.

На Рисунках 78 и 79 представлено влияние скорости и времени центрифугирования на отделение осадка полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной от жидкой фазы, полученной после обработки извлечения этанолом 95 %.

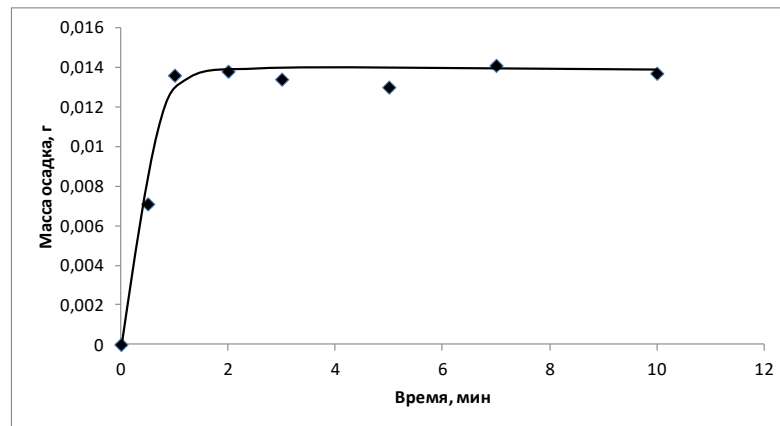


Рисунок 78 – Влияние времени центрифугирования на отделение осадка полисахаридов от жидкой фазы (на примере извлечений из листьев мать-и-мачехи обыкновенной)

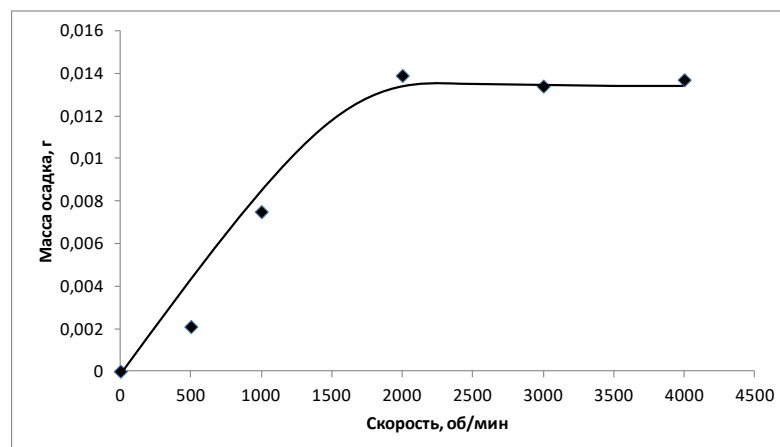


Рисунок 79 – Влияние скорости центрифугирования на отделение осадка полисахаридов от жидкой фазы (на примере извлечений из листьев мать-и-мачехи обыкновенной)

На основании полученных кривых можно сделать вывод, что потерь осадка аналитов практически не наблюдается при времени центрифугирования более 3 мин и скорости центрифугирования выше 2500 об/мин. Принимая во внимание разнообразие состава природных полисахаридов были выбраны следующие

условия центрифугирования – время 10 мин, скорость 4000 об/мин. Увеличение продолжительности процесса при более высоких скоростях нецелесообразно вследствие разогрева смеси, которое может привести к потерям анализа в результате частичного растворения последнего в надосадочной жидкости.

Поскольку прямое высаждение полисахаридов затруднено вследствие соосаждения большого количества сопутствующих веществ, то требуется дополнительная очистка извлечения перед высаждением. На примере листьев мать-и-мачехи обыкновенной продемонстрирована чистота осадков полисахаридов (Рисунок 80), получаемых высаждением спиртом непосредственно из извлечения (Рисунок 80 А), после элюирования извлечения через картридж «Диапак Амин» (Рисунок 80 Б), после дополнительной обработки элюата окисью алюминия (Рисунок 80 В).

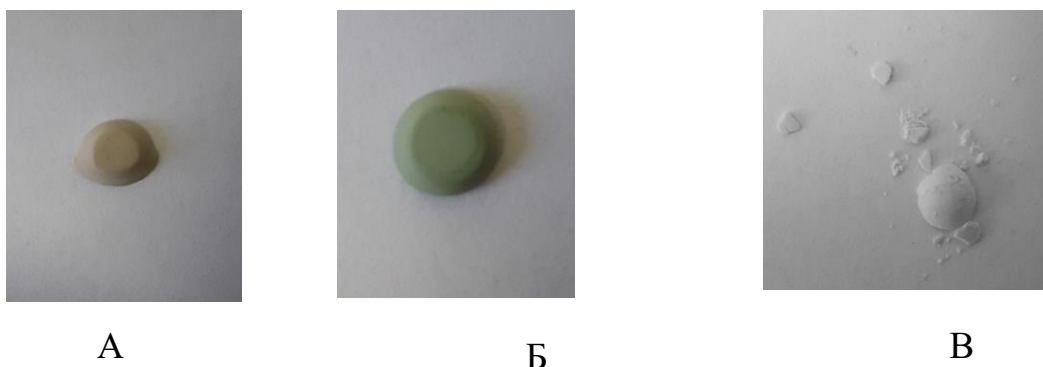


Рисунок 80 – Осадки, получаемые, после непосредственного осаждения полисахаридов спиртом этиловым 95 % из извлечения (А), высаждение из элюата, получаемого пропусканием извлечения через картридж «Диапак Амин» (Б), осадки, получаемые после обработки элюата окисью алюминия (В)

Видно, что при высаждении полисахаридов непосредственно из извлечения соосаждается большое количество матричных компонентов – осадок приобретает коричневатый цвет. При пропускании извлечения через картридж, содержащий аминогруппы, цвет осадка меняется, поскольку существенная часть мешающих компонентов извлекается сорбентом картриджа. Обработка элюата, полученного пропусканием извлечения через картридж «Диапак Амин», окисью алюминия дает в итоге (после обработки спиртом 95 %) осадки белого цвета, характерного для

полисахаридов (Рисунок 80 В). Результаты определения полисахаридов представлены в Таблице 77.

Данные, представленные в Таблице 77, показывают, что наименьшей осадительной способностью обладает спирт этиловый 95 %. Исключения составляют извлечения из листьев мать-и-мачехи обыкновенной и листьев подорожника большого. Действительно, данные, полученные при использовании в качестве осаждающего реагента этанола (с учетом погрешности эксперимента и особенностей природных объектов) совпадают с данными, полученными при осаждении определяемых веществ ацетоном и ацетоном с коагулянтом. Полисахариды цветков липы и семян льна посевного могут быть осаждены из извлечений только при применении ацетона с добавкой коагулянта, в то время как попытка осаждения этиловым спиртом и ацетоном не приводит к желаемому результату. Наиболее полное высаждение полисахаридов травы фиалки и корней алтея наблюдается при применении ацетона и ацетона с коагулянтом. Отдельного внимания заслуживает сырье, содержащее инулин (корни лопуха, одуванчика лекарственного, корни и корневища девясила высокого). Полное высаждение аналита для данного типа материала достигается только при использовании ацетона с муравьиной кислотой. Для всех изученных субстанций растительного происхождения при использовании ацетона с коагулянтом, как следует из данных Таблицы 77, улучшается воспроизводимость осаждения – коэффициент вариации, как правило, не превышает 6 %. Дополнительным преимуществом использования коагулянта является значительное уменьшение времени осаждения полисахаридов. Так, например, время выделения полисахаридов из инулинсодержащего сырья сократилось с 4-6 суток до 48 часов. Последнее позволяет значительно ускорить проведение анализа.

Полимерная природа осадков, полученных с помощью ацетона с добавкой муравьиной кислоты, была подтверждена методом ИК-спектроскопии (Рисунок 81-89).

Таблица 77 – Содержание полисахаридов (X, %) в субстанциях растительного происхождения ([58] – данные, полученные автором)

| Образец | Степень измельчения, мм | Соотношение сырье:экстрагент | V_K^* | Осадитель | | | | | |
|--|----------------------------|---------------------------------|---------|-----------|------------------|-----------|------------------|--------------|------------------|
| | | | | C^{**} | | A^{***} | | $A+M^{****}$ | |
| | | | | X, % | $S_{\bar{d}},\%$ | X, % | $S_{\bar{d}},\%$ | X, % | $S_{\bar{d}},\%$ |
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginis farfarae folia</i>) | 5 | 1:20 | 100 | 6,13±0,50 | 3,28 | 7,96±1,02 | 5,16 | 6,68±0,06 | 0,38 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginis majoris folia</i>) | 1 | 1:20 | 100 | 3,57±0,25 | 2,84 | 4,19±0,44 | 4,17 | 3,36±0,06 | 0,75 |
| Цветки липы (<i>Tiliae flores</i>) | 1 | 1:40 | 200 | – | – | – | – | 3,38±0,50 | 5,92 |
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimi semina</i>) | 1 | 1:40 | 200 | – | – | – | – | 5,03±0,38 | 3,03 |
| Трава фиалки (<i>Violae herba</i>) | 1 | 1:20 | 100 | 1,81±0,54 | 12,2 | 2,58±0,07 | 1,12 | 2,72±0,62 | 2,21 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | 1 | 1:20 | 100 | 0,59±0,06 | 4,24 | 1,32±0,61 | 18,8 | 1,30±0,08 | 2,36 |
| Корни лопуха (<i>Arctii radices</i>) | 1 | 1:55 | 250 | 3,27±2,51 | 30,8 | 16,0±6,86 | 17,3 | 23,4±0,5 | 0,86 |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaci officinalis radices</i>) | 1 | 1:55 | 250 | 9,27±8,64 | 37,4 | 21,0±6,2 | 11,8 | 25,8±0,3 | 0,45 |
| Корни и корневища девяссила высокого (<i>Inulae helenii rhizomata et radices</i>) | 1 | 1:55 | 250 | 7,27±0,63 | 3,46 | 18,9±1,5 | 3,18 | 20,0±0,6 | 1,26 |

* – объем мерной колбы с извлечением; ** – спирт 95%; *** – ацетон; **** – ацетон с добавкой муравьиной кислоты

Интенсивная широкая полоса в области $3400-3322\text{ см}^{-1}$ принадлежит колебаниям ОН-групп, образующих внутримолекулярные водородные связи, полоса средней интенсивности с волновым числом около 1636 см^{-1} указывает, предположительно, на наличие этерифицированных карбоксильных групп. Присутствие гликозидных связей, соединяющих участки пиранозного цикла сахаров, подтверждается наличием очень интенсивной полосы в области от 1177 до 990 см^{-1} . Полосы поглощения с волновыми числами $936, 874, 819\text{ см}^{-1}$ характерны для 2-1 гликозидных связей, которыми соединены между собой α, D -глюкопираноза и β, D -фруктофураноза в молекуле инулина [49]. Полосы поглощения с волновым числом $939,878\text{ см}^{-1}$ характерны для гликозидных связей α, D -пираноз между собой [35]. Полоса средней интенсивности с волновым числом 2932 см^{-1} по-видимому соответствуют колебаниям метиленовых групп, полоса поглощения средней интенсивности с волновым числом 1646 см^{-1} относится к этерифицированным карбоксильным группам.

Таким образом, в результате проведенных исследований были качественно подтверждены выделенные полисахариды. В то же время полученные результаты свидетельствуют, что ИК-спектроскопия может быть рекомендована для подтверждения подлинности сырья, содержащих полисахариды, только в качестве дополнительного инструмента вследствие сложности и вариабельности этого типа анализов. В качестве полос поглощений могут быть рекомендованы следующие: широкая интенсивная полоса в области $3500-3000\text{ см}^{-1}$, $1655-1635\text{ см}^{-1}$, интенсивная полоса или набор полос в области $1200-900\text{ см}^{-1}$. В ИК-спектрах полисахаридов, полученных из инулинсодержащего сырья, помимо приведенных выше полос должны дополнительно присутствовать две полосы поглощения средней интенсивности в области $880-815\text{ см}^{-1}$, подтверждающих наличие гликозидных связей между молекулами пираноз и фураноз, входящих в состав инулиноподобных полисахаридов. Для подтверждения работоспособности предлагаемого осадителя были выполнены повторные определения полисахаридов в ЛРС (Таблица 78).

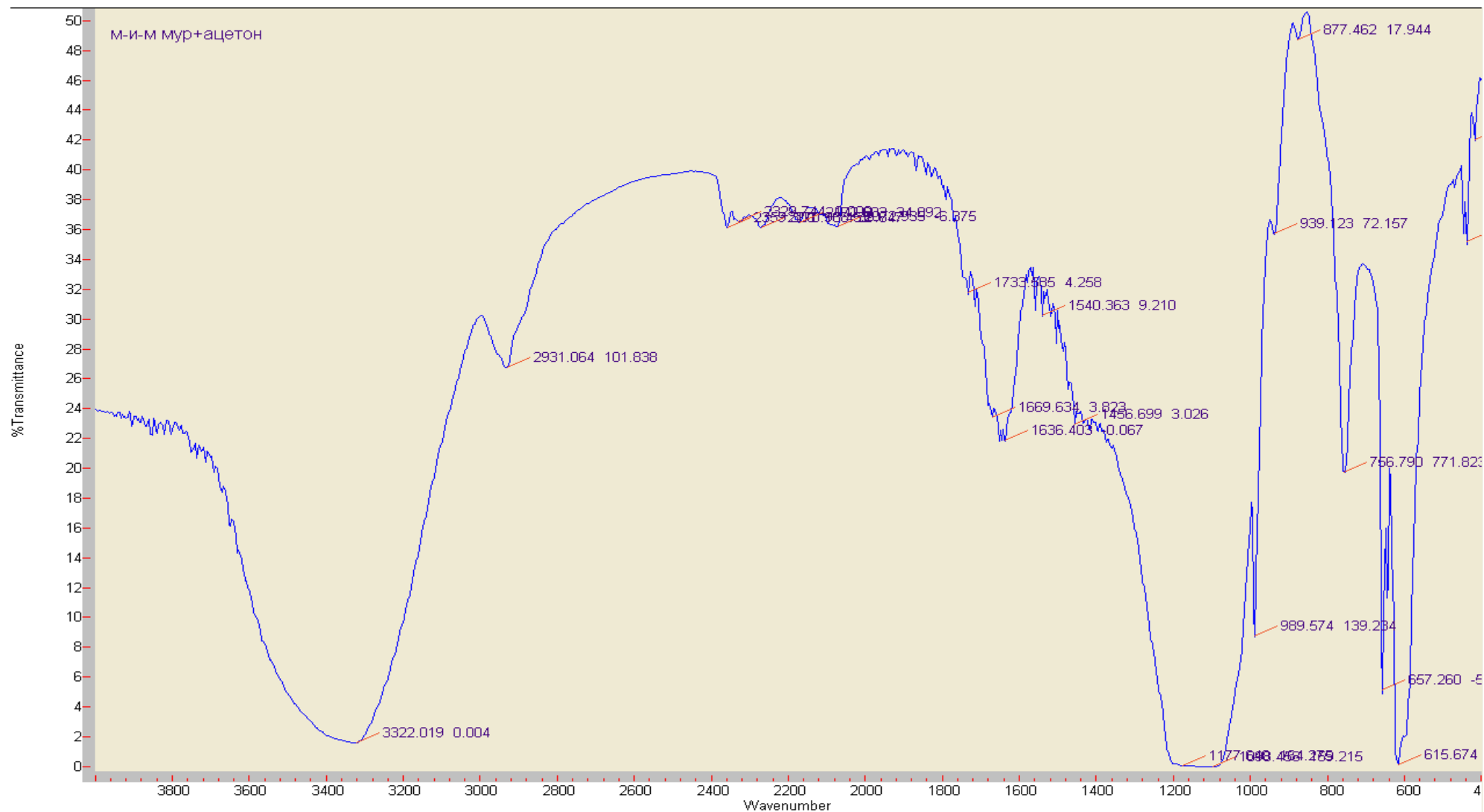


Рисунок 81 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из листьев мать-и-мачехи обыкновенной с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

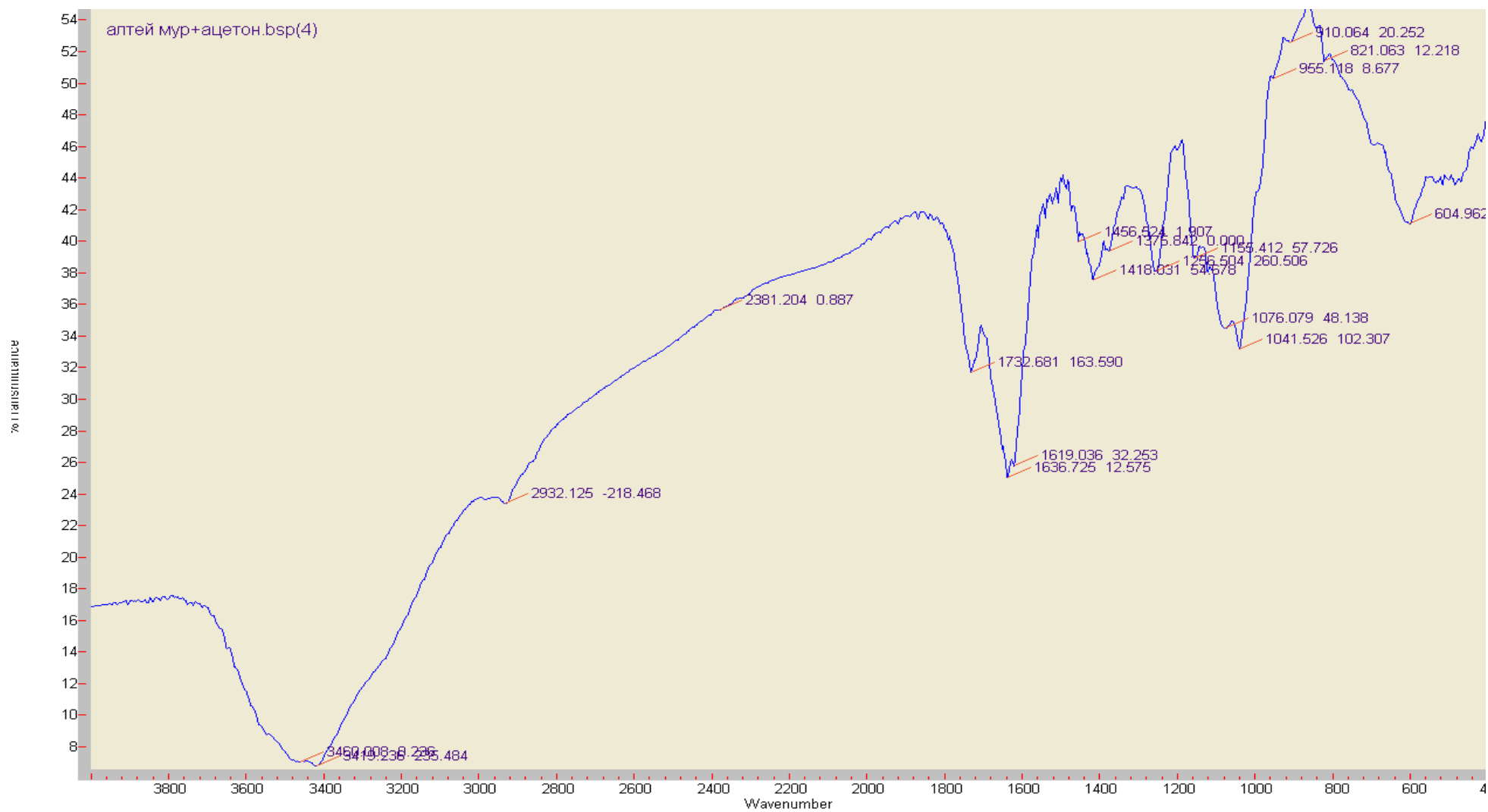


Рисунок 82 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из корней алтея с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

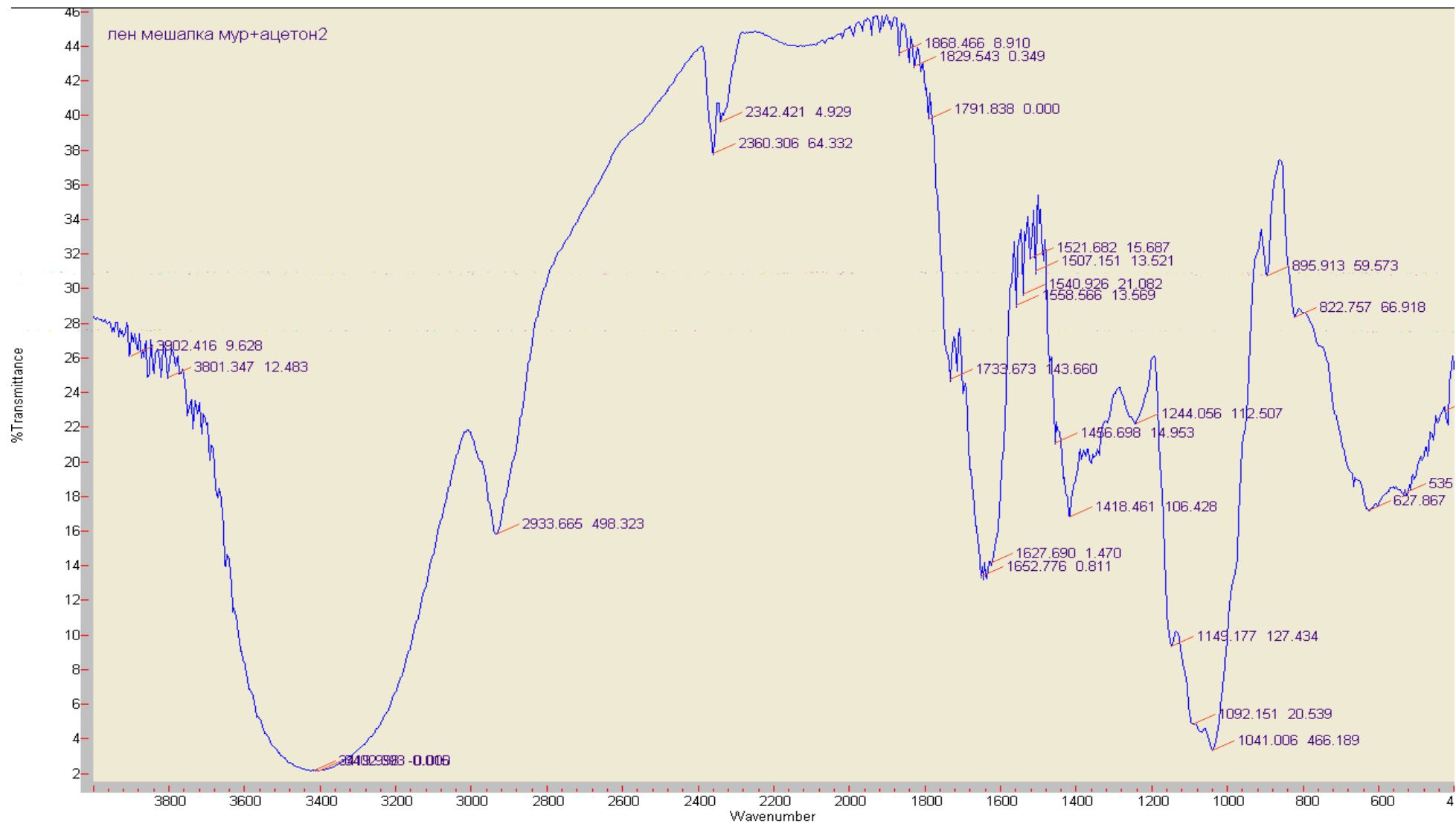


Рисунок 83 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из семян льна посевного с помощью ацетона и добавки муравьиной КИСЛОТЫ

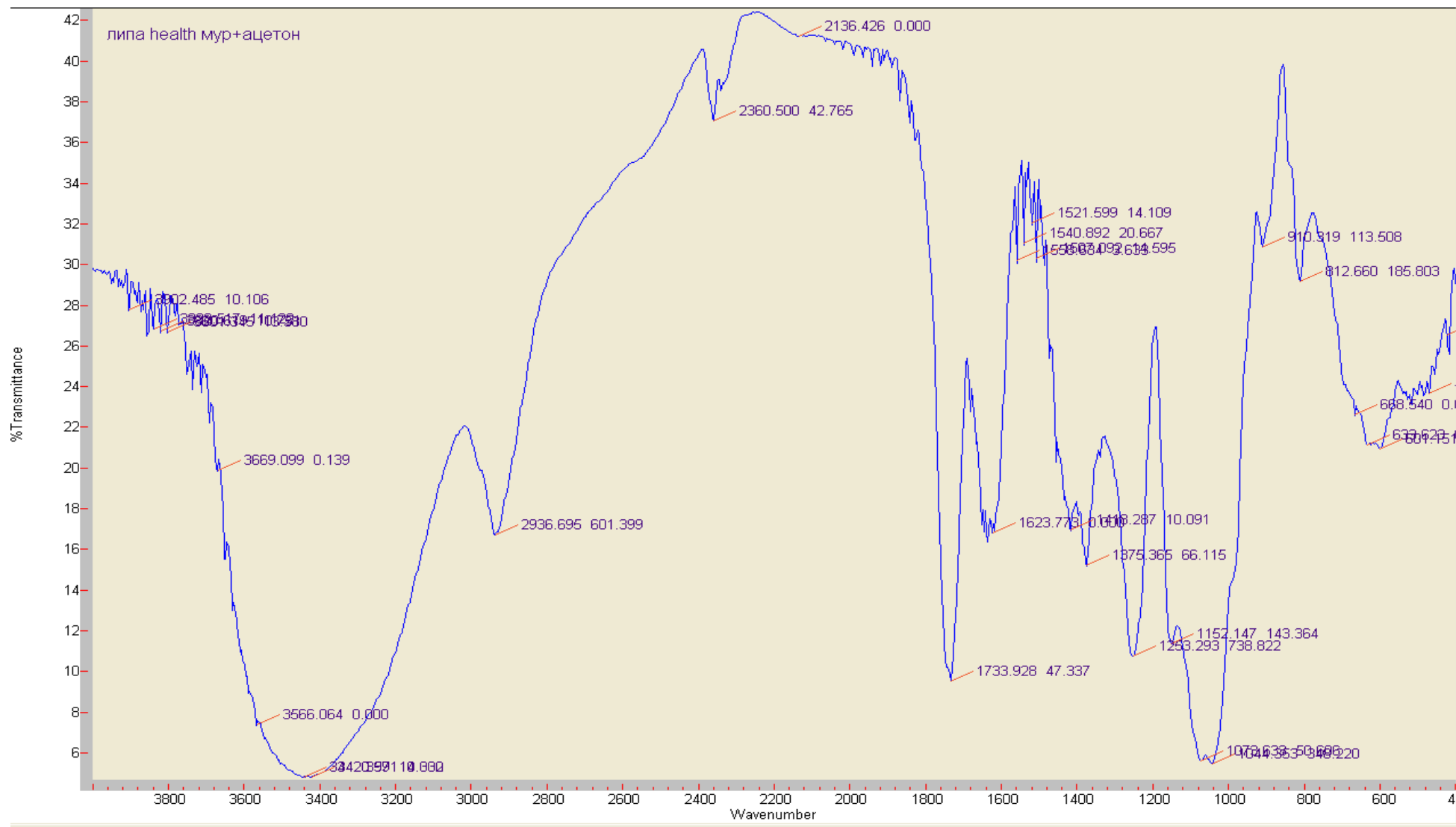


Рисунок 84 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из цветков липы с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

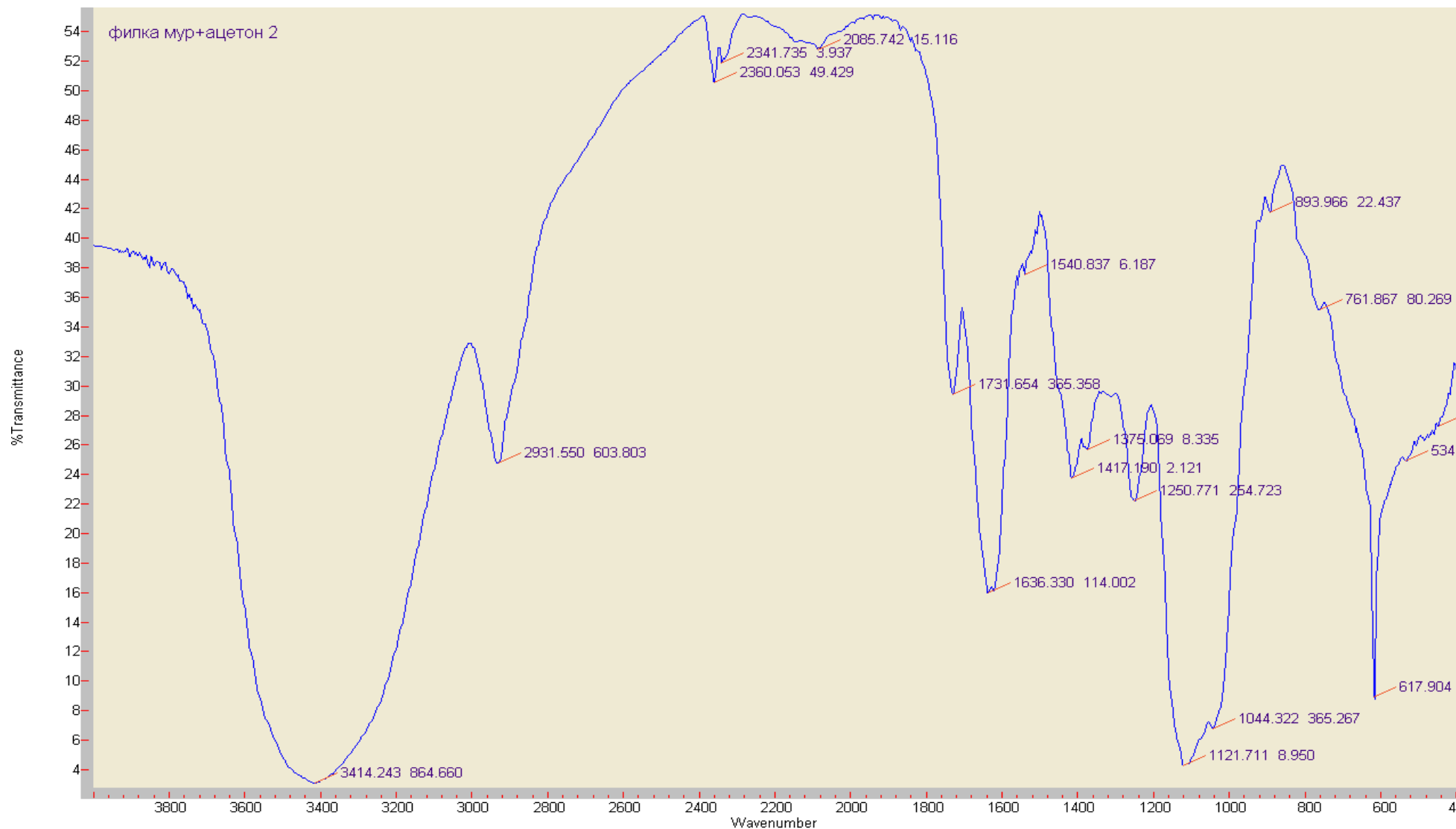


Рисунок 85 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из травы фиалки с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

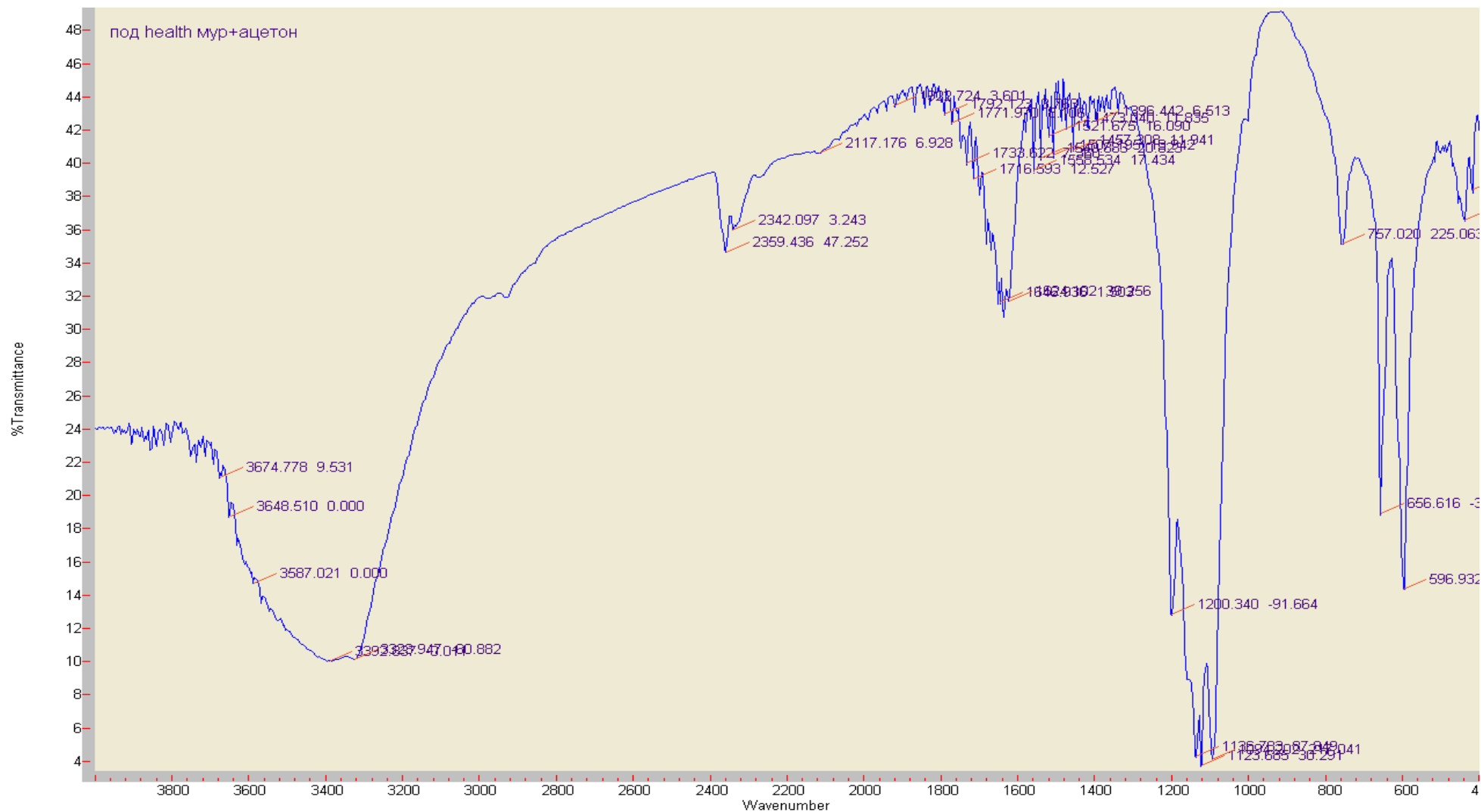


Рисунок 86 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из листьев подорожника большого с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

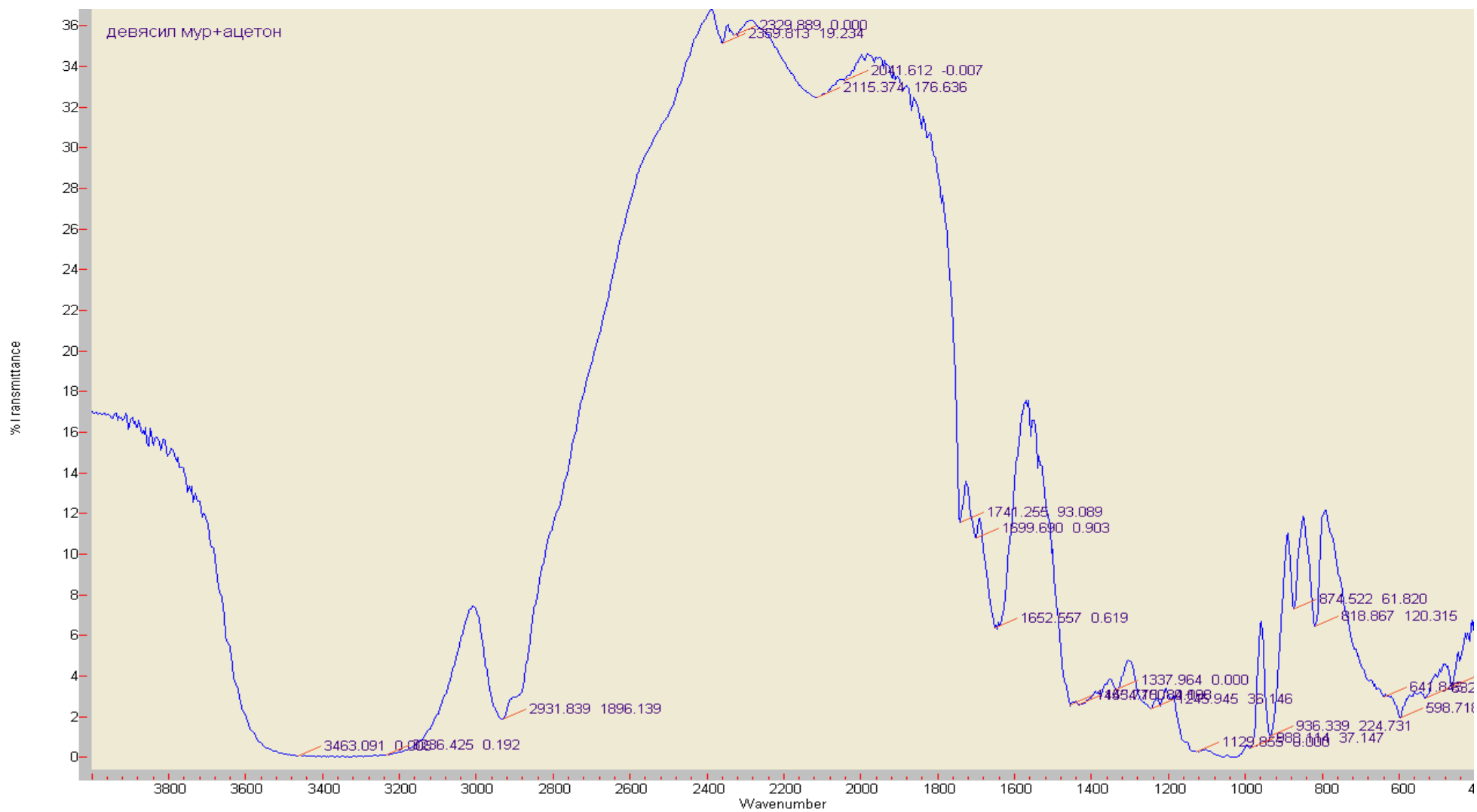


Рисунок 87 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из корней и корневищ девясила высокого с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

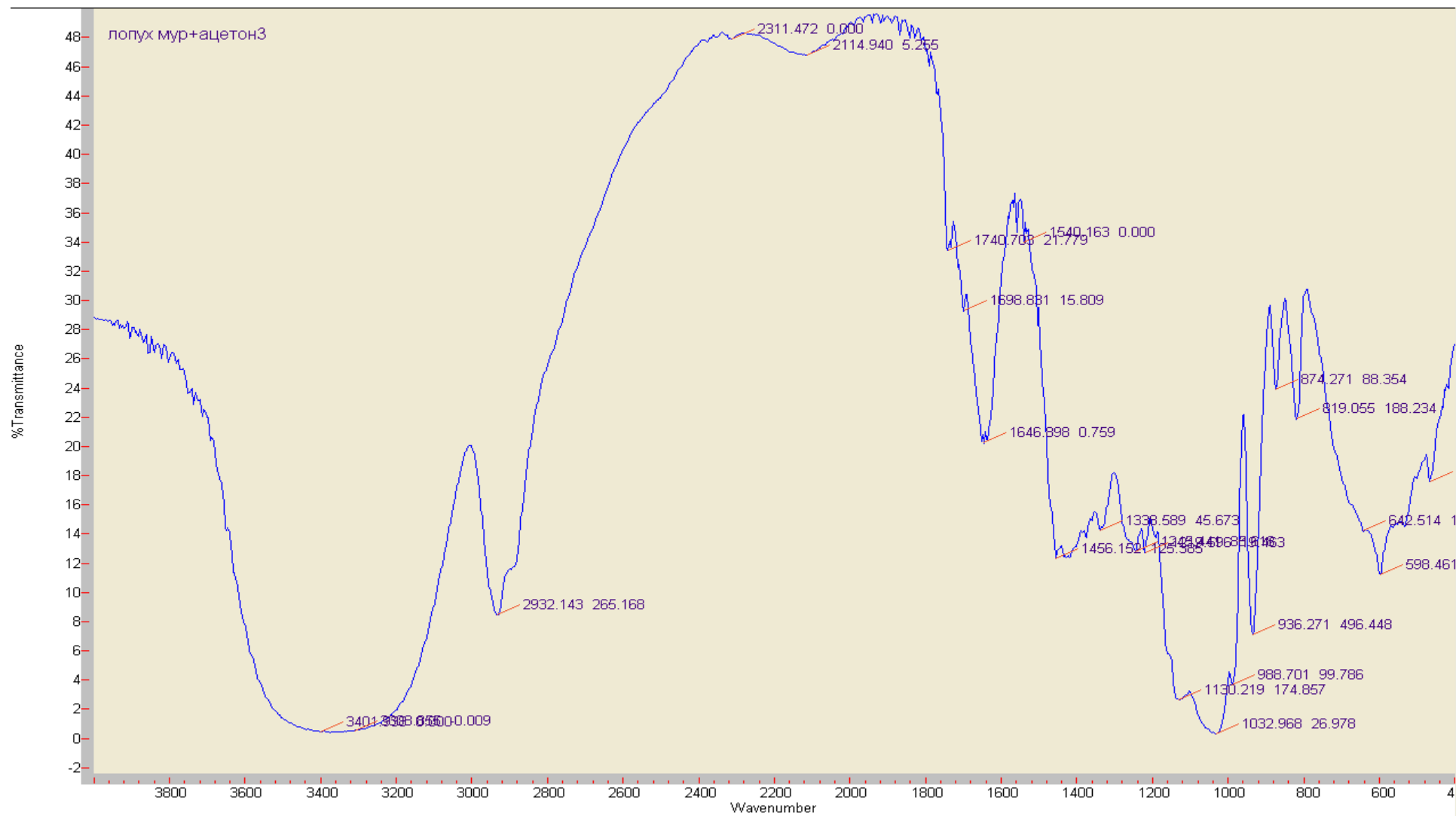


Рисунок 88 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из корней лопуха с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

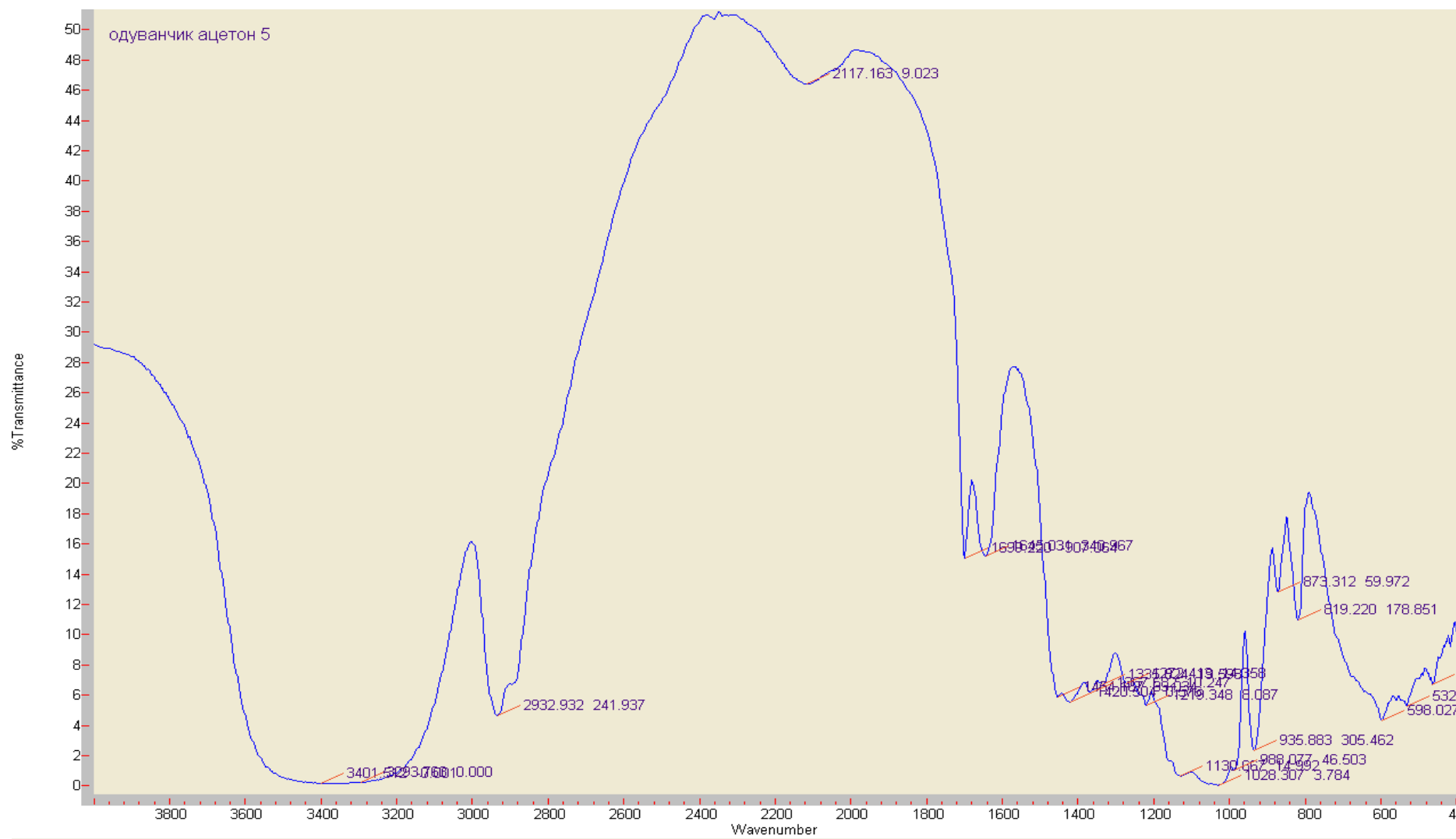


Рисунок 89 – ИК-спектр полисахаридов, выделенных из корней одуванчика лекарственного с помощью ацетона и добавки муравьиной кислоты

Таблица 78 – Метрологические характеристики методики определения полисахаридов в субстанциях природного происхождения ([58] – данные, полученные автором)

| Образец | W, % | n | f | P, % | t(P,f) | X _{ср} , % | s ² | s | ΔX | ±E*, % |
|---|------|---|---|------|--------|---------------------|----------------|------|------|--------|
| Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginifarfaraefolia</i>) | 13 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 7,60 | 0,35 | 0,35 | 0,36 | 4,74 |
| Листья подорожника большого (<i>Plantaginimajorisfolia</i>) | 14 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 4,19 | 0,22 | 0,22 | 0,23 | 5,50 |
| Цветки липы (<i>Tiliaeflores</i>) | 13 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 4,02 | 0,20 | 0,20 | 0,21 | 5,22 |
| Семена льна посевного (<i>Lini usitatissimisemina</i>) | 13 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 5,74 | 0,22 | 0,22 | 0,23 | 4,01 |
| Трава фиалки (<i>Violaeherba</i>) | 14 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 3,13 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 5,11 |
| Корни алтея (<i>Althaeae radices</i>) | 14 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 1,57 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 5,73 |
| Корни лопуха (<i>Arctii radices</i>) | 14 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 26,8 | 0,90 | 0,90 | 0,93 | 3,47 |
| Корни одуванчика лекарственного (<i>Taraxaciofficinalis radices</i>) | 14 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 29,3 | 1,15 | 1,15 | 1,21 | 4,12 |
| Корни и корневища девясила высокого (<i>Inulaehelenii rhizomataet radices</i>) | 13 | 6 | 5 | 95 | 2,571 | 23,3 | 0,90 | 0,90 | 0,94 | 4,03 |

* – ошибка анализа

Анализ данных Таблицы 78 позволяет сделать вывод о перспективности использования осадителя, состоящего из ацетона с добавкой муравьиной кислоты, для целей анализа растительного материала на содержание полисахаридов. Очевидно, что метрологические характеристики гравиметрической методики можно улучшить посредством увеличения навески анализируемого материала. Однако для этого потребуется применение больших сосудов для высаживания и центрифуги, которая позволила бы отфуговывать большие объемы жидкостей с взвешенным в них осадком.

5.4. Определение глюкозамин сульфата методом ВЭЖХ/МС в геле для наружного применения

Для определения глюкозамина сульфата – субстанции получаемой переработкой панцирей морских ракообразных, наиболее часто используют спектрофотометрическую методику, где в качестве окрашивающего реагента выступает ацетилацетон. Тем не менее, данную методику нельзя признать удовлетворительной, так как она является маловоспроизводимой – при попытках определения аналита в геле ошибки определения достигали 20-30 %. Очевидной заменой представляется метод ВЭЖХ/УФ, который рекомендуется в USP [306] для определения данного аналита на длине волны 195 нм. Однако использование классических УФ-детекторов в данном случае затруднено из-за отсутствия активно поглощающих свет групп, дополнительное введение которых в молекулу не всегда проходит легко и количественно. Реальной альтернативой является метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектором, не требующий введения хромофорных групп. При разработке масс-спектрометрической методики предварительно был зарегистрирован масс-спектр в режиме положительных ионов в присутствии добавки муравьиной кислоты. Условия работы масс-детектора при этом были следующие: давление газа на распылителе – 40 psi, осушающий газ – азот (320°C, скорость – 10 л/мин), напряжение на капилляре – 4 кВ, на фрагменторе – 135 В. Типичный масс-спектр глюкозамин сульфата представлен на Рисунке 90.

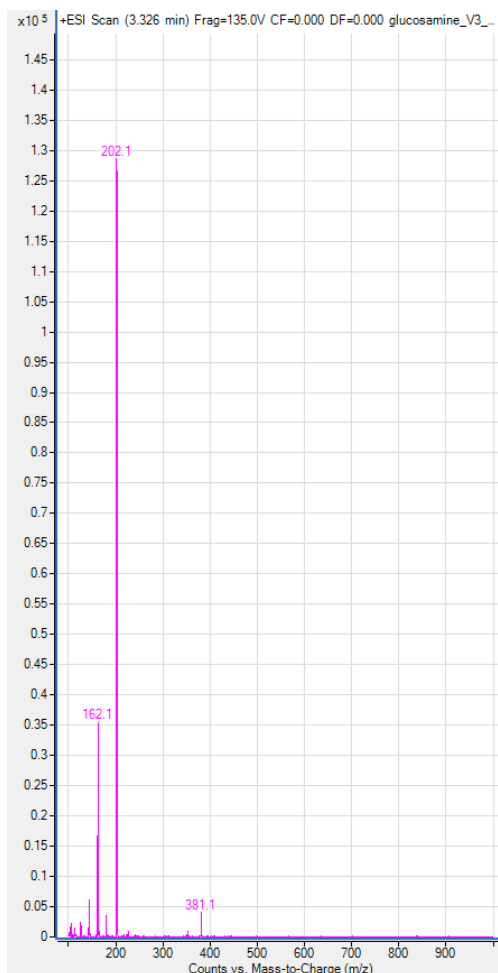


Рисунок 90 – Типичный масс-спектр глюкозамин сульфата

Сигнал $m/z = 202$ Да (родительский ион) соответствует положительно заряженной молекуле, причем заряд обеспечивается катионом натрия $[M+Na]^+$, входящего в состав молекулы глюкозамин сульфата. В условиях регистрации спектра катион натрия быстро обменивается с протоном, источником которого является добавка муравьиной кислоты. В результате наблюдается выброс молекулы воды из родительского иона. Подобный процесс приводит к образованию дочернего иона с $m/z = 162$ Да $[M-H_2O+H]^+$, который может иметь как Структуру 1 (протонируется гидроксильная группа при аномерном центре, поскольку она является наиболее химически активной по сравнению с остальными ОН-группами в молекуле сахаров [65]), так и Структуру 2 (Рисунок 91), в которой заряд локализован на аминогруппе. Квантово-химическая оценка (метод РМ3) энтальпий образования двух возможных структур выявила следующее: энтальпия образования Структуры 1 ($H_f^0=0,24$ Eh) практически в 2 раза выше энтальпии

образования Структуры 2 ($H^0_f=0,12$ Eh), что говорит о термодинамической выгодности образования Структуры 2 по сравнению со Структурой 1. По этой причине, наиболее вероятным будет процесс масс-фрагментации, включающий образование заряженной/протонированной аминогруппы не только в исходной молекуле глюкозамина, но и в дочернем ионе. Оптимизированные структуры 1 и 2 дочернего иона представлены на Рисунках 92 и 93.

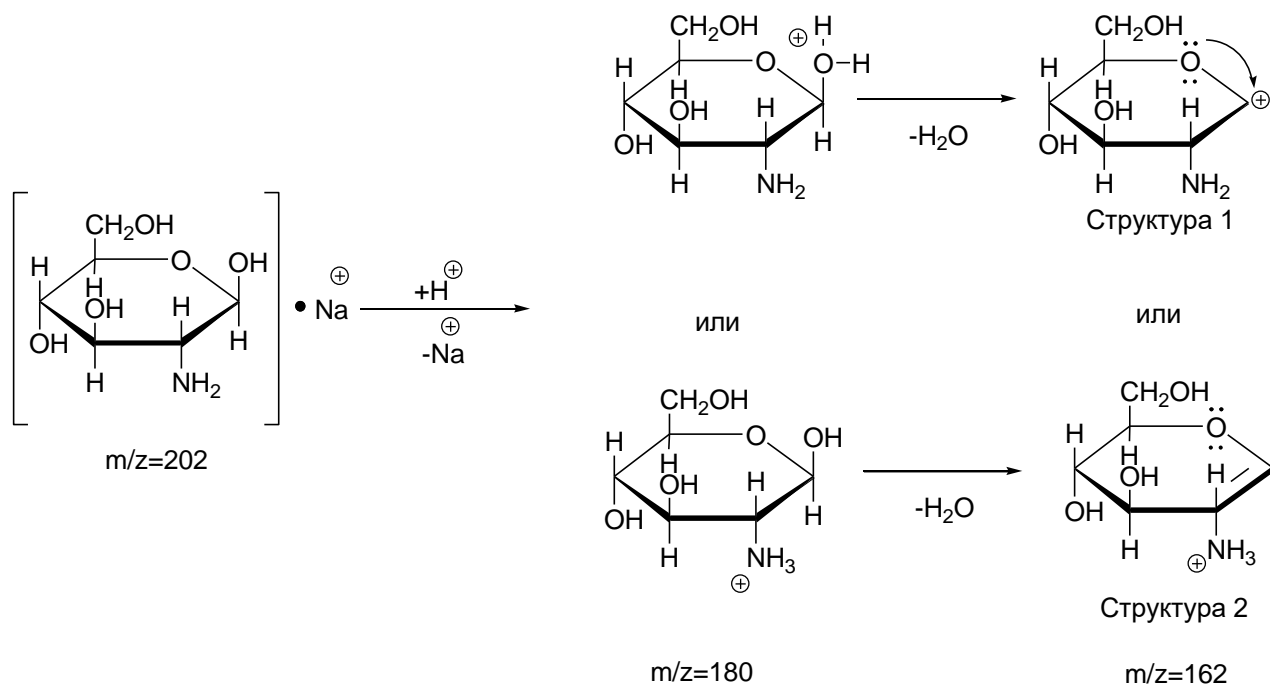


Рисунок 91 – Схема фрагментации молекулы глюкозамина сульфата

Исходя из схемы, представленной на Рисунке 93, и вида масс-спектра (Рисунок 90) в качестве аналитического был выбран сигнал $m/z = 202$, в качестве подвижных фаз – 0,1 % раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил. «Стандартный раствор готовился следующим образом: около 40 мг (точная навеска) СО глюкозамин сульфата натриевой соли помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяли в воде при перемешивании, довели объем раствора водой до метки и перемешивали.

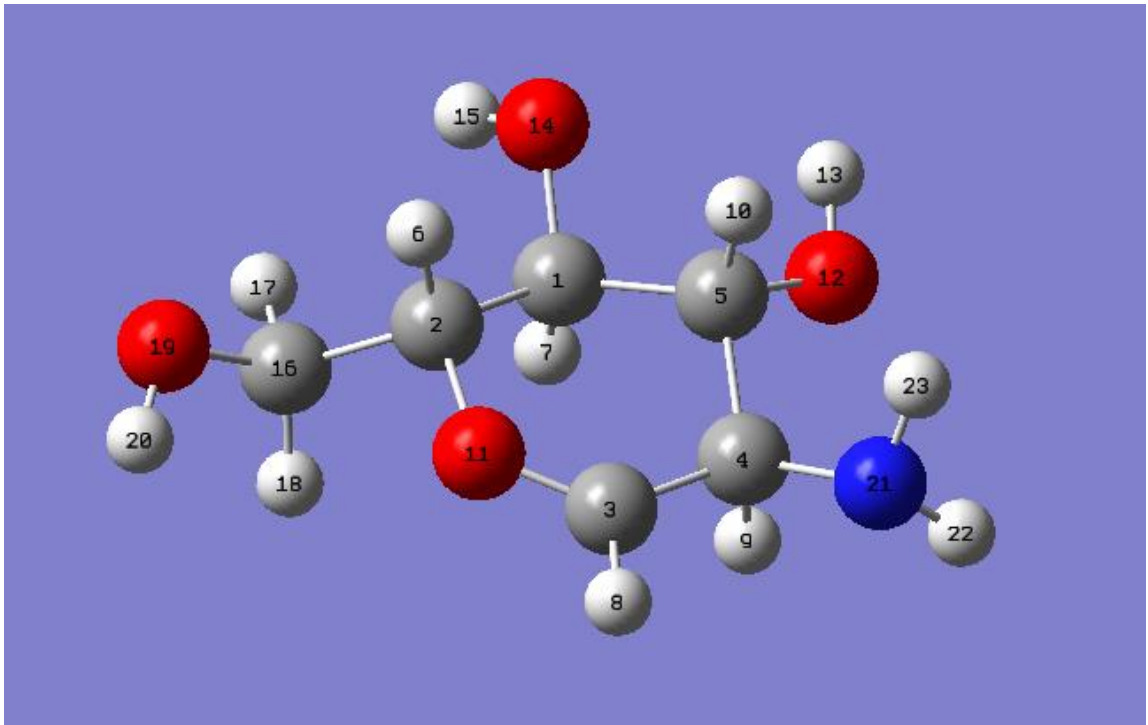


Рисунок 92 – Оптимизированная Структура 1

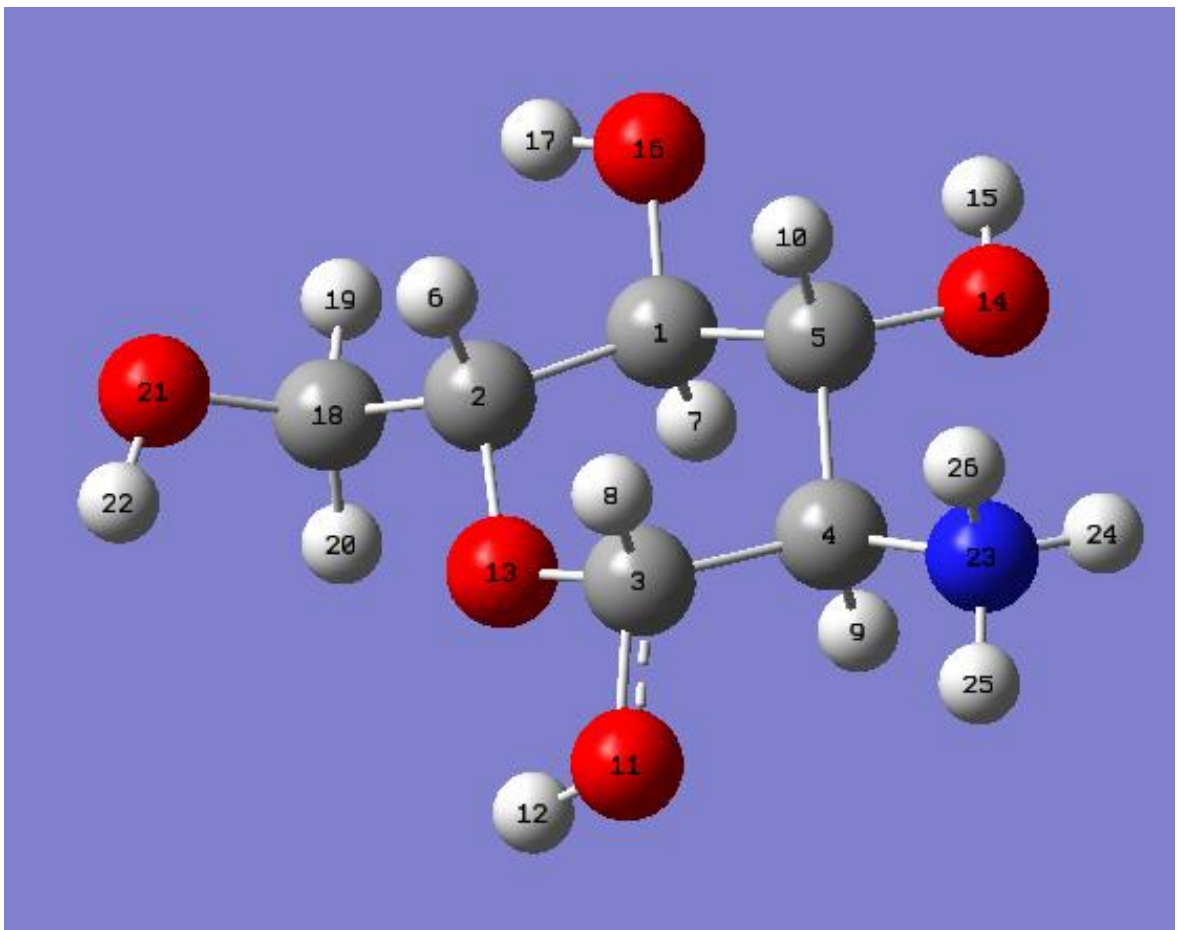


Рисунок 93 – Оптимизированная Структура 2

Испытуемый раствор: около 0,5 г (точная навеска) препарата помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяли в воде при перемешивании, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали» (Раменская Г. В., 2021, Приложение Г).

Предварительными экспериментами было установлено, что наилучшая форма пика достигается при использовании хроматографической колонки марки Protecol C18 HPH125. С использованием этой колонки были выбраны следующие условия хроматографического разделения:

Таблица 79 – Хроматографические условия

| | | | |
|------------------------------|---|---------|---------|
| Рабочий режим | MS2 Scan; | | |
| Колонка | Protecol C18 HPH125, 250 × 4,6 мм, 5 мкм; | | |
| Подвижная фаза | ПФ А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты; ПФ Б: ацетонитрил; | | |
| Скорость потока | 0,7 мл/мин; | | |
| Температура колонки | 35 °С; | | |
| Давление газа на распылителе | 40 psi; | | |
| Объём вводимой пробы | 10 мкл; | | |
| Температура осушающего газа | 320° С | | |
| Скорость осушающего газа | 10 л/мин | | |
| Напряжение на капилляре | 4 кВ; | | |
| Время хроматографирования | 25 мин | | |
| Градиент | Время, мин | ПФ А, % | ПФ В, % |
| | 4 | 90 | 10 |
| | 5 | 50 | 50 |
| | 10 | 50 | 50 |
| | 12 | 10 | 90 |
| | 20 | 10 | 90 |
| | 22 | 90 | 10 |
| | 25 | 90 | 10 |

Хроматограммы регистрировали в режиме положительных ионов по полному ионному току (TIC). Из кривой TIC выделяли аналитический сигнал путем экстракции составляющей с $m/z = 202$ Да. При разработке методики необходимо использование внутреннего стандарта в силу особенностей масс-

спектрометрического детектирования аналитического сигнала, в частности зависимости последнего от состояния распыляющей иглы (способна засоряться продуктами разложения), загрязнения внутренних компонентов масс-спектрометра в процессе анализа (падение чувствительности) и т. д. Однако применения внутреннего стандарта при определении аминсахара – глюкозамина в лекарственном препарате можно избежать, поскольку гель по сравнению с растительным объектом имеет относительно простой состав и риск загрязнения распыляющей иглы и других компонентов масс-спектрометрического детектора невелик.

Типичные хроматограммы растворителя, плацебо, стандартного раствора и испытуемого раствора приведены на Рисунках 94-97.

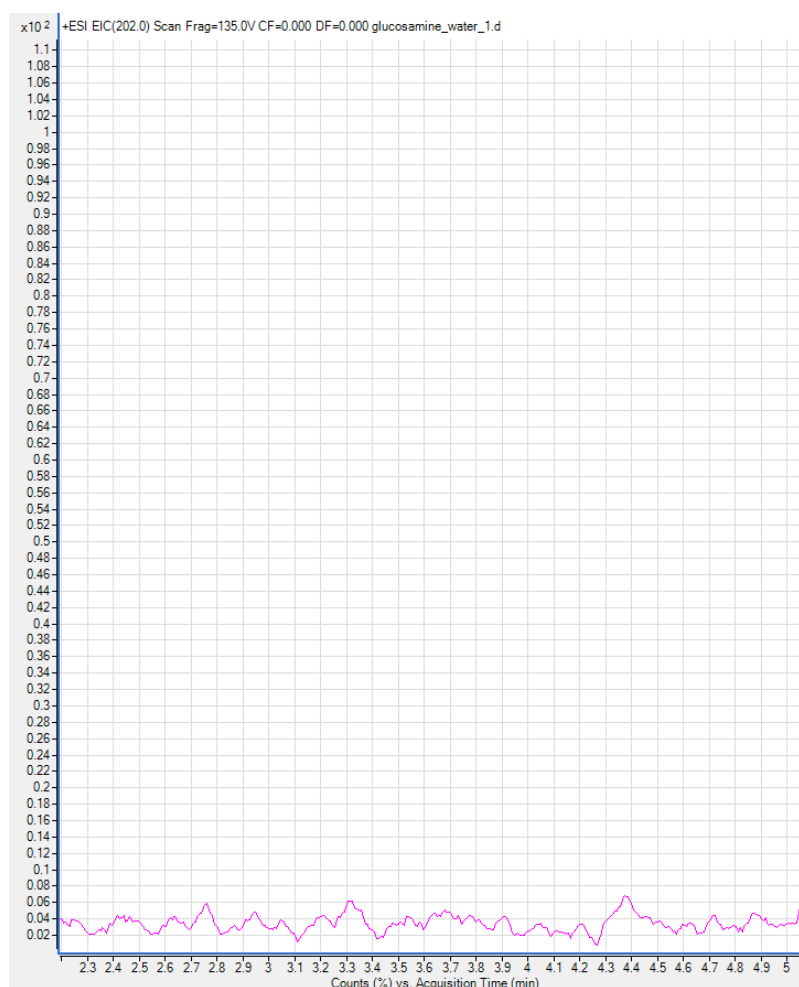


Рисунок 94 – Типичная хроматограмма растворителя

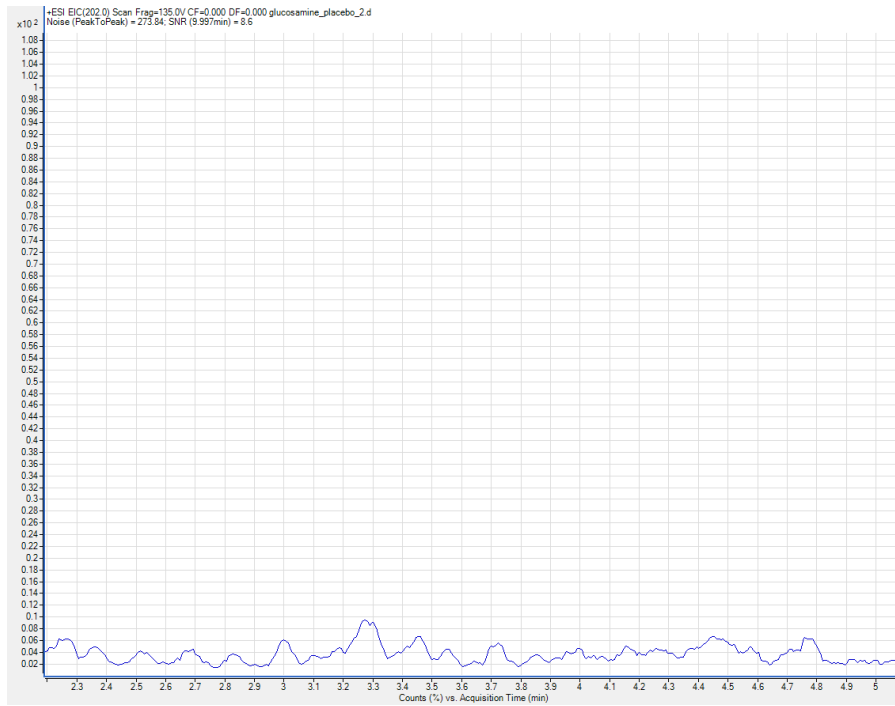


Рисунок 95 – Типичная хроматограмма раствора плацебо

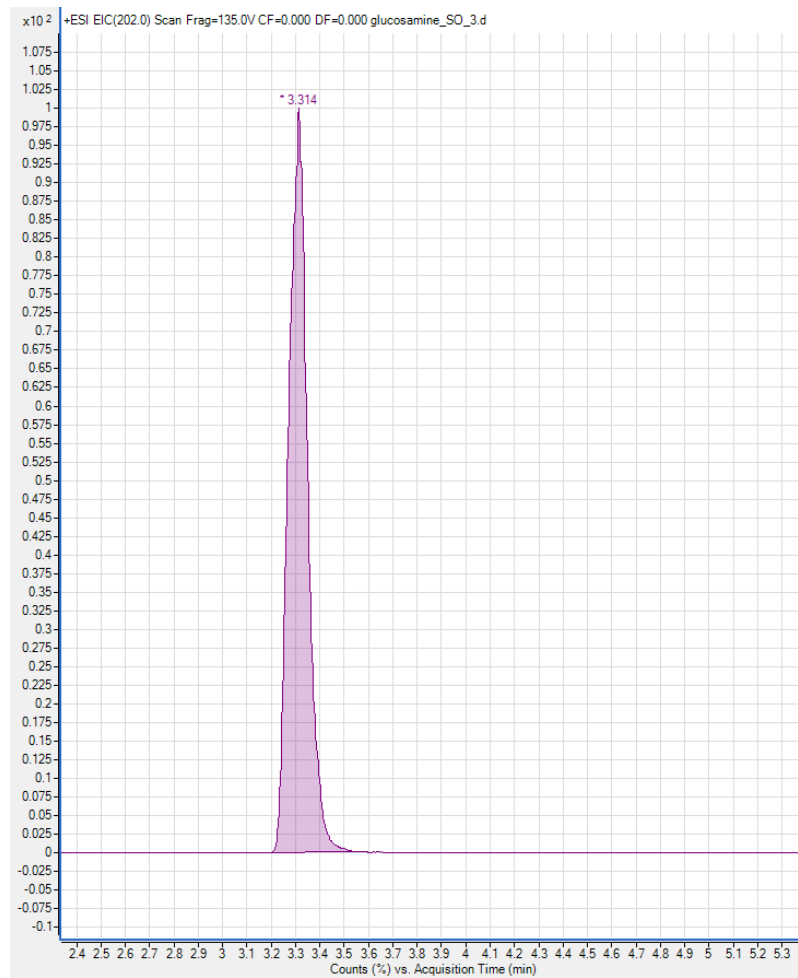


Рисунок 96 – Типичная хроматограмма стандартного раствора

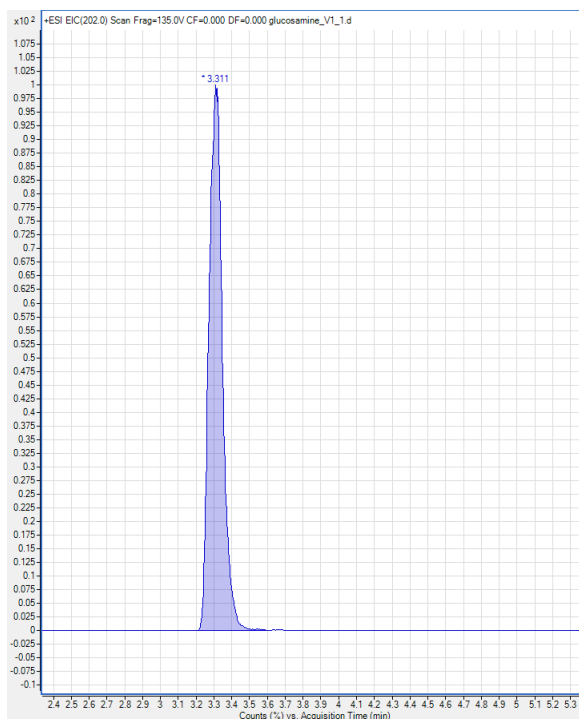


Рисунок 97 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора

Времена удерживания глюкозамин сульфата на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора приведены в Таблице 80.

Таблица 80 – Специфичность методики определения глюкозамин сульфата ([55] – результаты получены автором)

| <i>Измерение</i> | <i>Стандартный раствор</i> | <i>Испытуемый раствор</i> | <i>Совпадение, %</i> |
|------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| RT ₁ | 3,31 | 3,33 | 100,6 |
| RT ₂ | 3,31 | 3,34 | 100,9 |
| RT ₃ | 3,32 | 3,33 | 100,3 |

Анализ данных Таблицы 80 показывает, что «времена удерживания пика глюкозамин сульфата на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов совпадают с точностью более 99,0 %, анализ хроматограмм на Рисунках 102-105 позволило сделать вывод о отсутствии влияния растворителя и плацебо на аналитический сигнал определяемого вещества.

При изучении ППХС были получены хроматограммы стандартного раствора. Значения времен удерживания (RT, мин), площадей пиков (S), асимметрии пиков (As) и числа теоретических тарелок (NTP), а также средние значения и

коэффициенты вариации времен удерживания, площадей пиков ($n = 5$) представлены в Таблице 81» (Никифорова М. В., 2020, Приложение Г).

Таблица 81 – Параметры пригодности хроматографической системы ([55] – результаты получены автором)

| <i>Измерение</i> | <i>RT</i> | <i>S</i> | <i>As</i> | <i>NTP</i> |
|---|-----------|------------|-----------|------------|
| 1 | 3,31 | 4568778,79 | 0,80 | 9480,97 |
| 2 | 3,31 | 4933700,55 | 0,89 | 10486,18 |
| 3 | 3,31 | 4862265,33 | 1,08 | 8026,37 |
| 4 | 3,32 | 5041794,52 | 0,92 | 9775,49 |
| 5 | 3,31 | 4894107,77 | 1,08 | 9035,04 |
| Среднее значение | 3,31 | 4860129,39 | 0,95 | 9360,81 |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{\sigma},\%}$), % | 0,14 | 3,63 | – | – |

Данные, представленные в Таблице 81, показывают, что число теоретических тарелок, вычисленное посредством интегрирования пика глюкозамин сульфата на хроматограммах стандартного раствора, составило более 3000, фактор асимметрии пика – 0,95, коэффициент вариации времени для значений времен удерживания на хроматограммах стандартного раствора глюкозамина при ($n = 5$) – 0,14 %, площадей пиков – 3,63 %.

Изучение линейности проводилось посредством приготовления стандартных растворов глюкозамин сульфата с диапазоном содержания определяемого вещества от 80 % до 120 % с шагом 10 %. Результаты представлены в Таблице 82.

Таблица 82 – Оценка линейности определения глюкозамин сульфата ([55] – результаты получены автором)

| <i>№</i> | <i>S₁</i> | <i>S₂</i> | <i>S₃</i> | <i>S_{ср.}</i> | <i>C, мг/мл</i> |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
| 1 | 3750346,90 | 3760409,74 | 3828299,10 | 3779685,25 | 0,128 |
| 2 | 4068478,26 | 3993160,49 | 4034409,89 | 4032016,21 | 0,144 |
| 3 | 4381879,91 | 4400299,21 | 4298830,49 | 4360336,54 | 0,160 |
| 4 | 4500691,89 | 4565985,91 | 4695989,18 | 4587555,66 | 0,176 |
| 5 | 4855707,80 | 4919474,20 | 4829051,98 | 4868077,99 | 0,192 |

На основании данных Таблицы 82 построен график зависимости аналитического сигнала от концентрации глюкозамин сульфата (Рисунок 98).

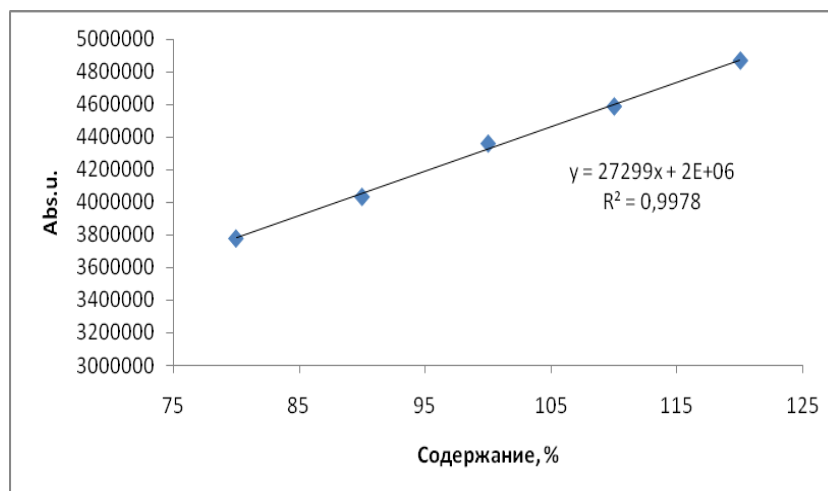


Рисунок 98 – Зависимость аналитического сигнала от концентрации глюкозамина сульфата в растворе

Рисунок 98 демонстрирует линейную зависимость между площадью пика аналита и его содержанием в анализируемом растворе, поскольку коэффициент корреляции составляет 0,9985.

Правильность методики количественного определения глюкозамина доказывали методом добавок, путем прибавления точного количества СО глюкозамина сульфата. Показатель правильности оценивали путем расчета открываемости.

Результаты исследования правильности представлены в Таблице 83.

Таблица 83 – Правильность определения глюкозамин сульфата ($a_0 = 39,5$ мг, $S_0 = 4612421,04$ abs.u) ([55] – результаты получены автором)

| Объем раствора добавки, мл | Заложено, мг | Площадь пика, abs.u | Найдено, мг | Открываемость, % |
|----------------------------|--------------|---------------------|-------------|------------------|
| 8,0 | 32,0 | 3908019,45 | 33,5 | 104,7 |
| 8,0 | 32,0 | 3901700,93 | 33,4 | 104,4 |
| 8,0 | 32,0 | 3916360,75 | 33,5 | 104,7 |
| 10,0 | 40,0 | 4680774,26 | 40,1 | 100,2 |
| 10,0 | 40,0 | 4727461,77 | 40,5 | 101,3 |
| 10,0 | 40,0 | 4631370,01 | 39,7 | 99,2 |

Продолжение таблицы 83

| | | | | |
|--|------|------------|------|-------------------|
| 12,0 | 48,0 | 5667177,54 | 48,5 | 101,0 |
| 12,0 | 48,0 | 5453029,05 | 46,7 | 97,3 |
| 12,0 | 48,0 | 5383537,49 | 46,1 | 96,0 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты</i> |
| Наименьшее значение, % | | | | 96,0 |
| Наибольшее значение, % | | | | 104,7 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 100,4 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 3,16 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{0}}$) | | | | 1,05 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | | | | 3,15 |
| Доверительный интервал (ΔX , P=0,95) | | | | 2,43 |

Анализ данных Таблицы 83 показывает, что правильность количественного определения глюкозамин сульфата лежит в диапазоне от 95,0 до 105,0 %, коэффициент вариации составил 2,43 %.

Для исследования повторяемости рассчитывали коэффициент вариации в испытуемом растворе (n = 6). Результаты приведены в Таблице 84.

Таблица 84 – Оценка повторяемости методики количественного определения глюкозамин сульфата ([55] – результаты получены автором) (n = 6, P = 0,95)

| S | Содержание, % | \bar{X} , % | Станд. отклон. | Коэффициент вариации, % | Доверительный интервал |
|--|---------------|---------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| 4762958,44 | 7,83 | 7,62 | 0,12 | 1,48 | 0,13 |
| 4849702,90 | 7,46 | | | | |
| 5001532,59 | 7,62 | | | | |
| 4334702,52 | 7,54 | | | | |
| 4961480,94 | 7,64 | | | | |
| 5146173,44 | 7,63 | | | | |
| CO | | | S₀ | | |
| 1 | | | 4568778,79 | | |
| 2 | | | 4933700,55 | | |
| 3 | | | 4862265,33 | | |
| 4 | | | 5041794,52 | | |
| 5 | | | 4894107,77 | | |
| Среднее значение | | | 4860129,392 | | |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | | | 3,63 | | |

По данным Таблицы 84 рассчитана относительная погрешность методики количественного определения глюкозамин сульфата, которая составляет 1,71 %.

Методика

Приготовление подвижных фаз, стандартного и испытуемого растворов количественного определения глюкозамина сульфата в геле приведена в Таблице 85.

Таблица 85 – Методика количественного определения глюкозамин сульфата в геле для наружного применения методом ВЭЖХ/МС с содержанием аналита 7,0 – 9,0 %: приготовление растворов ([55] – методика разработана автором)

| <i>Этап</i> | <i>Описание этапа</i> |
|----------------------------|--|
| <i>Подвижная фаза А</i> | 0,9 мл муравьиной кислоты растворяют в 900 мл воды очищенной при перемешивании |
| <i>Подвижная фаза Б</i> | ацетонитрил |
| <i>Стандартный раствор</i> | Около 40 мг (точная навеска) СО глюкозамина сульфата натриевой соли помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация глюкозамина сульфата <i>около 0,16 мг/мл</i>). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Испытуемый раствор</i> | Около 0,5 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация глюкозамина сульфата <i>около 0,16 мг/мл</i>). Раствор используют свежеприготовленным |

Хроматографические условия приведены в Таблице 79. Время удерживания пика глюкозамина сульфата в этих условиях – около 3,3 мин.

Регистрируют хроматограммы в режиме положительных ионов по полному ионному току (TIC). Обработывают аналитические сигналы путем анализа зависимости значения TIC от времени регистрации хроматограммы. Аналитический сигнал выделяют из TIC путем экстракции иона с $m/z = 202$. Сигнал интегрируют.

«Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверка ППХС. Хроматографируют стандартный раствор глюкозамин сульфата не менее 5 раз. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику глюкозамина сульфата *не менее 3000 теоретических тарелок*;
- фактор асимметрии пика глюкозамин сульфата *не менее 0,8 и не более 1,5*;
- относительное стандартное отклонение площади пика глюкозамин сульфата ($n \geq 5$) *не более 4 %*, времени удерживания *не более 2 %*.

Хроматографируют испытуемый раствор не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы» (Никифорова М. В., 2020, Приложение Г). Содержание глюкозамин сульфата ($C_{12}H_{28}N_2O_{14}S \times 2 NaCl$) в препарате, в процентах (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 250 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 250 \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a};$$

где S – площадь пика глюкозамин сульфата на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика глюкозамин сульфата на хроматограммах стандартного раствора;

a_0 – навеска СО глюкозамин сульфата, г;

a – навеска препарата, г;

P – содержание основного вещества в СО глюкозамин сульфата, %.

На основании полученных данных была разработана ВЭЖХ/МС-методика глюкозамин сульфата в геле, разработанном в ЦКП (НОЦ) РУДН с содержанием аналита от 7,0 до 9,0 %.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана унифицированная методика количественного определения суммы восстанавливающих сахаров на основе метода Дюбуа (фенол-серноокислый метод). Выбраны условия извлечения определяемых веществ из субстанций растительного происхождения. В отличие от методик, изложенных в ГФ XIV, разработанная методика не требует применения сложных (антрон) или взрывоопасных (пикриновая кислота) реактивов, нагревания реакционной смеси для развития окрашивания – реакция идет при комнатной температуре. Оценены основные метрологические характеристики посредством исследования

специфичности, линейности, правильности, повторяемости. Унифицированность разработанной методики доказана посредством анализа различного полисахаридсодержащего ЛРС: листьев мать-и-мачехи, листьев подорожника большого, цветков липы, семян льна, травы фиалки, корней алтея, корней лопуха, корней одуванчика, корней и корневищ девясила. Рекомендуемые нормы для ЛРС, где определяется сумма восстанавливающих сахаров (с пикриновой кислотой) совпадают с нормами, приведенными в ГФ XIV для листьев мать-и-мачехи и нуждаются в пересмотре для цветков липы, что является объектом дальнейших исследований.

2. Проведены квантово-химические исследования процессов, происходящих в процессе развития окраски. Показано, что образование молекулы красителя, обуславливающего поглощение на аналитической длине волны, из молекулы сахара протекает в несколько последовательных стадий: дегидротация молекулы сахара, приводящей к метоксигидроксифурфуролу, который далее реагирует с серной кислотой с образованием сульфэфира, разлагающегося далее до сернистой кислоты и соответствующего реакционноспособного фурфурола. Последний последовательно реагирует с двумя молекулами фенола, давая краситель-аналит.

3. Для получения достаточно чистых осадков предложено высаживать полисахариды из извлечения, пропущенного через картридж «Диапак Амин», сорбент которого содержит аминогруппы, а также обработанного окисью алюминия в статических условиях (доочистка извлечения). В качестве универсального осадителя для полисахаридов был предложен ацетон с добавкой коагулянта. В качестве коагулянта использована муравьиная кислота, которая может быть легко удалена в процессе сушки осадков полисахаридов. Удовлетворительная чистота гравиметрической формы подтверждена регистрацией ИК-спектров. Универсальность подтверждена на примере полисахаридов, выделенных из листьев мать-и-мачехи, листьев подорожника большого, цветков липы, семян льна, травы фиалки, корней алтея, корней лопуха, корней одуванчика, корней и корневищ девясила. Полученный подход

апробирован для количественного определения полисахаридов в субстанциях природного происхождения.

4. Разработана методика количественного определения глюкозамин сульфата – сырья, получаемого переработкой хитинового покрова морских животных, в геле для наружного применения, с использованием метода ВЭЖХ/МС. Исследованы правильность, линейность, повторяемость, специфичность разработанной методики и продемонстрированы ее удовлетворительные метрологические характеристики. С использованием квантово-химических методов была предложена структура дочернего иона, образующегося в результате распада родительского иона – однократно заряженной молекулы глюкозамин сульфата.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРБУТИНА, АНТОЦИАНОВ В ЛРС МЕТОДОМ ВЭЖХ/МС/УФ

6.1. Определение арбутина методом ВЭЖХ/МС в листьях толокнянки

Учитывая приведенные в литературном обзоре сведения об имеющихся методах, используемых для определения арбутина, их достоинствах и недостатках, в качестве наиболее перспективного метода был выбран ВЭЖХ. Для учета возможных флуктуаций аналитических сигналов в методе ВЭЖХ/МС (MRM) при определении действующих веществ в многокомпонентных ЛРС необходима добавка внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта необходимо применять соединения, которые удовлетворяли бы следующим требованиям: легкая доступность, относительная дешевизна, достаточно интенсивный распад родительского иона на дочерние ионы при выбранном режиме ионизации, эффективное разделение хроматографических пиков арбутина и внутреннего стандарта, растворимость в этиловом спирте и водно-спиртовых смесях, отсутствие в природных объектах. Таким требованиям удовлетворяет, например, фенолфталеин. Разработка осуществлялась на примере листьев толокнянки обыкновенной – сырья, содержащего наибольшее количество определяемого вещества.

Сигналы переходов с $m/z = 271-108$ Да (для арбутина) и $317-93$ Да (для фенолфталеина), отличающиеся наибольшей интенсивностью, были приняты в качестве аналитических сигналов. MRM-переходы с $m/z 271-161$ Да (для арбутина) и $317-273$ Да (для фенолфталеина) отличаются меньшей интенсивностью, что дает возможность дополнительно использовать их для качественной идентификации определяемого вещества. Условия определения представлены в Таблице 86.

Показано, что лучшего разделения удастся добиться на колонке Protocol C18 НРН 125 (250x4,6 мм, 5 мкм) по сравнению с колонкой Phenomenex Luna C18 (250x4,6 мм, 5 мкм); температура колонки – 30 °С. Предварительное экспериментальное исследование позволило сделать следующий вывод –

наилучшая форма пика достигается при использовании градиентного режима по сравнению с изократическим при применении в качестве подвижных фаз 0,063%-го раствора формиата аммония (ПФ А), ацетонитрила (ПФ В) и скорости потока элюента 0,5 мл/мин. Объем аликвоты составлял 10 мкл. Градиент представлен в Таблице 87.

Таблица 86 – Условия определения арбутина в режиме MRM ([61] – результаты получены автором)

| <i>Вещество</i> | <i>Родительский ион, Да</i> | <i>Дочерний ион, Да</i> | <i>Напряжение на фрагменторе, В</i> | <i>Энергия столкновительной ячейки, эВ</i> |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Фенолфталеин | 317 | 273 | 100 | 2 |
| Фенолфталеин | 317 | 93 | 100 | 5 |
| Арбутин | 271 | 161 | 150 | 5 |
| Арбутин | 271 | 108 | 120 | 40 |

Таблица 87 – Градиент, использованный в работе для хроматографического выделения арбутина ([61] – результаты получены автором)

| <i>Время, мин</i> | <i>ПФ А, %</i> | <i>ПФ В, %</i> | <i>Скорость потока, мл/мин</i> |
|-------------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| 0,00 | 90 | 10 | 0,5 |
| 3,00 | 90 | 10 | 0,5 |
| 10,00 | 10 | 90 | 0,5 |
| 15,01 | 10 | 90 | 0,5 |
| 15,10 | 90 | 10 | 0,5 |
| 20,00 | 90 | 10 | 0,5 |

Аналитический сигнал выделяли путем экстракции MRM-переходов между соответствующими родительскими и дочерними ионами. В процессе разработки методики были приготовлены «раствор внутреннего стандарта и стандартный раствор. Приготовление растворов указано ниже.

Раствор внутреннего стандарта: около 1 г (точная навеска) фенолфталеина вносили в мерную колбу объемом 100 мл, растворяли в 80 мл 95% этилового спирта; объем раствора доводили до метки тем же растворителем.

Стандартный раствор: около 0,1 г (точная навеска) СО арбутина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 40 % водном этаноле, доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали; 1 мл полученного раствора вносили в мерную колбу объемом 10 мл, добавляли 0,1 мл

внутреннего стандарта, объем раствора довели до 40 % водным этанолом, перемешивали» (Раменская Г. В., 2021, Приложение Г).

Хроматограммы (MRM-переходы 317–271 Да и 317–93 Да для фенолфталеина, 271–161 Да и 271–108 Да для арбутина) стандартного раствора и внутреннего стандарта, представлены на Рисунках 99–102.

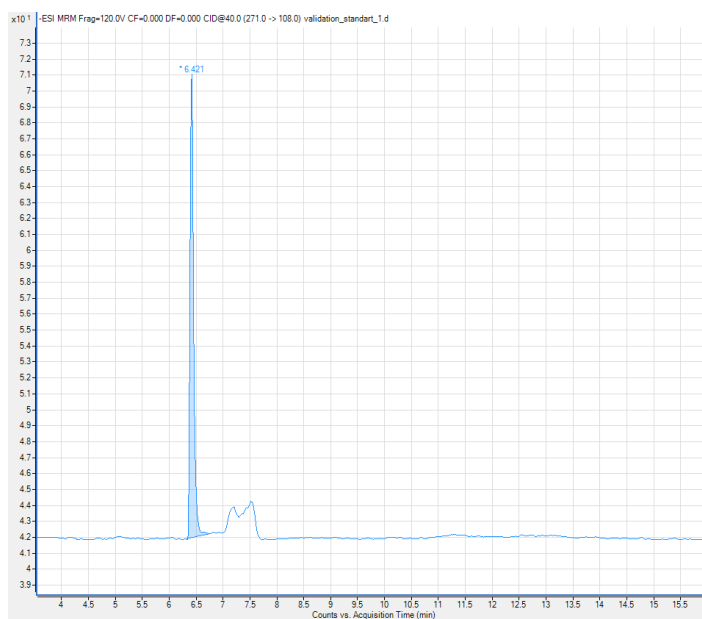


Рисунок 99 – Хроматограмма стандартного раствора арбутина (MRM-переход 271–108 Да)



Рисунок 100 – Хроматограмма фенолфталеина (MRM-переход 317–93 Да)

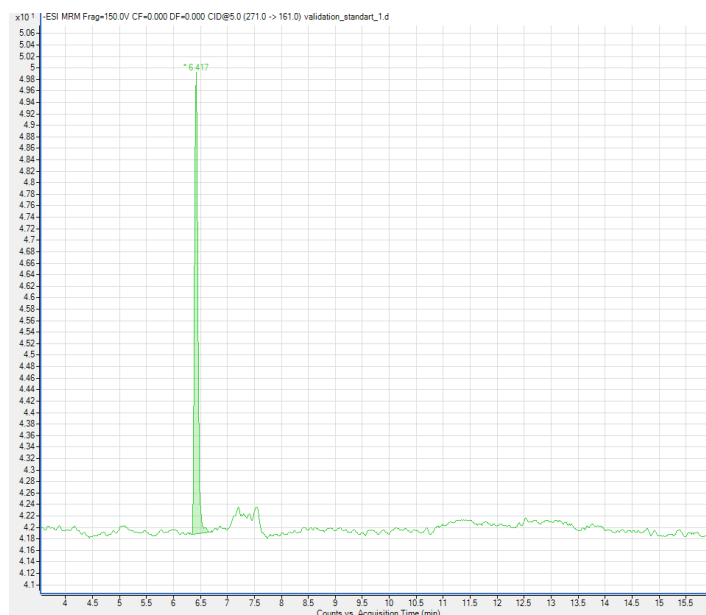


Рисунок 101 – Хроматограмма стандартного раствора арбутина (MRM-переход 271–161 Да)

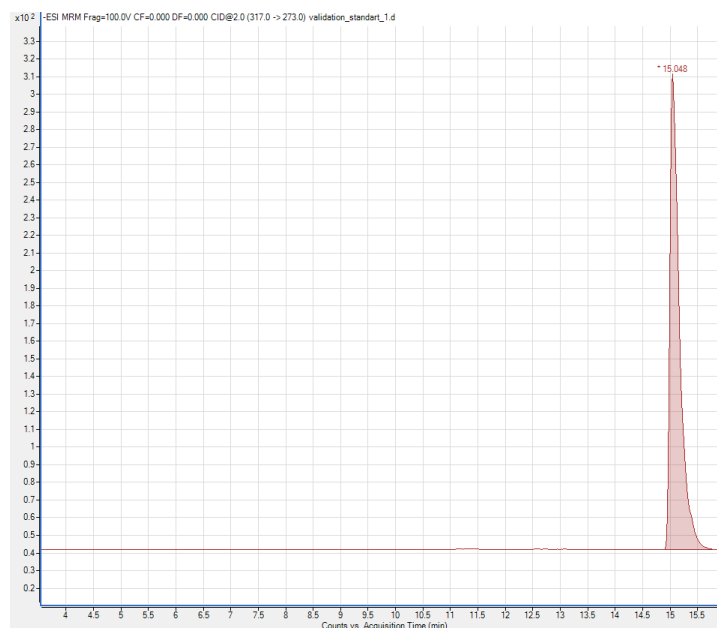


Рисунок 102 – Хроматограмма фенолфталеина (MRM-переход 317–273 Да)

С помощью выбранных условий было исследовано влияние степени измельчения листьев толокнянки на извлечение арбутина (Таблица 88).

Таблица 88 – Влияние степени измельчения листьев толокнянки (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*) на извлечение арбутина ([61] – результаты получены автором)

| Степень измельчения, мм | Извлечение арбутина, % |
|-------------------------|------------------------|
| 5 | 8,35±0,32 |
| 3 | 8,41±0,20 |
| 2 | 8,60±0,06 |
| 1 | 9,53±0,84 |

Из приведенных в Таблице 88 данных видно, что наиболее полное извлечение арбутина достигается при степени измельчения сырья 1 мм. Остальные условия извлечения определяемого компонента из ЛРС были взяты из работы [38]. Таким образом, условия извлечения арбутина из листьев толокнянки представлены ниже:

- «степень измельчения – 1 мм;
- масса навески – 1 г;
- экстрагент – спирт 40 %;
- соотношение сырье:экстрагент – 1 : 110;
- температура – 100 °С (водяная баня);
- время извлечения – 60 мин.

На основании проведенных исследований испытуемый раствор готовился следующим образом. Около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещали в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 100 мл 40 % водного этанола и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч» (Марахова А. И., 2017, Приложение Г). Реакционную смесь охлаждали, фильтровали через пять слоев марли в мерную колбу объемом 250 мл. Объем раствора доводили 40 % водным этанолом и перемешивали. 2 мл полученного извлечения и 0,1 мл раствора внутреннего стандарта помещали в мерную колбу объемом 10 мл и доводили до метки 40 % водным этанолом, перемешивали.

Разрабатываемый метод определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной характеризуется высокой специфичностью, что было подтверждено отсутствием влияния растворителя на аналитический сигнал (см. Рисунок 103).

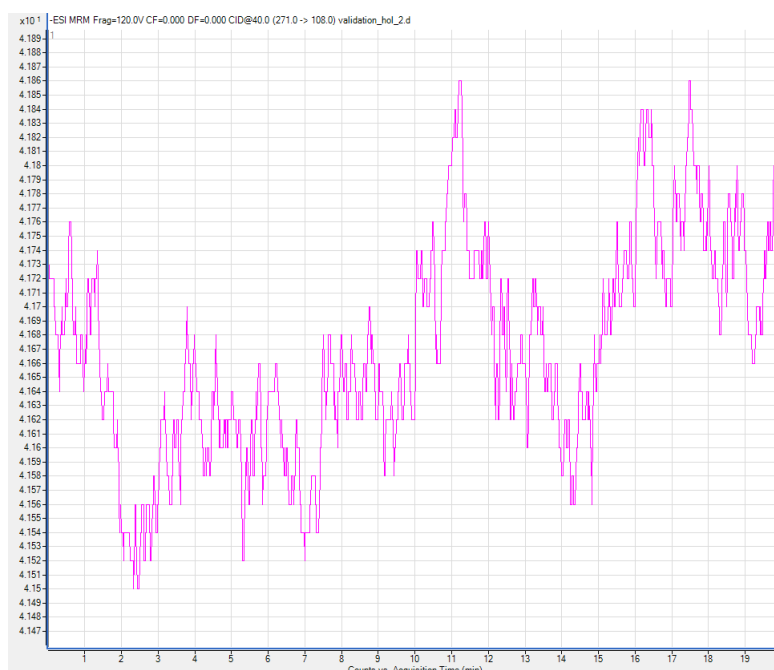


Рисунок 103 – Хроматограмма холостого раствора (MRM-переход 271–108 Да)

Времена удерживания арбутина на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора приведены в Таблице 89.

Таблица 89 – Времена удерживания пиков стандартного раствора арбутина и испытуемого раствора ([61] – результаты получены автором)

| <i>Измерение</i> | <i>Стандартный раствор</i> | <i>Испытуемый раствор</i> | <i>Совпадение, %</i> |
|------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| RT ₁ | 6,43 | 6,43 | 100,0 |
| RT ₂ | 6,43 | 6,43 | 100,0 |
| RT ₃ | 6,43 | 6,43 | 100,0 |

Из представленных данных видно, что время удерживания пика арбутина на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора совпадают с точностью 100 %. Пригодность хроматографической системы представлена в Таблице 90 (RT – время удерживания пика, S – площадь пика, As – коэффициент асимметрии пика, NTP – число теоретических тарелок).

Таблица 90 – Параметры пригодности хроматографической системы (MRM-переход 271→108 Да (арбутин)) ([61] – результаты получены автором)

| <i>Измерение</i> | <i>RT, мин</i> | <i>S, abs.u</i> | <i>As</i> | <i>NTP</i> |
|---|----------------|-----------------|-----------|------------|
| 1 | 6,43 | 170 | 1,33 | 4136 |
| 2 | 6,43 | 177 | 1,50 | 4136 |
| 3 | 6,43 | 165 | 1,50 | 3775 |
| 4 | 6,43 | 168 | 1,25 | 4137 |
| 5 | 6,43 | 167 | 1,30 | 4139 |
| Среднее значение | 6,43 | 169,4 | 1,38 | 4065 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{s},\%}$), % | 0 | 2,72 | – | – |

Анализ данных, представленных в Таблице 90, позволяет заключить, что «эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику арбутина, составляет не менее 3000 теоретических тарелок; фактор асимметрии пика – не менее 0,8 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение времени удерживания при $n = 5$ не превышает 2,0 %, площадей пиков – не более 4 %» (Никифорова М. В., 2020, Приложение Г).

Для исследования линейности готовили серию растворов СО арбутина. Концентрации варьировались от 5 до 200 мкг/мл. Данные, отражающие зависимость отношения площади пика арбутина к площади пика внутреннего стандарта от концентрации арбутина в анализируемом растворе, представлены в Таблице 91.

Таблица 91 – Оценка линейности определения арбутина ($S_{ст} = 17509,6667^*$) ([61] – результаты получены автором)

| <i>№</i> | S_1/S_{cm} | S_2/S_{cm} | S_3/S_{cm} | S_{cp}/S_{cm} | <i>C, мкг/мл</i> |
|----------|--------------|--------------|--------------|-----------------|------------------|
| 1 | 0,00040900 | 0,00040801 | 0,00040902 | 0,0004090 | 5 |
| 2 | 0,00081859 | 0,00081859 | 0,00081859 | 0,00081859 | 10 |
| 3 | 0,00211311 | 0,00211310 | 0,00211310 | 0,00211311 | 25 |
| 4 | 0,00397902 | 0,00397902 | 0,00397901 | 0,00397901 | 50 |
| 5 | 0,00746302 | 0,00746301 | 0,00746300 | 0,00746300 | 100 |
| 6 | 0,01526803 | 0,01526801 | 0,01526801 | 0,01526801 | 200 |

* - значение площади внутреннего стандарта

По полученным данным был построен график зависимости отношения площади пика раствора арбутина к площади пика внутреннего стандарта от концентрации определяемого вещества (Рисунок 104).

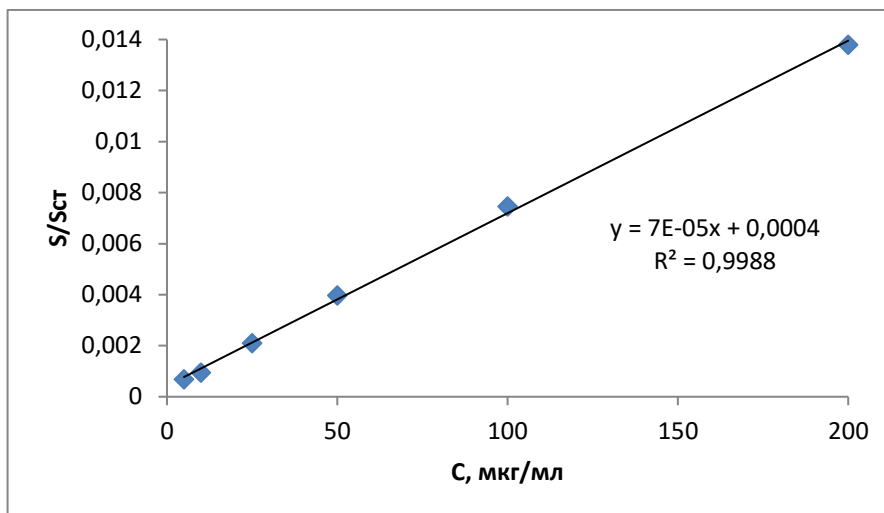


Рисунок 104 – График зависимости отношения S/Sct от концентрации арбутина

Из анализа графика 104 методом наименьших квадратов было установлено, что коэффициент корреляции составляет 0,9994. Это подтверждает линейную зависимость между отношением аналитических сигналов арбутина к аналитическому сигналу внутреннего стандарта и концентрацией аналита.

Правильность метода количественного определения арбутина доказывали методом добавок, путем прибавления точного количества определяемого вещества. Проводили по три параллельных определения для каждой добавки, прибавляя к анализируемому раствору точный объем раствора добавки арбутина. Показатель правильности оценивали путем расчета открываемости. Результаты определения правильности методики количественного определения арбутина в листьях толочнянки обыкновенной представлены в Таблице 92.

Таблица 92 – Правильность определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*) ($S/S_{ст} = 0,0044674$)* ([61] – результаты получены автором)

| Концентрация раствора добавки, мкг/мл | $S_{добавки}/S_{ст}$ | Ожидаемое $S/S_{ст}$ | Найдено $S/S_{ст}$ | Открываемость, % |
|--|----------------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| 25 | 0,0018677 | 0,0063351 | 0,0060233 | 95,1 |
| 25 | 0,0019410 | 0,0064084 | 0,0064167 | 100,1 |
| 25 | 0,0018715 | 0,0063389 | 0,0061542 | 97,1 |
| 50,0 | 0,0038068 | 0,0082742 | 0,0079770 | 96,4 |
| 50,0 | 0,0032446 | 0,0077120 | 0,0073293 | 95,0 |
| 50,0 | 0,0033002 | 0,0077676 | 0,0079559 | 102,4 |
| 100,0 | 0,0066444 | 0,0111118 | 0,0105651 | 95,1 |
| 100,0 | 0,0067181 | 0,0111855 | 0,0109002 | 97,5 |
| 100,0 | 0,0067590 | 0,0112264 | 0,0113407 | 101,0 |
| <i>Статистические характеристики</i> | | | | <i>Результаты</i> |
| Наименьшее значение, % | | | | 95,0 |
| Наибольшее значение, % | | | | 102,4 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 98,7 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 2,78 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{0}}$) | | | | 0,93 |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{0},\%}$), % | | | | 2,82 |
| Доверительный интервал (ΔX , P = 0,95) | | | | 2,14 |

* – в скобках приведены данные для арбутина, содержащегося в водном извлечении из листьев толокнянки; S – площадь пика арбутина на хроматограмме анализируемого раствора, $S_{ст}$ – площадь пика на хроматограмме внутреннего стандарта

Из представленных данных видно, что открываемость колеблется в диапазоне 95–105 %.

Повторяемость оценивали путем расчета коэффициента вариации по результатам количественного определения арбутина ($n = 6$) в испытуемом растворе. Результаты приведены в Таблице 93.

Таблица 93 – Оценка повторяемости методики количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*) (n = 6, P = 0,95) ([61] – результаты получены автором)

| S/S_{cm} | W, % | Содержание, % | \bar{X} , % | Станд. Откл. | Коэффициент вариации, % | Доверительный интервал |
|--|------|---------------|---------------|--------------|-------------------------|------------------------|
| 0,00446761 | 12 | 9,66 | 9,58 | 0,21 | 2,19 | 0,22 |
| 0,00433234 | | 9,38 | | | | |
| 0,00432357 | | 9,35 | | | | |
| 0,00452282 | | 9,78 | | | | |
| 0,00453575 | | 9,81 | | | | |
| 0,00433711 | | 9,38 | | | | |
| <i>CO</i> | | | | | S/S_{cm} | |
| 1 | | | | | 0,007804609 | |
| 2 | | | | | 0,008344333 | |
| 3 | | | | | 0,007677632 | |
| 4 | | | | | 0,007695479 | |
| 5 | | | | | 0,007833021 | |
| Среднее значение | | | | | 0,007870900 | |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | | 3,47 | |

Из представленных данных видно, что коэффициент вариации при количественном определении арбутина в листьях толокнянки обыкновенной методом ВЭЖХ/МС составляет 3,47 %.

Таким образом, разработанная методика демонстрирует удовлетворительные метрологические характеристики и пригодна для количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной. Методика применима в интервале концентраций от 5 до 200 мкг/мл арбутина в испытуемом растворе. Однако данная методика не может быть распространена для определения арбутина в субстанциях природного происхождения, содержащих арбутин на уровне менее 5–7 %, вследствие низкой чувствительности методики, обусловленной применением режима MRM. По этой причине унифицированная ВЭЖХ-методика для определения арбутина в ЛРС возможна только при использовании достаточно чувствительных УФ-детекторов.

Методика

Приготовление растворов для количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной методом ВЭЖХ/МС представлена в Таблице 94.

Таблица 94 – Приготовление раствора внутреннего стандарта, стандартного и испытуемого растворов при определении арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*) методом ВЭЖХ/МС ([61] – методика разработана автором)

| Этап | Описание этапа |
|--------------------------------------|---|
| <i>Раствор внутреннего стандарта</i> | Около 1 г (точная навеска) фенолфталеина вносят в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 80 мл 95 % этилового спирта. Объем раствора доводят до метки тем же растворителем (концентрация фенолфталеина <i>около 10 мг/мл</i>) |
| <i>Стандартный раствор</i> | растворяют в 40 % водном этаноле, доводят объем раствора до метки тем же растворителем до метки, перемешивают (концентрация арбутина <i>около 1000 мкг/мл</i>). 1 мл полученного раствора вносят в мерную колбу объемом 10 мл, добавляют 0,1 мл внутреннего стандарта. Объем раствора доводят 40 % водным этанолом, перемешивают (концентрация арбутина <i>около 100 мкг/мл</i>). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Испытуемый раствор</i> | Около 0,1 г (точная навеска) СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, Около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл 40 % водного этанола и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждают, фильтруют через пять слоев марли в мерную колбу объемом 250 мл. Объем раствора доводят 40% водным этанолом и перемешивают. 2 мл полученного извлечения и 0,1 мл раствора внутреннего стандарта помещают в мерную колбу объемом 10 мл и доводят до метки 40 % водным этанолом, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным |

Хроматографические условия приведены в таблице 87. Время удерживания пика арбутина в этих условиях – около 6,0 мин.

Регистрируют хроматограммы в режиме отрицательных ионов по полному ионному току (TIC). Аналитические сигналы получают путем экстракции MRM-переходов 271–108 Да (арбутин), 317–93 Да (фенолфталеин).

«Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка ППХС».

Проверка ППХС. Хроматографируют стандартный раствор не менее 5 раз. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику арбутина *не менее 3000 теоретических тарелок*;
- фактор асимметрии пика арбутина *не менее 0,8 и не более 1,5*;
- относительное стандартное отклонение площади пика арбутина ($n \geq 5$) *не более 4 %*, времени удерживания *не более 2 %*.

Хроматографируют испытуемый раствор не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы» (Теслев А. А., 2016, Приложение Г). Содержание арбутина в листьях толокнянки обыкновенной, в процентах (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S/S_{ст} \cdot 250 \cdot 10 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{S_0/S_{ст} \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 10 \cdot (100 - W) \cdot 100} \cdot 100 \% =$$

$$= \frac{\frac{S}{S_{ст}} \cdot a_0 \cdot 125 \cdot P}{\frac{S_0}{S_{ст}} \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 100} \cdot 100 \%;$$

где S – площадь пика арбутина на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика арбутина на хроматограммах стандартного раствора;

$S_{ст}$ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца;

a_0 – навеска СО глюкозамина сульфата, г;

a – навеска препарата, г;

P – содержание основного вещества в СО арбутина, %;

W – влажность сырья, %

В результате проведенных исследований была разработана ВЭЖХ/МС-методика количественного определения арбутина в ЛРС. Методика характеризуется достаточно низкой чувствительностью вследствие применения MRM-режима (для выделения аналитического сигнала), поэтому может быть использована только для анализа богатых арбутином природных объектов, например листьев толокнянки обыкновенной. Относительная погрешность методики составляет 2,30 %.

6.2. Квантово-химическое исследование процессов масс-фрагментации арбутина в условиях ионизации типа «Электроспрей»

Масс-спектр арбутина представлен на Рисунке 105. Из представленного масс-спектра видно, что сигнал с $m/z = 543$ Да соответствует депротонированному димеру арбутина, который весьма устойчив, за счет образования межмолекулярных водородных связей; сигнал с $m/z = 271$ Да – депротонированной молекуле арбутина (родительский ион), $m/z = 165$ и 161 Да – дочерние ионы, образующийся в результате распада родительского иона, которые представляют собой производное углеводной части молекулы арбутина; $m/z = 108$ Да – дочерний ион – производное гидрохинона.

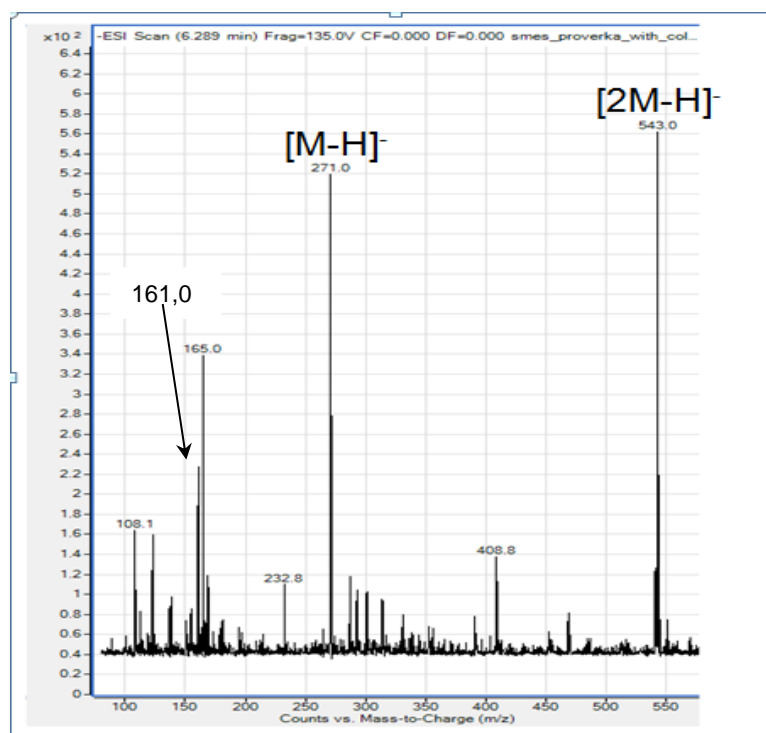


Рисунок 105 – Масс-спектр арбутина, зарегистрированный в режиме отрицательных ионов

На основе полученного масс-спектра можно предложить следующую схему масс-фрагментации (Рисунок 106).

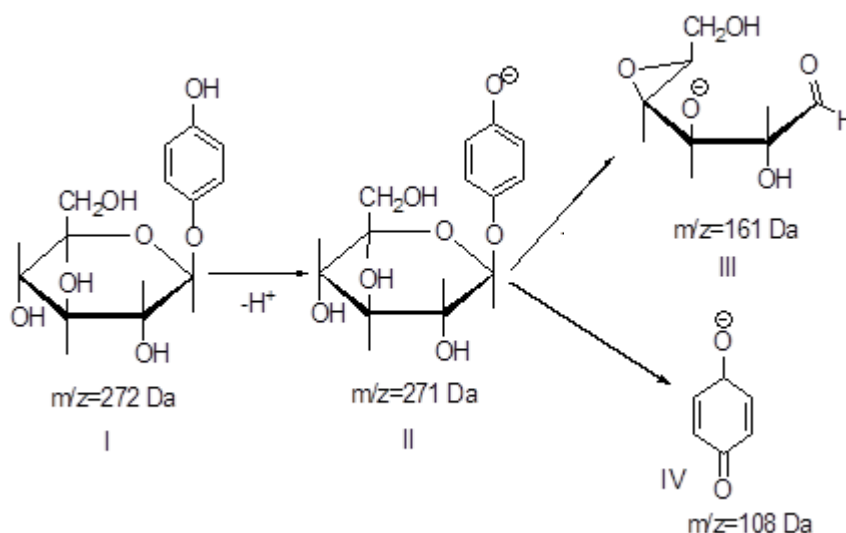


Рисунок 106 – Схема масс-фрагментации арбутина

Термодинамические параметры структур I, II, III и IV представлены в Таблице 95, где H_f° – стандартная энтальпия образования, C_v – молярная теплоемкость при постоянном объеме, S – стандартная энтропия образования.

Таблица 95 – Термодинамические параметры структур I, II, III и IV

| Структура | H_f° , Eh | C_v^{**} , Дж/(моль *K) | S^{***} , Дж/(моль *K) |
|-----------|------------------|---------------------------|--------------------------|
| I | -993,4 | 294,6 | 577,6 |
| II | -992,7 | 284,7 | 562,3 |
| III | -610,1 | 167,3 | 429,6 |
| IV | -381,3 | 114,8 | 355,4 |

* H_f° – стандартная энтальпия образования (Sum of electronic and thermal enthalpies); ** C_v – молярная теплоемкость при постоянном объеме; *** S – стандартная энтропия образования

Из анализа данных Таблицы 95 следует, что термодинамическая стабильность иона II в условиях регистрации масс-спектра сравнима с термодинамической стабильностью исходной молекулы I, поскольку разница в стандартных энтальпиях образования не превышает 1 Eh. Стабильность частицы II очевидно обеспечивается сильным положительным мезомерным эффектом со стороны отрицательно заряженного атома кислорода (3O) фенольного заместителя, распределяющим заряд атома 3O по кратным связям фенольного заместителя, находящегося при аномерном центре молекулы арбутина (Рисунок

107). На спектре, представленном на Рисунке 105, это проявляется в виде высокой интенсивности сигнала с $m/z = 271$ Да.

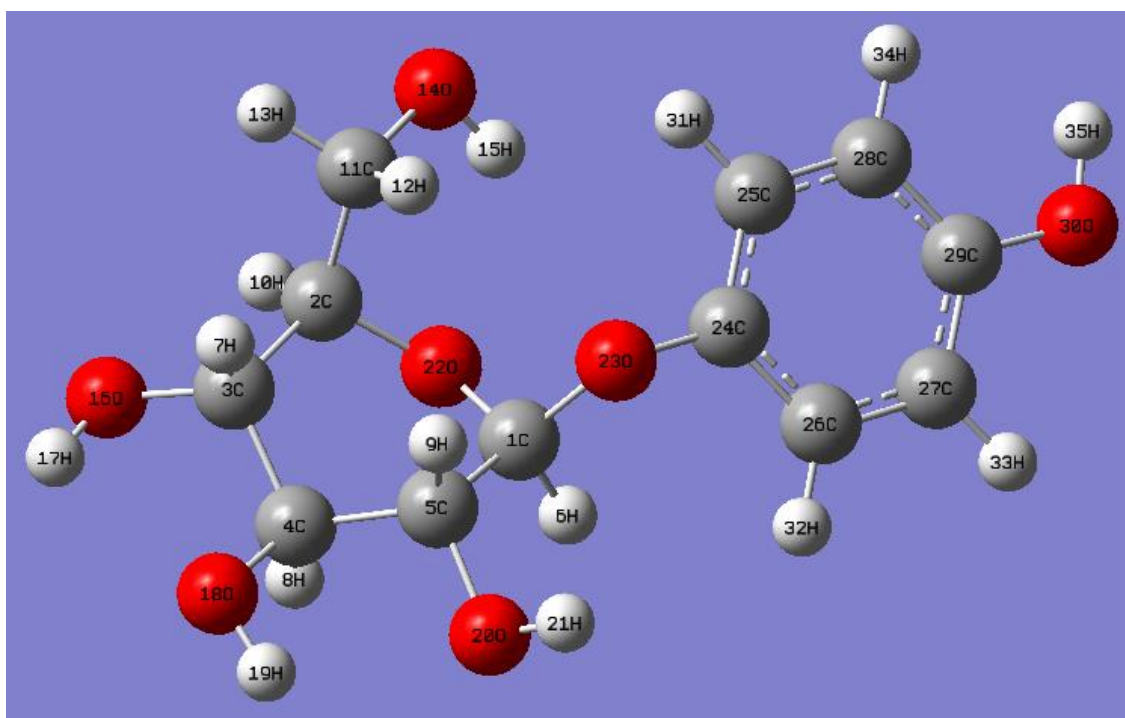


Рисунок 107 – Оптимизированная структура молекулы арбутина

Анализ зарядов атомов кислорода, полученных для структуры I (см. Рисунок 107), позволяет заключить, что наименьший отрицательный заряд присутствует на атоме кислорода под номером 30 и составляет $-0,363$ (Рисунок 107).

Таким образом, при поглощении дополнительной энергии наиболее вероятно будет происходить депротонирование гидроксильной группы 30O-35H. В результате будет образовываться родительский ион II.

Отдельного рассмотрения заслуживает структура III. Механизм образования такой структуры обсуждался в работе [40]. Для его доказательства были использованы изотопномеченные и дериватизированные по селективным положениям соединения. Однако акцента на детали строения образующегося иона III сделано не было. Проведенные нами квантово-химические исследования позволили оценить возможное строение такой частицы (Рисунок 108).

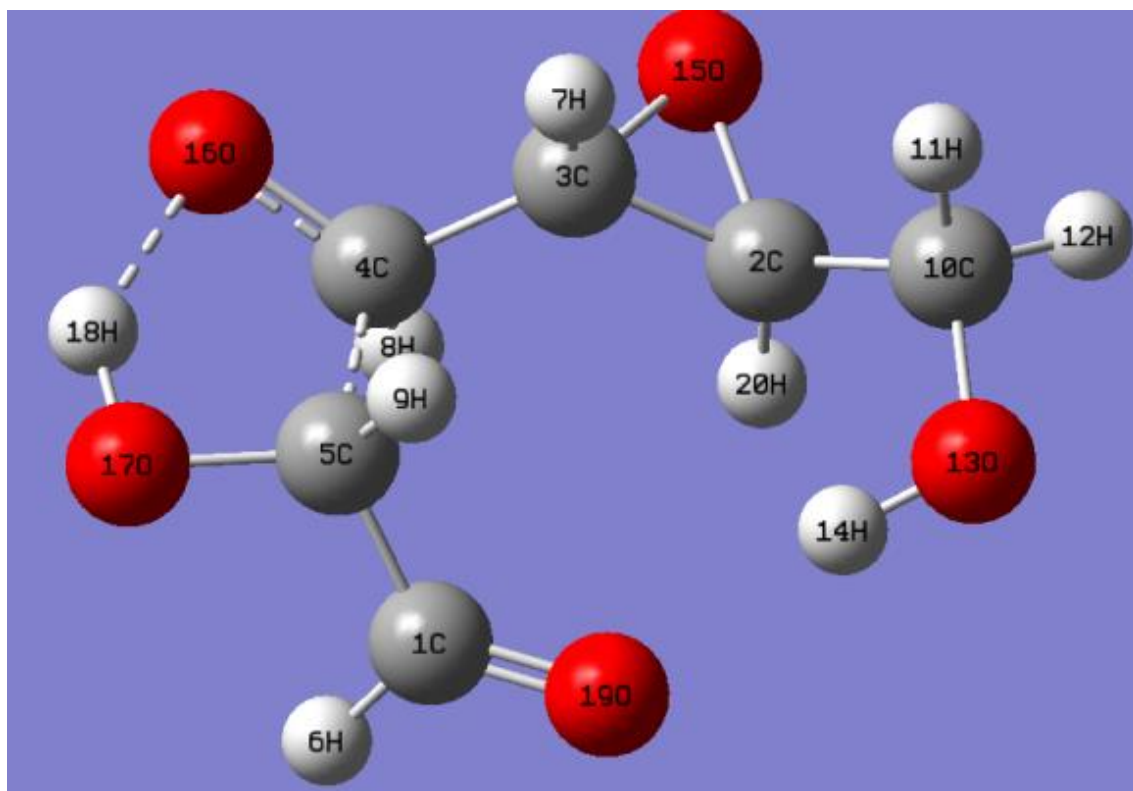


Рисунок 108 – Оптимизированная структура III.

Обращает на себя внимание, что термодинамически частица III значительно менее стабильна по сравнению с частицей II – разница в стандартных энтальпиях образования составляет около 0,61 Еh. Причина этого заключается в следующем. Длина связи между атомами 16O и 18H заметно увеличена по сравнению с средней длиной одинарной связи между атомами кислорода и водорода в гидроксильной группе (около 1,0 Å) и составляет 1,61 Å, заряд атома 16 O составляет -0,587, заряд атома 18H – 0,233, что свидетельствует об образовании сильной водородной связи между атомами 16O и 18H. С другой стороны, одинарная ковалентная связь между атомами 4C и 5C существенно ослабляется – ее длина – 1,72 Å (для одинарной C-C связи характерная длина составляет около 1,5 Å). В результате структура III оказывается стабилизированной водородной связью между атомами 16O и 18H, но в гораздо большей степени дестабилизированной значительным ослаблением химической связи между атомами 4C и 5C.

Еще одна особенность структуры III – образование оксиранового кольца 2C-3C-15O-2C, устойчивость которого подтверждается картами распределения локальной электронной плотности (ЭП) (Рисунок 109) и локального молекулярного

электростатического потенциала (МЭСП) (Рисунок 110). Область с повышенной ЭП «опоясывает/стягивает» область локального минимума, расположенного в центре оксиранового кольца. Углы при вершинах треугольника, составленного атомами оксиранового цикла, равны примерно 60° . Таким образом, с геометрической точки зрения оксирановый цикл имеет форму равностороннего треугольника. Это, в свою очередь, означает, что длины связей оксиранового цикла примерно равны 1,45 Å. Заряд атома 15O достаточно высок и составляет -0,351.

Таким образом, анализ полученных квантово-химических данных позволяет заключить, что дочерний ион III в условиях масс-спектрометрического эксперимента должен быть достаточно стабильным. Действительно, вид масс-спектра подтверждает это – величина пика дочернего иона с $m/z = 161$ Да составляет 38,9 % от сигнала родительского иона [M-H]⁻.

Дочерний ион с $m/z = 108$ Да соответствует иону гидрохинона (Рисунок 111). Заряды на атомах 11O и 12O составляют -0,416, -0,240 соответственно, что обусловлено частичным переносом заряда с атома 12O на атом 11O за счет положительного мезомерного эффекта со стороны 12O. Это является причиной симметричного перераспределения ЭП относительно линии A.

Более того, устойчивость отрицательно заряженного иона гидрохинона подтверждается картой МЭСП, на которой наблюдается взаимное притяжение положительных и отрицательных областей в ионе IV (см. Рисунок 112).

Устойчивость IV в условиях масс-фрагментации арбутина проявляется в том, что величина сигнала дочернего иона IV с $m/z = 108$ Да в масс-спектре составляет весьма существенную величину 25,6 % от сигнала родительского иона [M-H]⁻.

Таким образом, проведенное квантово-химическое исследование подтверждает обоснованность схемы масс-фрагментации молекулы арбутина, приведенное на Рисунке 106.

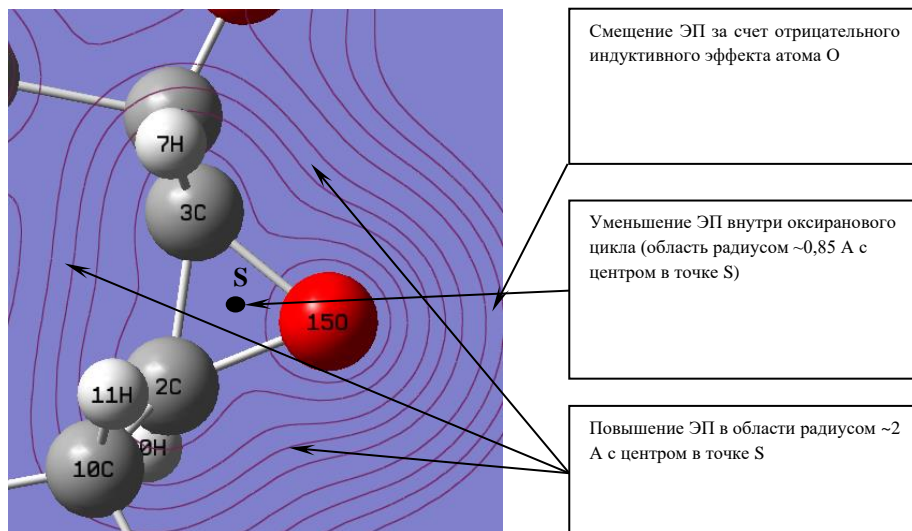


Рисунок 109 – Карта распределения ЭП между атомами 2C-3C-15O-2C в структуре III

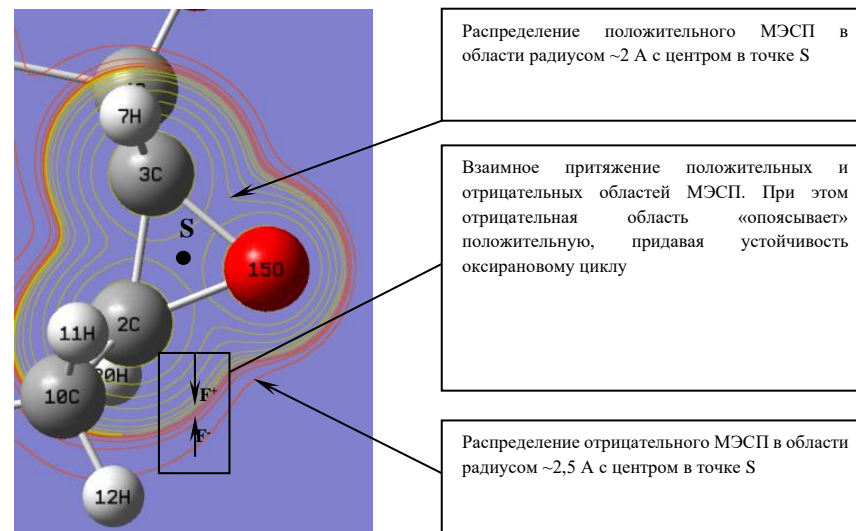


Рисунок 110 – Карта распределения МЭСП между атомами 2C-3C-15O-2C в структуре III

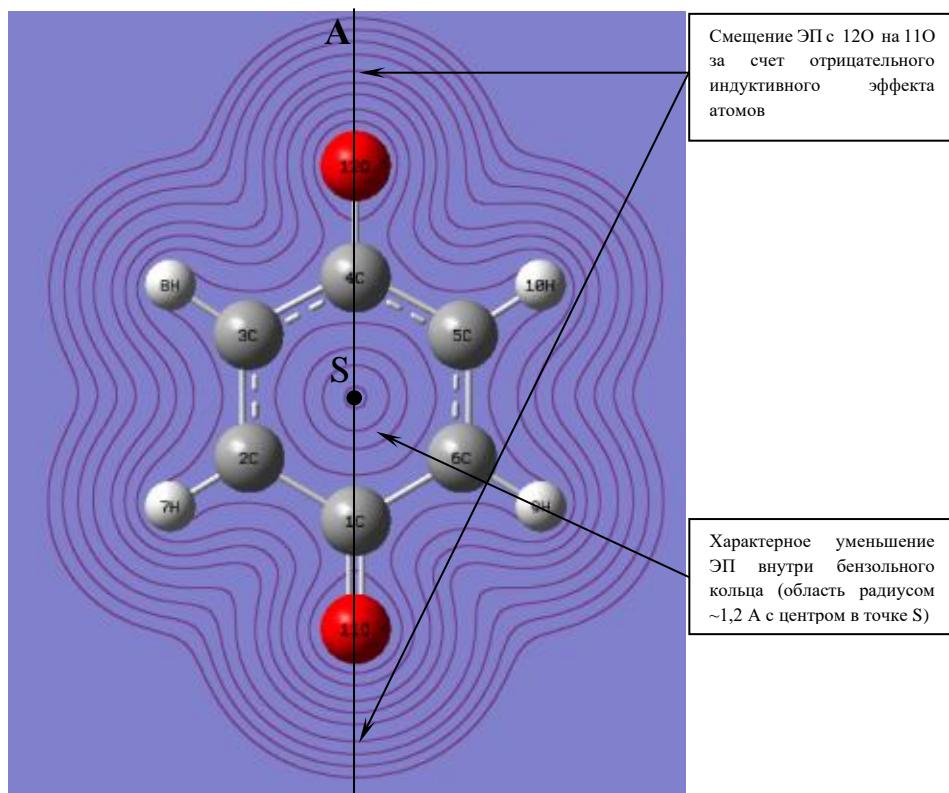


Рисунок 111 – Карта распределения ЭП структуры IV

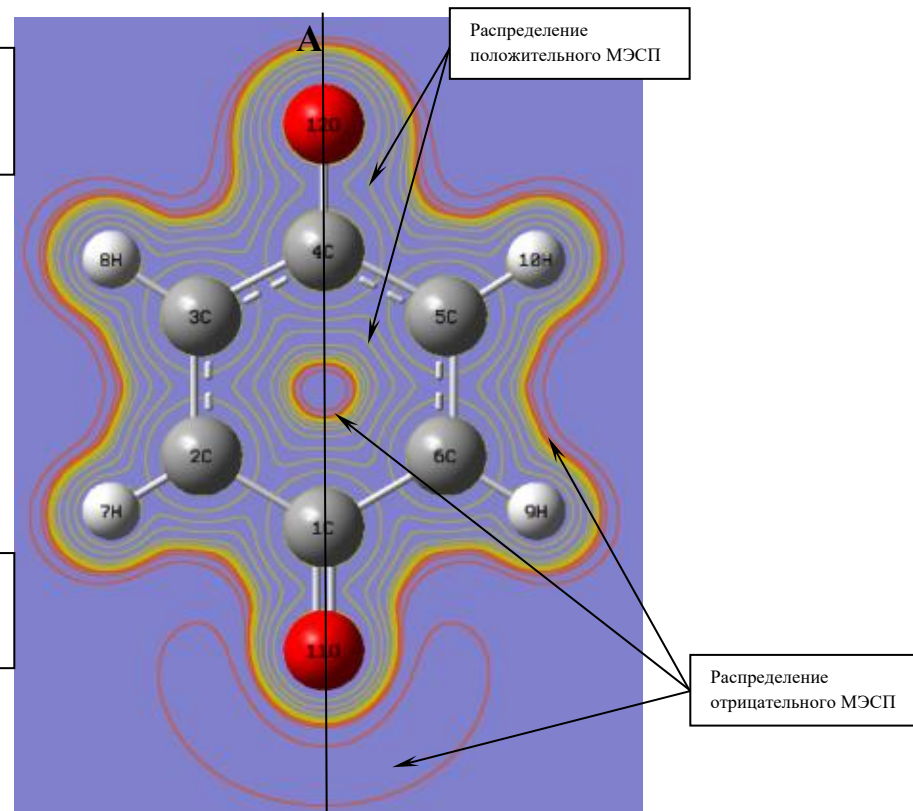


Рисунок 112 – Карта распределения МЭСП структуры IV

6.3. Определение арбутина методом ВЭЖХ/УФ в ЛРС

Для определения арбутина в ЛРС были использованы хроматографические условия, предложенные в разделе 6.1 при разработке методики количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной методом ВЭЖХ/МС ([61, 62] – данные автора).

В качестве ЛРС были использованы листья брусники обыкновенной, ферментированные листья бадана толстолистного (Чигирский чай), корневища бадана толстолистного, трава боровой матки, трава зимолюбки.

В качестве аналитической была выбрана длина волны 280 нм (Рисунок 113), поскольку при этом исключаются ошибки, связанные с собственным поглощением растворителей (при $\lambda = 215$ нм).

Хотя интенсивность линии поглощения при $\lambda = 280$ нм значительно ниже по сравнению с 215 нм, тем не менее, этого оказывается достаточно, так как арбутин содержится в сырье на уровне нескольких процентов.

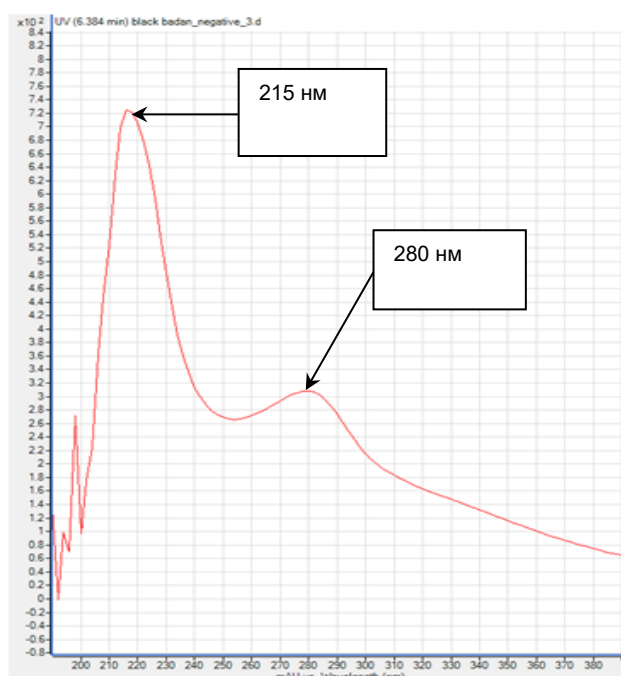


Рисунок 113 – УФ/ВИД-спектр арбутина

Установлено, что наибольшее извлечение арбутина из листьев брусники обыкновенной наблюдается при следующих условиях:

- степень измельчения – 1 мм;
- масса навески – 1 г;
- экстрагент – вода очищенная;
- соотношение сырье:экстрагент – 1 : 110;
- температура -100 °С (водяная баня);
- время извлечения – 60 мин.

Наибольшее извлечение арбутина из корневищ бадана толстолистного наблюдается при следующих условиях:

- степень измельчения – 1 мм;
- масса навески – 1 г;
- экстрагент – спирт 40 %;
- соотношение сырье:экстрагент – 1 : 110;
- температура – 100 °С (водяная баня).

В процессе исследования были выбраны условия извлечения арбутина из листьев брусники обыкновенной и корневищ бадана толстолистного. Данные представлены в Таблицах 96 и 97.

Условия извлечения арбутина из субстанций растительного происхождения обобщены в Таблице 98.

Таблица 96 – Влияние различных факторов на полноту извлечения арбутина из листьев брусники обыкновенной (*Vaccinii vitis-idaeae folia*)

| <i>Степень измельчения, мм</i> | <i>Содержание этанола в экстрагенте, %</i> | <i>Соотношение сырье: экстрагент</i> | <i>Время экстракции, мин</i> | <i>Кратность экстракции</i> | <i>X, %</i> |
|---|--|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------|
| <i>Степень измельчения</i> | | | | | |
| 3 | 40 | 1:100 | 60 | 1 | 3,01±0,32 |
| 2 | 40 | 1:100 | 60 | 1 | 3,16±0,24 |
| 1 | 40 | 1:100 | 60 | 1 | 3,97±0,17 |
| <i>Сырье:экстрагент</i> | | | | | |
| 1 | 40 | 1:40 | 60 | 1 | 3,88±0,25 |
| 1 | 40 | 1:80 | 60 | 1 | 3,78±0,21 |
| 1 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 3,75±0,15 |
| <i>Содержание этанола в экстрагенте</i> | | | | | |
| 1 | 0 | 1:40 | 60 | 1 | 4,45±0,23 |
| 1 | 20 | 1:40 | 60 | 1 | 4,39±0,30 |
| 1 | 40 | 1:40 | 60 | 1 | 3,61±0,23 |
| 1 | 70 | 1:40 | 60 | 1 | 3,62±0,28 |
| <i>Время экстракции</i> | | | | | |
| 1 | 0 | 1:40 | 30 | 1 | 3,16±0,33 |
| 1 | 0 | 1:40 | 60 | 1 | 3,73±0,18 |
| 1 | 0 | 1:40 | 90 | 1 | 3,68±0,26 |
| <i>Кратность экстракции</i> | | | | | |
| 1 | 0 | 1:40 | 60 | 1 | 4,57±0,17 |
| 1 | 0 | 1:40 | 60+60 | 2 | 4,83±0,07 |

Таблица 97 – Влияние различных факторов на полноту извлечения арбутина из корневищ бадана толстолистного (*Bergeniae crassifoliae rhizomata*)

| Степень измельчения, мм | Содержание этанола в экстрагенте, % | Соотношение сырье: экстрагент | Время экстракции, мин | Кратность экстракции | X, % |
|---|---|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|
| <i>Степень измельчения</i> | | | | | |
| 4 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 2,57±0,24 |
| 3 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 2,50±0,14 |
| 2 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 2,36±0,22 |
| 1 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 2,59±0,17 |
| <i>Содержание этанола в экстрагенте</i> | | | | | |
| 1 | 0 | 1:110 | 60 | 1 | 2,58±0,11 |
| 1 | 20 | 1:110 | 60 | 1 | 2,56±0,13 |
| 1 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 2,77±0,21 |
| 1 | 70 | 1:110 | 60 | 1 | 2,69±0,15 |
| <i>Сырье:экстрагент</i> | | | | | |
| 1 | 40 | 1:40 | 60 | 1 | 2,89±0,28 |
| 1 | 40 | 1:80 | 60 | 1 | 3,01±0,31 |
| 1 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 3,03±0,26 |
| <i>Время экстракции</i> | | | | | |
| 1 | 40 | 1:110 | 30 | 1 | 3,04±0,17 |
| 1 | 40 | 1:110 | 60 | 1 | 3,05±0,13 |
| 1 | 40 | 1:110 | 90 | 1 | 3,06±0,11 |
| <i>Кратность экстракции</i> | | | | | |
| 1 | 40 | 1:110 | 30 | 1 | 2,59±0,17 |
| 1 | 40 | 1:110 | 30+30 | 2 | 2,59±0,17 |

Таблица 98 – Условия извлечения арбутина из листьев толокнянки обыкновенной, листьев брусники обыкновенной и корневищ бадана толстолистного

| Образец | Степень измельчения, мм | Масса навески, г | Экстрагент | Соотношение сырье: экстрагент | T, °C | Время извлечения, мин |
|---|-------------------------|------------------|------------|-------------------------------|-------|-----------------------|
| Листья толокнянки обыкновенной (<i>Arctostaphylos uvae-ursi folia</i>) | 1 | 1 | спирт 40 % | 1 : 110 | 100 | 60 |
| Листья брусники обыкновенной (<i>Vaccinii vitis-idaeae folia</i>) | 1 | 1 | вода | 1 : 110 | 100 | 60 |
| Корневища бадана толстолистного (<i>Bergeniae crassifoliae rhizomata</i>) | 1 | 1 | спирт 40 % | 1 : 110 | 100 | 60 |

Данные, представленные в Таблице 98, свидетельствуют, что основным отличием в процедурах извлечения определяемого компонента из анализируемого материала является тип применяемого экстрагента: для листьев толокнянки обыкновенной и корневищ бадана толстолистного оптимальным является использование спирта 40 %, а для листьев брусники обыкновенной – воды. Для получения извлечений для травы боровой матки и травы зимолюбки использовали такие же условия как для листьев толокнянки и корневищ бадана.

Хроматограммы извлечений, зарегистрированные с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм, приведены на Рисунках 114–118. Время удерживания пика арбутина около 6 мин.

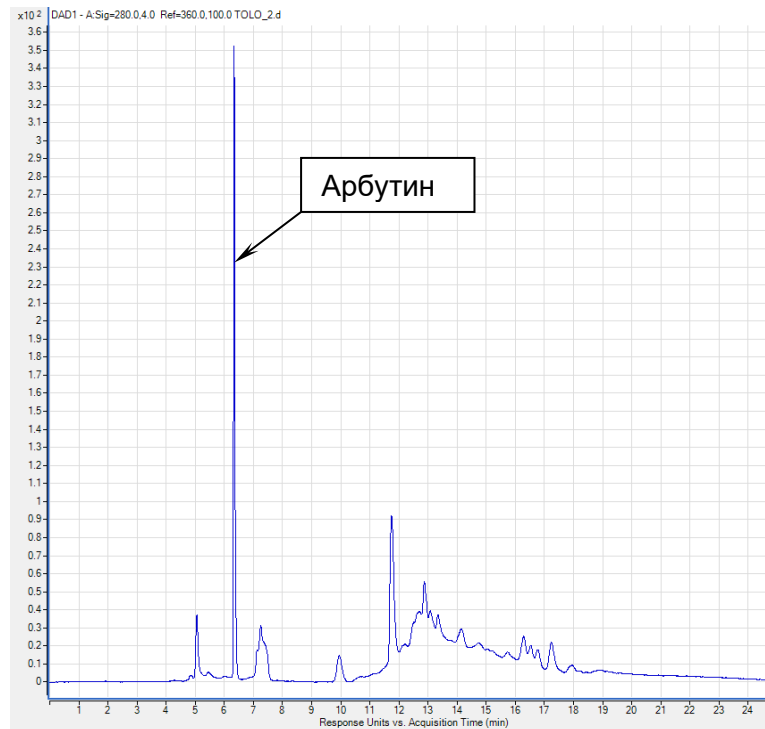


Рисунок 114 – Хроматограмма испытуемого раствора (листья толокнянки обыкновенной) при $\lambda = 280$ нм

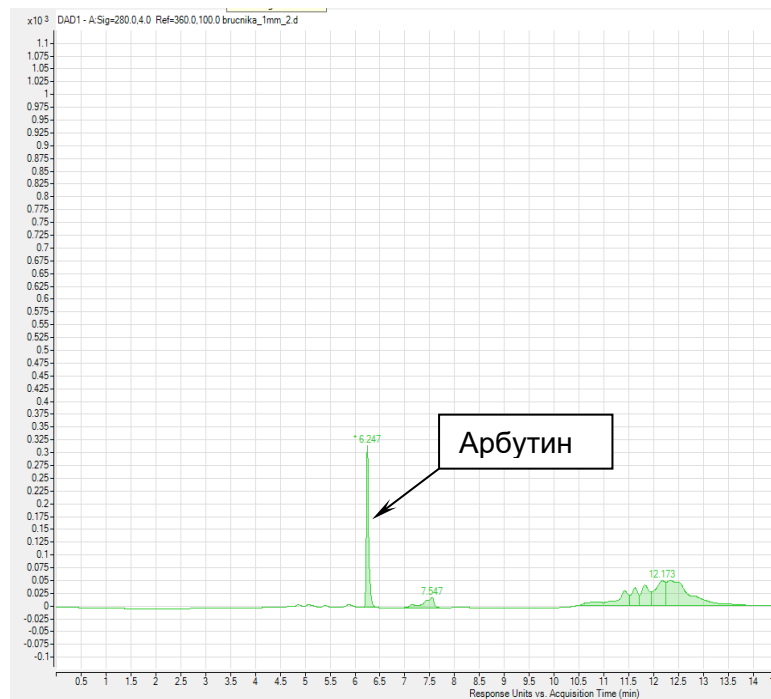


Рисунок 115 – Хроматограмма испытуемого раствора (листья брусники обыкновенной) при $\lambda = 280$ нм

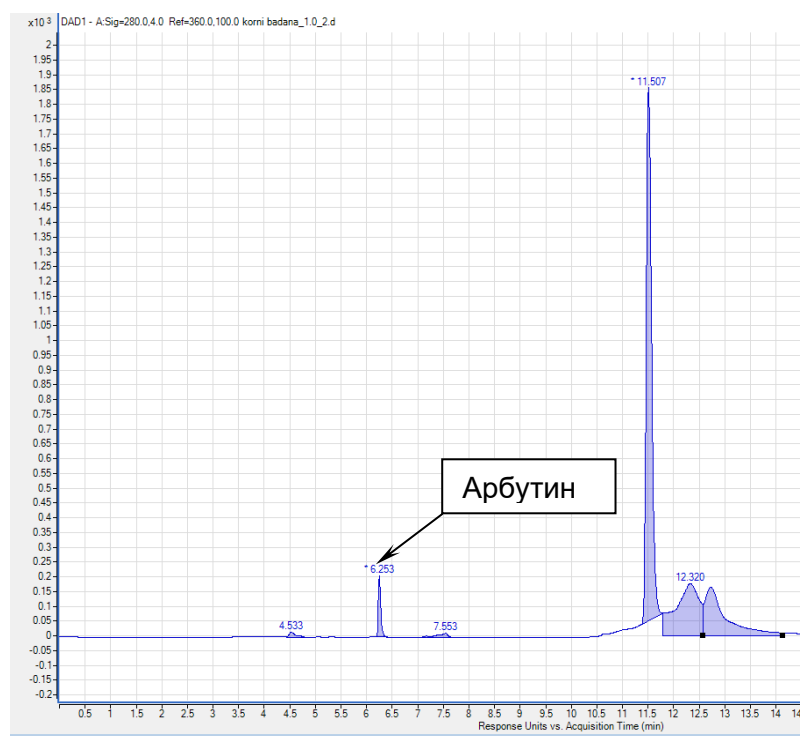


Рисунок 116 – Хроматограмма испытуемого раствора (корневища бадана толстолистного) при $\lambda = 280$ нм

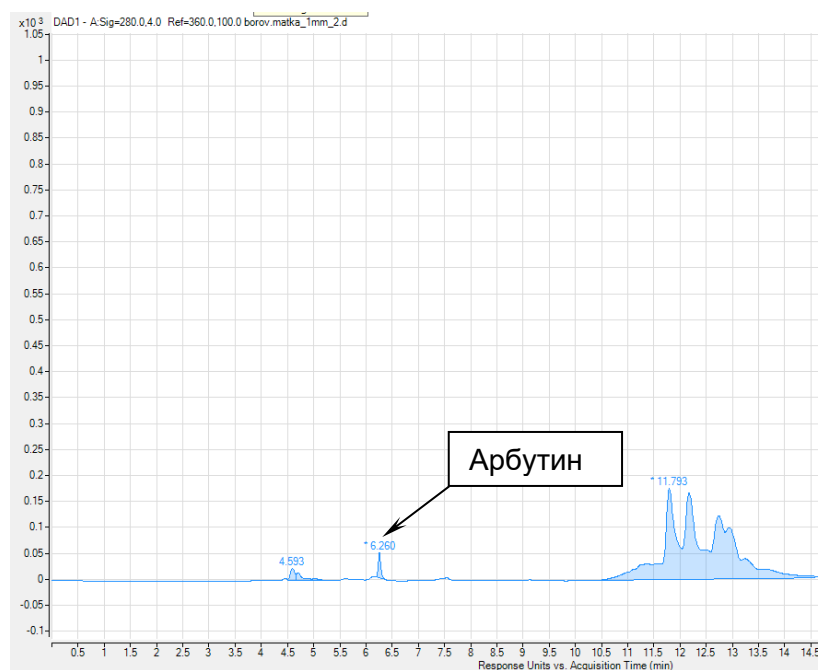


Рисунок 117 – Хроматограмма испытуемого раствора (трава боровой матки) при $\lambda = 280$ нм

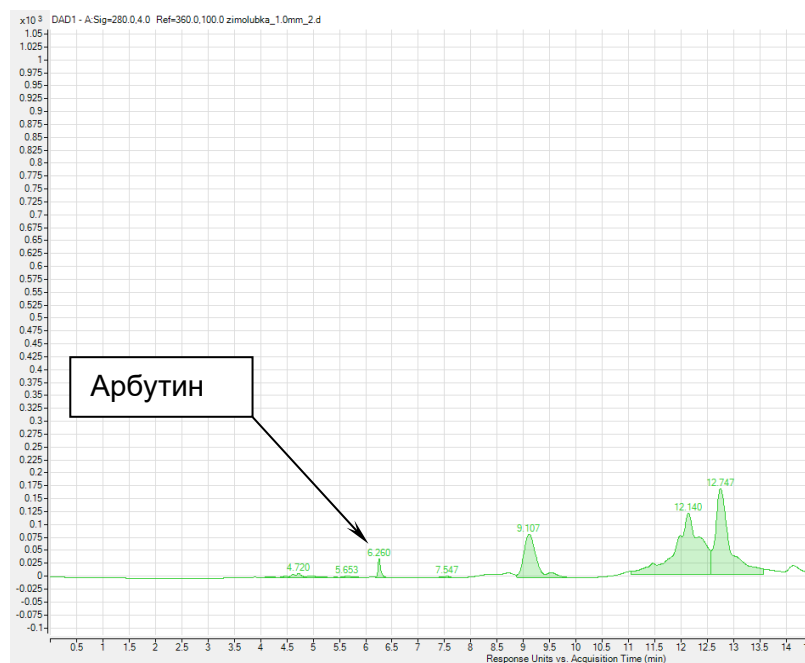


Рисунок 118 – Хроматограмма испытуемого раствора (трава зимолюбки) при $\lambda = 280$ нм

На хроматограмме корневищ бадана (Рисунок 116) заметен пик с высокой интенсивностью и временем удерживания около 11 минут. Масс-спектр данного пика приведен на Рисунке 119.

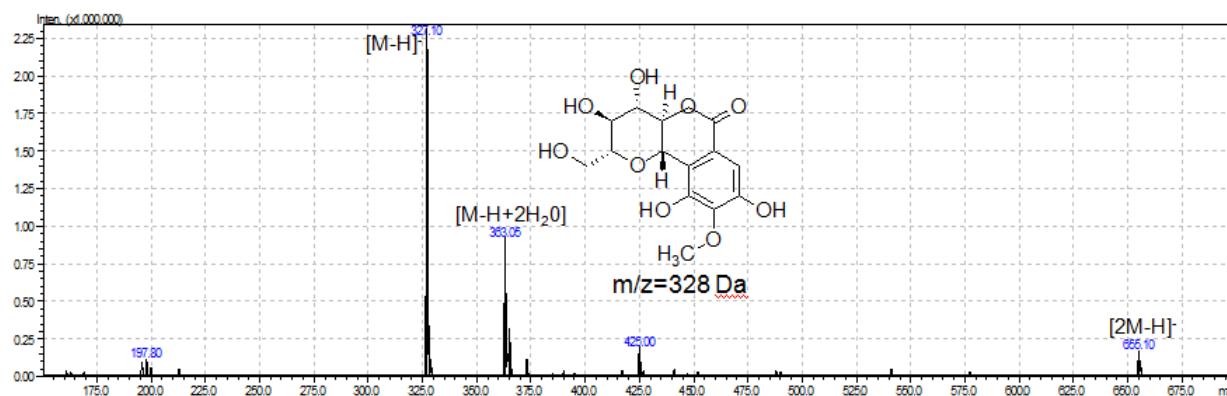


Рисунок 119 – Масс-спектр, соответствующий пику с временем удерживания около 11 минут

Один из наименее интенсивных сигналов с $m/z = 655$ Да соответствует предположительно депротонированному димеру бергенина; сигнал с $m/z = 363$ Да – депротонированному комплексу молекулы бергенина с двумя молекулами воды, пик с $m/z = 327$ Да – депротонированной молекуле бергенина.

Исследование специфичности, линейности, правильности, повторяемости проведено на примере извлечений из листьев толокнянки обыкновенной – сырья, содержащего наибольшее количество арбутина.

Для исследования специфичности метода количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной получены хроматограммы растворителя, стандартного раствора и испытуемого раствора при $\lambda = 280$ нм.

Времена удерживания арбутина на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора приведены в Таблице 99.

Типичная хроматограмма растворителя представлена на Рисунке 120, стандартного раствора – на Рисунке 121, испытуемого раствора – на Рисунке 114.

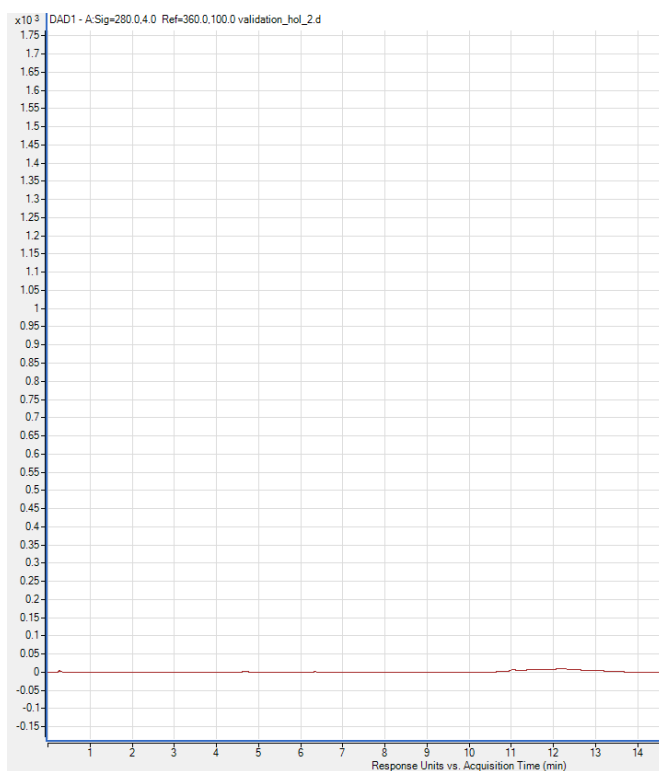


Рисунок 120 – Хроматограмма растворителя

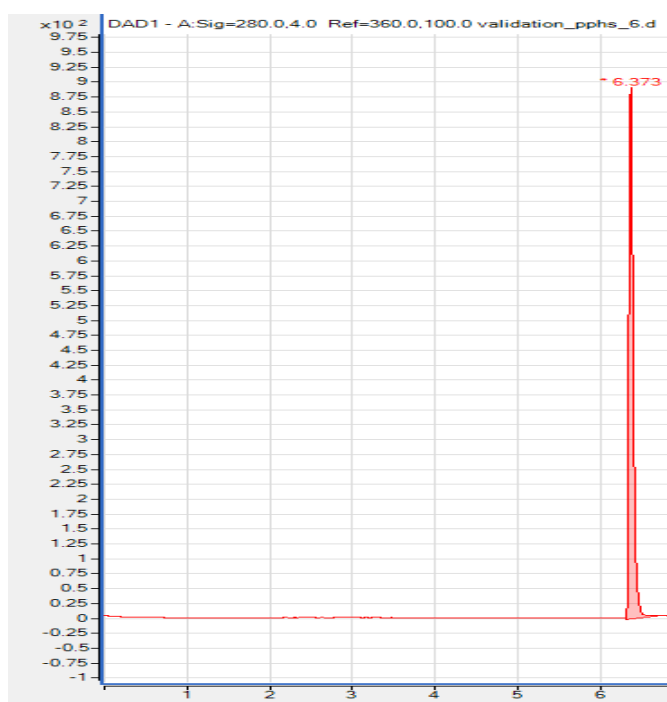


Рисунок 121 – Хроматограмма стандартного раствора

Таблица 99 – Времена удерживания стандартного раствора арбутина и испытуемого раствора ([62] – данные получены автором)

| <i>Измерение</i> | <i>Стандартный раствор</i> | <i>Испытуемый раствор</i> | <i>Совпадение, %</i> |
|------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| RT ₁ | 6,37 | 6,37 | 100,0 |
| RT ₂ | 6,37 | 6,37 | 100,0 |
| RT ₃ | 6,37 | 6,37 | 100,0 |

Данные, представленные на Рисунках 114, 120, 121 и в Таблице 99, свидетельствуют, что «время удерживания пика арбутина на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов совпадают с точностью 100 %. Хроматограммы растворителя свидетельствуют об отсутствии влияния растворителя на результаты количественного определения арбутина.

Для исследования пригодности хроматографической системы были получены хроматограммы стандартного раствора с концентрацией арбутина 100 мкг/мл. Значения времен удерживания (RT, мин), площадей пиков (S), асимметрии пиков (As) и числа теоретических тарелок (NTP), а также средние значения и относительные стандартные отклонения (RSD, %) времен удерживания и площадей пиков (n = 5), представлены в Таблице 100» (Обидченко Ю. А., 2015, Приложение Г).

Таблица 100 – Параметры пригодности хроматографической системы ([62] – данные получены автором)

| <i>Измерение</i> | <i>RT</i> | <i>S, abs.u</i> | <i>As</i> | <i>NTP</i> |
|--|-----------|-----------------|-----------|------------|
| 1 | 6,37 | 3098,80 | 1,50 | 8289,54 |
| 2 | 6,37 | 3043,14 | 1,30 | 8273,46 |
| 3 | 6,37 | 3051,94 | 1,30 | 10377,90 |
| 4 | 6,37 | 3054,99 | 1,40 | 9237,68 |
| 5 | 6,37 | 3095,82 | 1,20 | 9245,88 |
| Среднее значение | 6,37 | 3068,94 | 1,34 | 9084,89 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 0 | 3,81 | – | – |

«Эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику арбутина на хроматограммах стандартного раствора составляет 9084,89 теоретических тарелок; фактор асимметрии пика арбутина на хроматограммах стандартного раствора составляет 1,34, коэффициент вариации значений времен удерживания на хроматограммах стандартного раствора арбутина при ($n = 5$) составляет 0 %, площадей пиков 3,81%.

Для исследования линейности методики количественного определения арбутина готовили серию растворов стандартного образца арбутина. Концентрации варьировались от 5 до 200 мкг/мл. Данные по оценке линейности определения арбутина приведена в Таблице 101.

Таблица 101 – Оценка линейности определения арбутина ([62] – данные получены автором)

| <i>№</i> | <i>S₁</i> | <i>S₂</i> | <i>S₃</i> | <i>S_{ср.}</i> | <i>C, мкг/мл</i> |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------|
| 1 | 176,83 | 175,99 | 175,95 | 176,25 | 5 |
| 2 | 339,61 | 337,25 | 336,56 | 337,80 | 10 |
| 3 | 849,41 | 844,05 | 839,26 | 844,24 | 25 |
| 4 | 1616,70 | 1618,85 | 1620,41 | 1618,65 | 50 |
| 5 | 3128,25 | 3141,65 | 3135,13 | 3135,01 | 100 |
| 6 | 5712,71 | 5781,99 | 5759,12 | 5751,27 | 200 |

На основании данных, представленных в Таблице 101, построен график зависимости площади пика от концентрации арбутина в растворе (Рисунок 122).

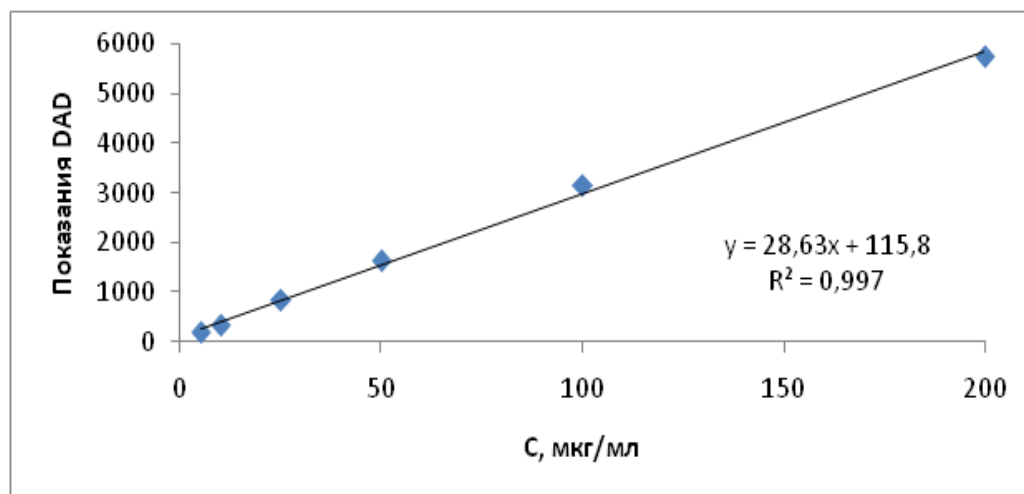


Рисунок 122 – Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации арбутина в растворе

Полученная зависимость линейна, поскольку коэффициент корреляции составляет 0,9985. Правильность метода количественного определения арбутина доказывали методом добавок, путем прибавления точного количества арбутина. Проводили по три параллельных определения для каждой добавки. Показатель правильности оценивали путем расчета открываемости. Результаты определения правильности представлены в Таблице 102.

Таблица 102 – Правильность определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*) ($S = 2298,24 \text{ abs.u}$)* ([62] – данные получены автором)

| Концентрация раствора добавки, мкг/мл | Площадь пика добавки, abs.u | Ожидаемая площадь пика, abs.u | Найдено, abs.u | Открываемость, % |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------|------------------|
| 25 | 767,24 | 3065,48 | 3015,30 | 98,4 |
| 25 | 762,02 | 3060,26 | 2960,03 | 96,7 |
| 25 | 757,40 | 3055,64 | 3006,86 | 98,4 |
| 50,0 | 1547,85 | 3846,09 | 3915,70 | 101,8 |
| 50,0 | 1553,53 | 3851,77 | 3889,65 | 101,0 |
| 50,0 | 1546,50 | 3844,74 | 3911,32 | 101,7 |
| 100,0 | 3087,96 | 5386,198 | 5533,82 | 102,7 |

Продолжение таблицы 102

| Концентрация раствора добавки, мкг/мл | Площадь пика добавки, abs.u | Ожидаемая площадь пика, abs.u | Найдено, abs.u | Открываемость, % |
|--|-----------------------------|-------------------------------|----------------|------------------|
| 100,0 | 3124,49 | 5422,73 | 5536,30 | 102,1 |
| 100,0 | 3092,42 | 5390,66 | 5544,11 | 102,9 |
| Статистические характеристики | | | | Результаты |
| Наименьшее значение, % | | | | 96,7 |
| Наибольшее значение, % | | | | 102,9 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | | | | 99,8 |
| Стандартное отклонение (s) | | | | 2,23 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($s_{\bar{x}}$) | | | | 0,74 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{x},\%}$), % | | | | 0,75 |
| Доверительный интервал (ΔX , P = 0,95) | | | | 1,72 |

* – в скобках приведены данные для арбутина, содержащимся в извлечении из листьев толокнянки

Открываемость находится в диапазоне от 95,0 до 105,0 %; коэффициент вариации (n = 9) составляет 0,75 %.

При исследовании повторяемости рассчитывали коэффициент вариации по результатам количественного определения арбутина (n = 6) в испытуемом растворе. Результаты приведены в Таблице 103.

Таблица 103 – Оценка повторяемости методики количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*) (n = 6, P = 0,95) ([62] – данные получены автором)

| S | W, % | Содержание, % | \bar{X} , % | Станд. отклон. | Коэффициент вариации, % | Доверительный интервал |
|---------|------|---------------|---------------|----------------|-------------------------|------------------------|
| 2384,54 | 12 | 11,0 | 11,1 | 0,15 | 0,55 | 0,16 |
| 2432,53 | | 11,2 | | | | |
| 2401,19 | | 11,1 | | | | |
| 2436,45 | | 11,3 | | | | |
| 2415,00 | | 11,2 | | | | |
| 2352,70 | | 10,9 | | | | |

Продолжение таблицы 103

| <i>CO</i> | <i>S₀</i> |
|--|----------------------|
| 1 | 3098,80 |
| 2 | 3043,14 |
| 3 | 3051,94 |
| 4 | 3054,99 |
| 5 | 3095,82 |
| Среднее значение | 3068,94 |
| Коэффициент вариации ($s_{\bar{0},\%}$), % | 3,81 |

Коэффициент вариации результатов количественного определения арбутина ($n = 6$) составляет 0,55 %. Методика количественного определения арбутина применима для анализа ЛРС в интервале концентраций от 5 до 200 мкг/мл анализа в испытуемом растворе. Разработанная методика была протестирована на различных видах арбутинсодержащего лекарственного растительного сырья. Данные приведены в Таблице 104. Полученные данные позволили предложить унифицированную ВЭЖХ-методику определения арбутина в ЛРС.

Таблица 104 – Определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной, листьях брусники обыкновенной, корневищах бадана толстолистного, траве зимолубки, трава боровой матки, ферментированных листьях бадана толстолистного с использованием разработанной ВЭЖХ-методики ([62] – данные получены автором)

| <i>Образец</i> | <i>W, %</i> | <i>f</i> | <i>X, %</i> | <i>s</i> | <i>P, %</i> | <i>t (p, f)</i> | $\Delta X, \%$ | $\pm E^*, \%$ |
|---|-------------|----------|-------------|----------|-------------|-----------------|----------------|---------------|
| Листья толокнянки обыкновенной (<i>Arctostaphylos uvae-ursi folia</i>) | 12 | 5 | 11,1 | 0,24 | 95 | 2,57 | 0,25 | 2,25 |
| Листья брусники обыкновенной (<i>Vaccinii vitis-idaeae folia</i>) | 13 | 5 | 5,25 | 0,11 | 95 | 2,57 | 0,12 | 2,29 |
| Трава зимолубки (<i>Chimaphilae umbellatae herbae</i>) | 8 | 5 | 0,52 | 0,02 | 95 | 2,57 | 0,02 | 3,85 |
| Трава боровой матки (<i>Orthiliae secundae herbae</i>) | 8 | 5 | 0,67 | 0,02 | 95 | 2,57 | 0,03 | 4,48 |
| Ферментированные листья бадана толстолистного (<i>Bergeniae crassifoliae folia fermentato</i> (ферментированные)) | 11 | 5 | 0,88 | 0,03 | 95 | 2,57 | 0,04 | 4,55 |
| Корневища бадана толстолистного (<i>Bergeniae crassifoliae rhizomata</i>) | 14 | 5 | 3,02 | 0,11 | 95 | 2,57 | 0,11 | 3,64 |

* – ошибка анализа

Методика

Приготовление 0,063% - ного раствора аммония формиата, стандартного и испытуемого растворов, хроматографические условия приведены в Таблицах 105, 106.

Таблица 105 – Унифицированная методика количественного определения арбутина в ЛРС методом ВЭЖХ/УФ: приготовление растворов ([62] – методика разработана автором)

| Этап | Описание этапа |
|-----------------------------------|---|
| 0,063%-й раствор аммония формиата | Около 630 мг (точная навеска) аммония формиата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды очищенной, перемешивают. Объем раствора до метки доводят тем же растворителем и перемешивают |
| Стандартный раствор | Около 0,1 г (точная навеска) СО арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 40 %, доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают. Концентрация раствора – 1000 мкг/мл (раствор А). Раствор А используют свежеприготовленным. 1 мл раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем раствора доводят до метки спиртом 40 %, перемешивают. Концентрация раствора – 100 мкг/мл (раствор Б). Раствор Б используют свежеприготовленным |
| Испытуемый раствор | Около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 110 мл экстрагента (для листьев толокнянки обыкновенной и корневищ бадана толстолистного – спирт 40 %, для листьев брусники обыкновенной – вода) и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Реакционную смесь охлаждают, фильтруют через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 250 мл. Объем раствора доводят соответствующим экстрагентом до метки и перемешивают. 10 мл полученного извлечения пропускают через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор А). Раствор А используют свежеприготовленным. 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки спиртом 40 %, перемешивают (раствор Б). Раствор Б используют свежеприготовленным |

Таблица 106 – Хроматографические условия

| | |
|---------------------|--|
| Колонка | Phenomenex Luna 5μ C18 (2), 250×4,6 мм или аналогичная |
| Температура колонки | 30 °С |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин |
| Детектор | УФ или ДМ, 280 нм |
| Объем аликвоты | 10 мкл |
| Подвижная фаза А | 0,063%-й раствор аммония формиата |
| Подвижная фаза В | Ацетонитрил |

Продолжение Таблицы 106

| Градиент | Время, мин | ПФ А, % | ПФ В, % |
|----------|------------|---------|---------|
| | 0,00 | 90 | 10 |
| | 3,00 | 90 | 10 |
| | 10,00 | 10 | 90 |
| | 10,60 | 10 | 90 |
| | 10,61 | 10 | 90 |
| | 12,00 | 10 | 90 |
| | 15,01 | 10 | 90 |
| | 15,10 | 90 | 10 |
| | 20,00 | 90 | 10 |

Время хроматографирования 20 мин. Время удерживания пика арбутина в этих условиях около 6 мин.

«Регистрируют хроматограммы испытуемого и стандартного растворов.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверка ППХС. Хроматографируют стандартный раствор арбутина не менее 5 раз. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику арбутина *не менее 3000 теоретических тарелок*;
- фактор асимметрии пика арбутина *не менее 0,8 и не более 1,5*;
- относительное стандартное отклонение площади пика арбутина *не более 4 %*» (Никифорова М. В., 2020, Приложение Г), времени удерживания *не более 2 %*.

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы.

«Содержание арбутина ($C_{12}H_{16}O_7$) в субстанциях растительного происхождения, в процентах (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot 250 \cdot 10 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 10 \cdot (100 - W) \cdot 100} \cdot 100 \% = \frac{S \cdot a_0 \cdot 125 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 100} \cdot 100 \%,$$

где S – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – площадь пика арбутина на хроматограмме стандартного раствора;

a – навеска субстанции растительного происхождения, г;

a₀ – навеска СО арбутина, г;

P – содержание основного вещества в СО арбутина, %;

W–влажность сырья, %» (Раменская Г. В., 2018, Приложение Г).

Таким образом, разработаны две методики количественного определения арбутина в субстанциях растительного происхождения. Показано, что ВЭЖХ/МС-методика менее чувствительна по сравнению с ВЭЖХ/УФ-методикой и может быть рекомендована только для анализа листьев толокнянки, в то время как ВЭЖХ/УФ-методика более универсальна и может быть рекомендована для определения аналита в сырье различных морфологических групп. Относительная погрешность а ВЭЖХ/УФ-методики составляет 1,44 %. Нормы, рекомендованные в ГФ XIV для листьев толокнянки и брусники, можно рекомендовать и при определении арбутина методом ВЭЖХ/УФ. Поскольку в ГФ XIV корневища бадана стандартизируют по содержанию дубильных веществ (в пересчете на таннин) было проведено исследование нескольких серий образцов сырья, предоставленного сотрудниками ВИЛАР. Данные представлены в Таблице 107.

Таблица 107 – Определение арбутина в корневищах бадана толстолистного (*Bergeniae crassifoliae rhizomata*) методом ВЭЖХ/УФ в образцах ВИЛАР

| Образец | X, % |
|---------|-----------|
| 1 | 3,14±0,05 |
| 2 | 3,15±0,10 |
| 3 | 3,26±0,10 |
| 4 | 4,00±0,10 |
| 5 | 5,05±0,21 |
| 6 | 4,01±0,17 |

На основании данных, представленных в Таблице 107, для корневищ бадана толстолистного можно установить норму для арбутина – не менее 3,0 %. В результате проведенных исследований была предложена ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения», а также дополнение к ФС «Бадана толстолистного корневища» (см. Приложение Б).

6.4. Определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения

Разработка методики количественного определения антоцианов проведена на примере плодов черники – сырья, отличающегося наиболее сложным антоциановым профилем [89].

УФ-спектр цианидин-3-глюкозида в растворе СО представлен на Рисунке 123.

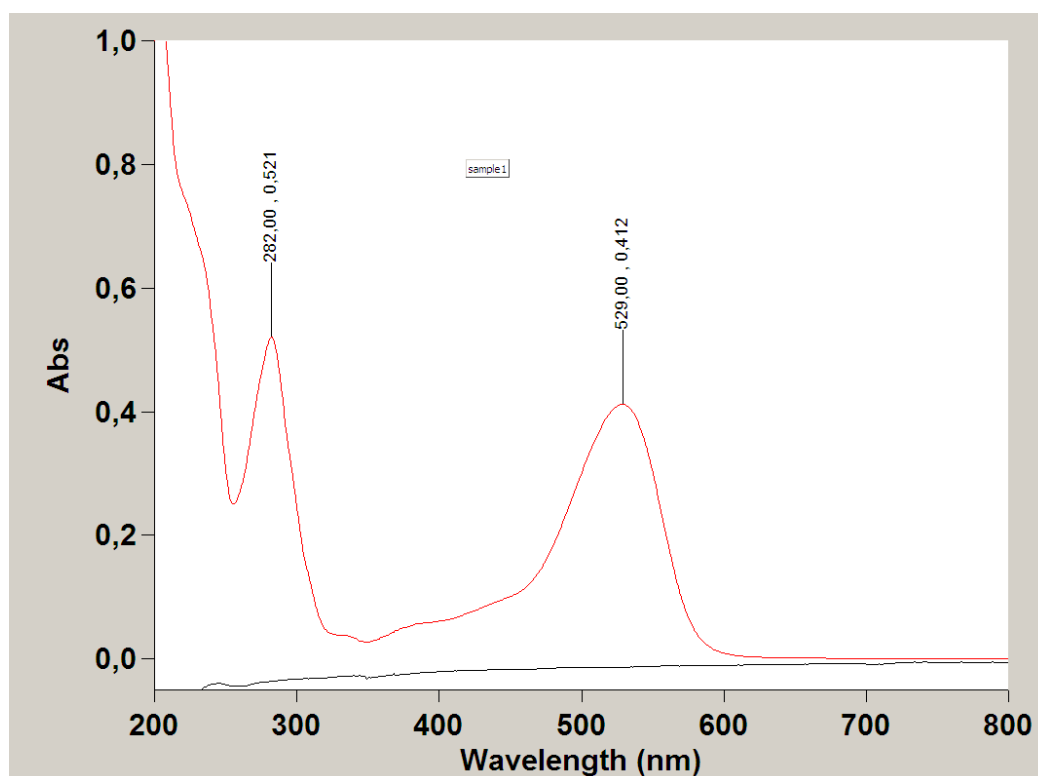


Рисунок 123 – УФ/ВИД-спектр цианидин-3-глюкозида (в метаноле)

Из Рисунка 123 видно, что УФ-спектр цианидин-3-глюкозида имеет два максимума – при 282 и 530 нм.

Среди природных веществ в области поглощения 530 нм определяются в основном только интенсивно окрашенные антоцианы, в то время как другие природные органические соединения в указанной области спектра практически не поглощают. По этой причине антоцианы можно достаточно уверенно идентифицировать даже с использованием наиболее простых и широко распространенных УФ-детекторов на длине волны 530 нм.

Вследствие лабильности антоцианов желательнее вести их извлечение из сырья в условиях, исключающие кислые среды и нагрев [72]. Дополнительно необходимо использовать как можно более мягкие условия для наиболее полного извлечения аналитов, например ультразвуковую обработку, которая и была использована в дальнейшей работе.

Предварительными экспериментами было установлено, что наилучшее разделение и форма пиков наблюдаются при применении колонок марки Zorbax SB-Phenyl C18 и немного модифицированных условий хроматографирования, предложенными в работе [89] для анализа соковой продукции.

Хроматографические условия представлены в Таблице 108.

Таблица 108 – Хроматографические условия

| | | | |
|---------------------|--|---------|---------|
| Колонка | Zorbax SB-Phenyl C18 5 μ , 250 \times 4,6 мм | | |
| Температура колонки | 40 °С | | |
| Скорость потока | 1 мл/мин | | |
| Детектор | УФ, 530 нм | | |
| Объем аликвоты | 20–60 мкл | | |
| Подвижная фаза А | 10%-й раствор муравьиной кислоты | | |
| Подвижная фаза В | муравьиная кислота:вода:ацетонитрил (10 % : 40 % : 50 %) | | |
| Градиент | Время, мин | ПФ А, % | ПФ В, % |
| | 0 | 88 | 12 |
| | 1 | 88 | 12 |
| | 26 | 70 | 30 |
| | 35 | 0 | 100 |
| | 38 | 0 | 100 |
| | 43 | 88 | 12 |
| | 50 | 88 | 12 |

Влияние таких факторов как измельченность сырья, содержание этанола в экстрагенте, соотношение сырье-экстрагент, время и кратность экстракции на извлечение антоцианов из плодов черники представлены в Таблице 109.

Таблица 109 – Влияние параметров экстракции на полноту извлечения антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид) из плодов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtilli fructus*) ([63] – данные получены автором)

| Этанол | Измельченность, мм | Соотношение сы- рье: экстрагент | Время экстрак- ции, мин | X, % |
|---|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------|
| | <i>Измельченность сырья</i> | | | |
| 40 % | 5 | 1:40 | 30 | 1,32±0,08 |
| | 3 | | | 1,96±0,05 |
| | 2 | | | 1,85±0,07 |
| | 1 | | | 1,77±0,07 |
| | 0,5 | | | 2,25±0,11 |
| <i>Содержание этанола в экстрагенте</i> | | | | |
| вода | 0,5 | 1:40 | 30 | 1,30±0,06 |
| 40 % | | | | 3,99±0,08 |
| 96 % | | | | 3,04±0,12 |
| <i>Сырье:экстрагент</i> | | | | |
| 40 % | 0,5 | 1:20 | 30 | 1,79±0,06 |
| | | 1:40 | | 2,09±0,02 |
| | | 1:80 | | 2,15±0,04 |
| <i>Время экстракции, мин</i> | | | | |
| 40 % | 0,5 | 1:40 | 30 | 2,04±0,03 |
| | | | 60 | 2,30±0,03 |
| | | | 120 | 2,35±0,07 |
| <i>Кратность экстракции</i> | | | | |
| 40 % | 0,5 | 1:40 | 60 | 2,35±0,05 |
| | | | 60+60 | 2,74±0,07 |
| | | | 60+60+60 | 2,88±0,08 |

Анализ представленных в Таблице 109 данных, позволяет заключить, что наибольшее извлечение антоцианов при температуре 25 °С (ультразвуковая обработка) наблюдается при использовании степени измельчения сырья 0,5 мм, 40 % этанола в качестве экстрагента, соотношении сырье:экстрагент 1:40, времени экстракции 60 мин. Кратность экстракции составляет 3.

При изучении влияния параметров экстракции на полноту извлечения антоцианов «Стандартный раствор готовили следующим образом: около 2,5 мг (точная навеска) СО цианидин-3-глюкозида хлорида помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в метаноле при перемешивании, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора

помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали.

В результате проведенных исследований испытуемый раствор (при извлечении антоцианов под действием ультразвука) готовили в следующей последовательности: около 2 г (точная навеска) сырья с размером частиц, проходящими через сито 0,5 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл 40 % спирта этилового, помещали в ультразвуковую баню на 60 мин и озвучивали в течение 60 мин при комнатной температуре, периодически помешивая» (Раменская Г. В., 2021, Приложение Г). Реакционную массу фильтровали на воронке Бюхнера, высланной фильтровальной бумагой типа «Белая лента», под вакуумом, «остаток на фильтре помещали в ту же колбу, в которой проводили извлечение. Экстракцию повторяли еще два раза. Полученные фильтраты объединяли и переносили в мерную колбу объемом 250 мл, доводили объем раствора 40 % спиртом этиловым до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Перед определением 5 мл полученного раствора пропускают через мембранный фильтр» (Раменская Г. В., 2021, Приложение Г): мембранные гидрофобные политетрафторэтиленовые ETI Syringe filters с размером пор 0,45 мкм и диаметром 13 мм.

Для исследования специфичности вводили в хроматограф стандартный и испытуемый растворы, растворитель. Хроматограммы стандартного и испытуемого растворов приведены на Рисунках 124, 125. На хроматограмме растворителя (при регистрации на длине волны 530 нм) пики отсутствуют (Рисунок 126).

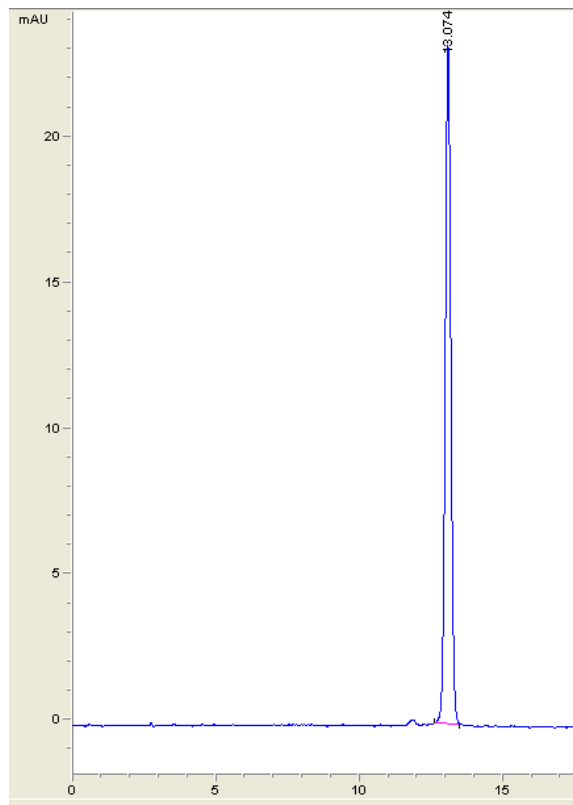


Рисунок 124 – Хроматограмма стандартного раствора

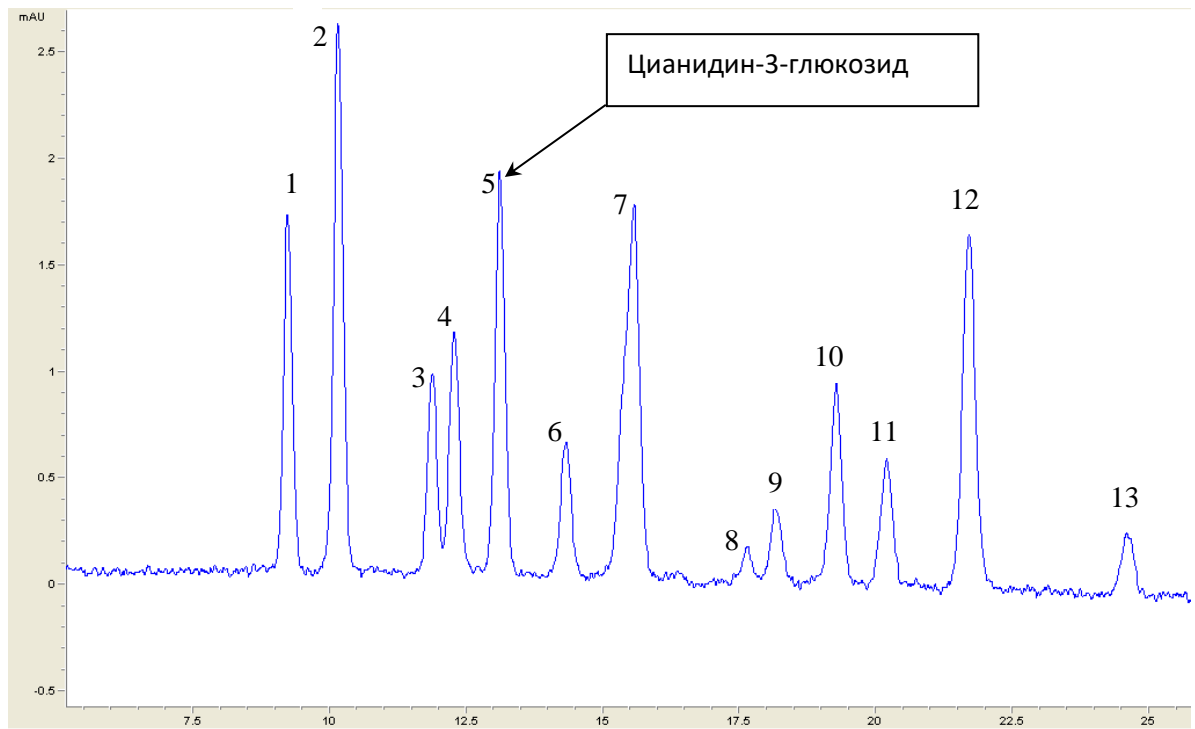


Рисунок 125 – Хроматограмма испытуемого раствора

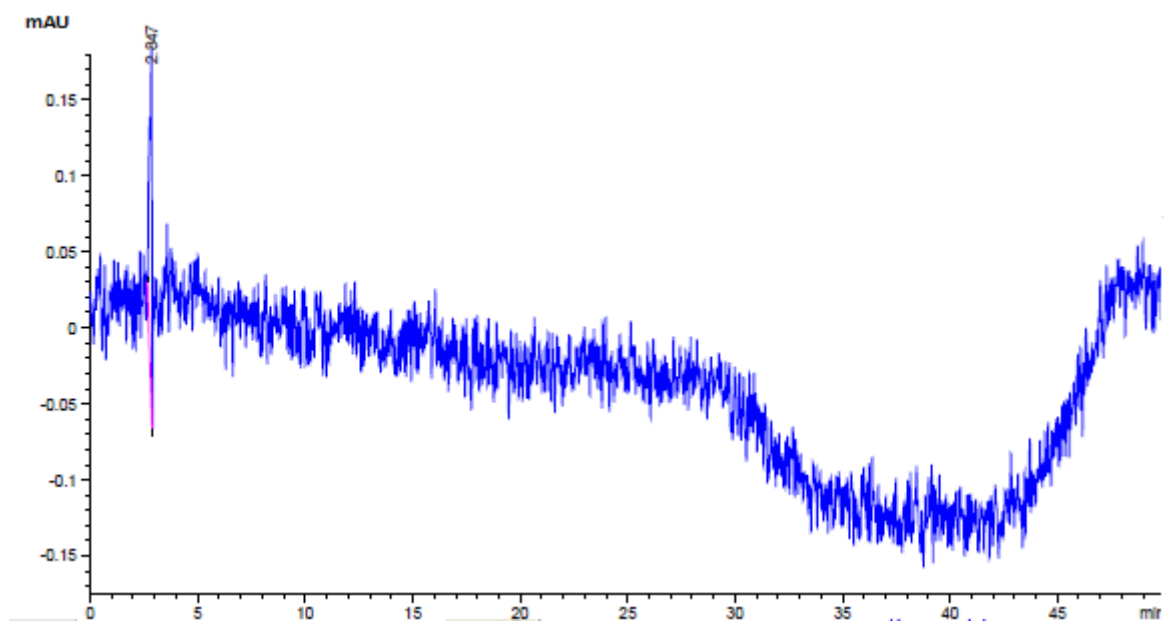


Рисунок 126 – Хроматограмма растворителя

Времена удерживания (RT), площади пиков (S), коэффициент асимметрии пика (As), число теоретических тарелок (NTP) для антоцианов, представленных на хроматограмме испытуемого раствора, приведены в Таблице 110.

Таблица 110 – Ориентировочные времена удерживания, коэффициенты асимметрии, число теоретических тарелок, площади пиков антоцианов представленных на хроматограмме испытуемого раствора (Рисунок 125) ([63] – данные получены автором)

| <i>№ пика</i> | <i>RT</i> | <i>S</i> | <i>As</i> | <i>NTP</i> |
|---------------|-----------|----------|-----------|------------|
| 1 | 9,32 | 12,5108 | 1,04 | 15865 |
| 2 | 10,21 | 20,8064 | 1,04 | 17121 |
| 3 | 11,90 | 5,5219 | 1,04 | 26431 |
| 4 | 12,27 | 8,3060 | 1,25 | 23413 |
| 5 | 13,10 | 15,2341 | 1,01 | 24591 |
| 6 | 14,30 | 5,6579 | 0,86 | 26686 |
| 7 | 15,52 | 22,6517 | 0,61 | 12009 |
| 8 | 17,60 | 1,2044 | 1,22 | 34461 |
| 9 | 18,12 | 3,3174 | 0,86 | 31085 |
| 10 | 19,19 | 8,0508 | 1,16 | 38034 |
| 11 | 20,10 | 5,7591 | 1,41 | 38451 |

Продолжение таблицы 110

| № пика | RT | S | As | NTP |
|--------|-------|---------|------|-------|
| 12 | 21,61 | 17,2587 | 1,00 | 32287 |
| 13 | 24,54 | 2,4675 | 1,00 | 50866 |

Данные, представленные в Таблице 110, свидетельствуют, что коэффициенты асимметрии пиков антоцианов на хроматограмме испытуемого раствора не превышают 2. Наиболее интенсивные пики с временами удерживания около: 9, 10, 11, 12, 13, 15, 19, 21 мин можно рекомендовать для подтверждения подлинности плодов черники. Также было установлено, что: коэффициент вариации значений времен удерживания цианидин-3-глюкозида на хроматограммах стандартного раствора при $n = 5$ не превышает 2,0 %, площадей пиков не более 4 %, фактор асимметрии пика находится в диапазоне от 0,8 до 1,5, число теоретических тарелок – более 3000.

Линейность была исследована с привлечением только СО цианидин-3-глюкозида, поскольку именно на него в последующем идет пересчет суммы всех антоцианов. Для определения линейности методики количественного определения готовили серии растворов СО цианидин-3-глюкозида в пределах от 1 до 40 мкг/мл (Рисунок 127).

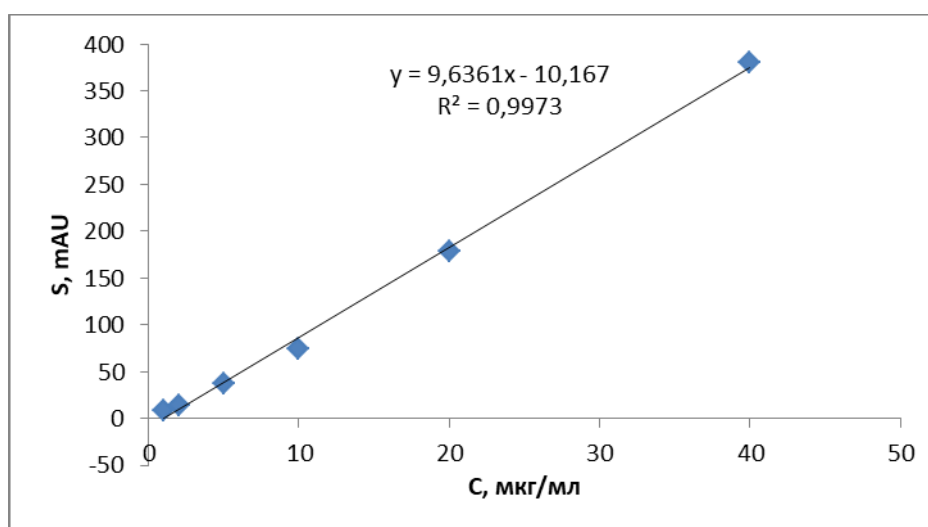


Рисунок 127 – Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации цианидин-3-глюкозида

Рисунок 127 подтверждает, что в диапазоне 1 – 40 мкг/мл площадь аналитического сигнала прямо пропорциональна концентрации цианидин-3-глюкозида. Линейность выявленной зависимости подтверждается расчетом коэффициента корреляции, который равен 0,9985.

Поскольку пересчет суммы антоцианов ведется на цианидин-3-глюкозид, то исследование правильности осуществлялось посредством добавки известного объема стандартного раствора к испытуемому раствору. Площадь пика, соответствующего цианидин-3-глюкозиду, будет изменяться, в то время как площади пиков других 12 антоцианов изменяться не будут. Проводили по три параллельных определения для каждой добавки, прибавляя к раствору извлечения раствор цианидин-3-глюкозида. Данные по изучению правильности разрабатываемой методики приведены в Таблице 111.

Таблица 111 – Правильность определения цианидин-3-глюкозида в плодах черники обыкновенной (*Vaccinii myrtilli fructus*) ($S = 12,8844 \text{ mAU}$)* ([63] – данные получены автором)

| Концентрация раствора добавки, мкг/мл | Площадь пика добавки, mAU | Ожидаемая площадь пика, mAU | Найдено, mAU | Открываемость, % |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|------------------|
| 5 | 37,3310 | 50,2154 | 48,5777 | 96,7 |
| 5 | 37,1160 | 50,0004 | 48,3372 | 96,7 |
| 5 | 37,1421 | 50,0265 | 47,6591 | 95,3 |
| 10 | 73,8730 | 86,7574 | 89,2602 | 102,9 |
| 10 | 72,9134 | 85,7978 | 88,4696 | 103,1 |
| 10 | 74,1011 | 86,9855 | 88,6854 | 102,0 |
| 20 | 159,3123 | 172,1967 | 168,1602 | 97,7 |
| 20 | 158,2317 | 171,1161 | 168,2743 | 99,0 |
| 20 | 157,1754 | 170,0598 | 167,4093 | 98,4 |

* – в скобках приведены данные для цианидин-3-глюкозида, содержащимся в водно-спиртовом извлечении из плодов черники

Продолжение таблицы 111

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|-------------------|
| Наименьшее значение, % | 95,3 |
| Наибольшее значение, % | 103,1 |
| Среднее значение (\bar{X}), % | 99,1 |
| Стандартное отклонение (s) | 2,90 |
| Стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{0}}$) | 0,97 |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{0},\%}$), % | 2,93 |
| Доверительный интервал (ΔX , P = 0,95) | 2,23 |

Данные Таблицы 111 свидетельствуют, что правильность количественного определения цианидин-3-глюкозида для средней величины каждого из трех определений находится в диапазоне от 95,0 до 105,0 %. Коэффициент вариации (n = 9) составляет 2,93 %. Для определения повторяемости рассчитывали коэффициент вариации по результатам количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид (n = 6) в испытуемом растворе. Результаты приведены в Таблице 112.

Таблица 112 – Оценка повторяемости методики количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид (n = 6, P = 0,95) ([63] – данные получены автором)

| ΣS | W, % | Содержание, % | \bar{X} , % | Станд. отклон. | Коэффициент вариации, % | Доверительный интервал |
|--|---------|---------------|----------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|
| 130,3883 | 14 | 2,65 | 2,62 | 0,08 | 2,95 | 0,08 |
| 130,6487 | | 2,66 | | | | |
| 131,8065 | | 2,68 | | | | |
| 127,8095 | | 2,60 | | | | |
| 130,0445 | | 2,65 | | | | |
| 121,5432 | | 2,47 | | | | |
| <i>CO</i> | | | <i>S₀</i> | | | |
| 1 | | | 73,9210 | | | |
| 2 | | | 73,8971 | | | |
| 3 | | | 74,0150 | | | |
| 4 | | | 73,8765 | | | |
| 5 | | | 74,0100 | | | |
| Среднее значение | | | 73,9439 | | | |
| Коэффициент вариации ($S_{\bar{0},\%}$), % | | | 0,09 | | | |

Коэффициент вариации результатов количественного определения суммы антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид) в плодах черники обыкновенной ($n = 6$) составляет 2,95 %.

Разработанная методика может быть использована не только для определения антоцианов в плодах черники обыкновенной, но и в других видах ЛРС, рекомендованных к медицинскому применению. Для этого было исследовано влияние измельченности сырья, содержание спирта этилового в экстрагенте, соотношения сырье-экстрагент, времени и кратности экстракции на извлечение антоцианов из сырья сухих плодов аронии черноплодной и цветков василька синего. Данные по влиянию указанных факторов на извлечение определяемых веществ из сухих плодов аронии черноплодной сухих в условиях ультразвуковой обработки представлены в Таблице 113.

Таблица 113 – Влияние параметров экстракции на извлечение антоцианов из сухих плодов аронии черноплодной (*Aroniae melanocarpae sicco fructus*)

| Этанол | Измельченность, мм | Соотношение сырье:экстрагент | Время, мин | X, % |
|--|--------------------|------------------------------|------------|-----------|
| <i>Измельченность сырья, мм</i> | | | | |
| 70 % | 5 | 1:40 | 60 | 0,15±0,02 |
| | 3 | | | 0,15±0,01 |
| | 2 | | | 0,15±0,04 |
| | 1 | | | 0,16±0,02 |
| | 0,5 | | | 0,17±0,04 |
| <i>Содержание этанола в экстрагенте, %</i> | | | | |
| 0 | 0,5 | 1:40 | 60 | 0,05±0,01 |
| 40 % | | | | 0,11±0,02 |
| 96 % | | | | 0,07±0,01 |
| <i>Сырье:экстрагент</i> | | | | |
| 40 % | 0,5 | 1:20 | 60 | 0,08±0,01 |
| | | 1:40 | | 0,11±0,02 |
| | | 1:80 | | 0,15±0,05 |
| <i>Время экстракции, мин</i> | | | | |
| 40 % | 0,5 | 1:40 | 30 | 0,23±0,02 |
| | | | 60 | 0,20±0,02 |
| | | | 120 | 0,19±0,04 |
| <i>Кратность экстракции</i> | | | | |
| 40 % | 0,5 | 1:40 | 30 | 0,21±0,02 |
| | | | 30+30 | 0,25±0,03 |
| | | | 30+30+30 | 0,25±0,05 |

На основании полученных данных были выбраны следующие условия экстракции: ультразвуковая обработка, 25°C, степень измельчения – 0,5 мм, экстрагент – спирт этиловый 40 %, время экстракции – 30 мин, кратность экстракции – 2. Влияние условий экстракции на извлечение антоцианов из цветков василька синего представлены в Таблице 114.

Таблица 114 – Влияние параметров экстракции на извлечение антоцианов из цветков василька синего (*Centaureae cyani flores*)

| Этанол | Измельченность, мм | Соотношение сырья:экстрагент | Время, мин | X, % |
|--|--------------------|------------------------------|-------------|-----------|
| <i>Измельченность сырья, мм</i> | | | | |
| 70 % | 2 | 1:40 | 60 | 0,10±0,01 |
| | 1 | | | 0,14±0,02 |
| | 0,5 | | | 0,13±0,03 |
| <i>Содержание этанола в экстрагенте, %</i> | | | | |
| 0 % | 1 | 1:40 | 60 | 0,21±0,03 |
| 40 % | | | | 0,22±0,03 |
| 96 % | | | | <0,003 |
| <i>Сырье:экстрагент</i> | | | | |
| 0 | 1 | 1:20 | 60 | 0,11±0,02 |
| | | 1:40 | | 0,22±0,03 |
| | | 1:80 | | 0,21±0,04 |
| <i>Время экстракции, мин</i> | | | | |
| 0 | 1 | 1:40 | 30 | 0,20±0,03 |
| | | | 90 | 0,20±0,03 |
| | | | 120 | 0,33±0,03 |
| <i>Кратность экстракции</i> | | | | |
| 0 | 1 | 1:40 | 120 | 0,23±0,04 |
| | | | 120+120 | 0,27±0,03 |
| | | | 120+120+120 | 0,28±0,04 |

Данные Таблицы 114 позволяют предложить следующие условия экстракции: ультразвуковая обработка, 25 °С, степень измельчения – 1 мм, экстрагент – вода, время экстракции – 120 мин, кратность экстракции – 2.

Примеры хроматограмм испытуемых растворов, полученных ультразвуковой обработкой смеси экстрагента и растительного материала при комнатной температуре, приведены на Рисунках 128–130.

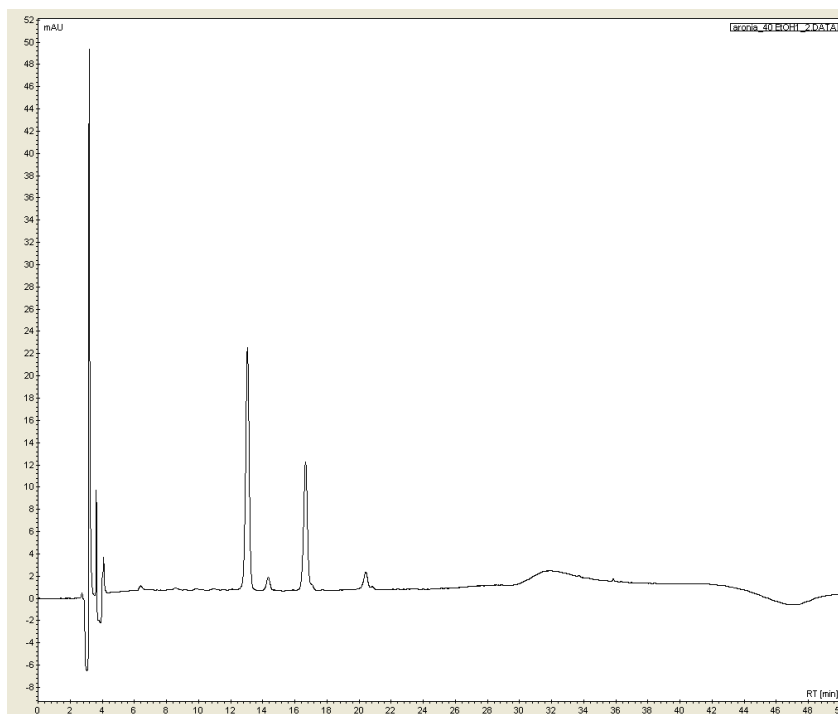


Рисунок 128 – Типичная хроматограмма извлечения из сырья сухих плодов аронии черноплодной (с использованием ультразвуковой обработки)

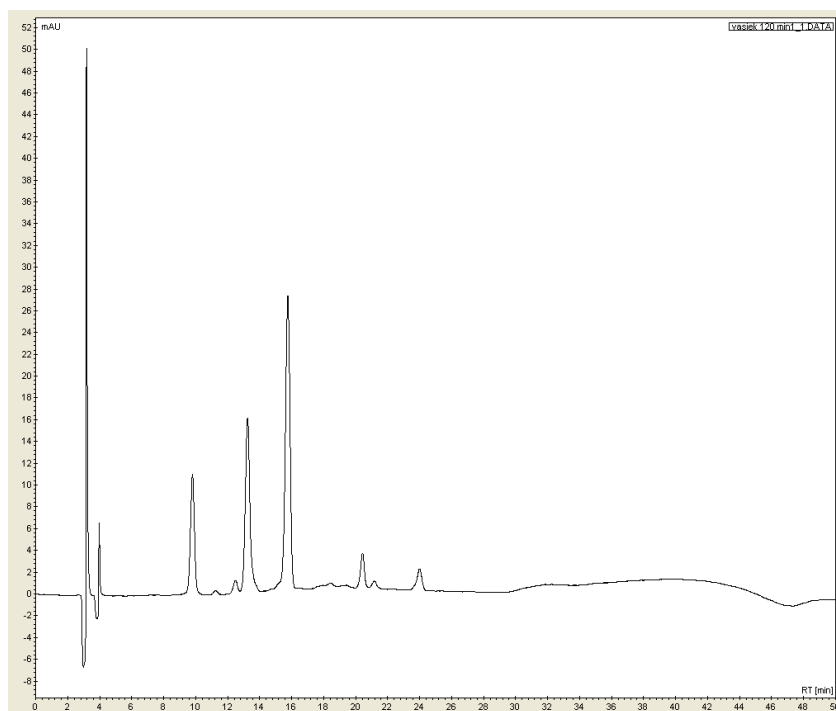


Рисунок 129 – Типичная хроматограмма извлечения из сырья цветков василька синего (с использованием ультразвуковой обработки)

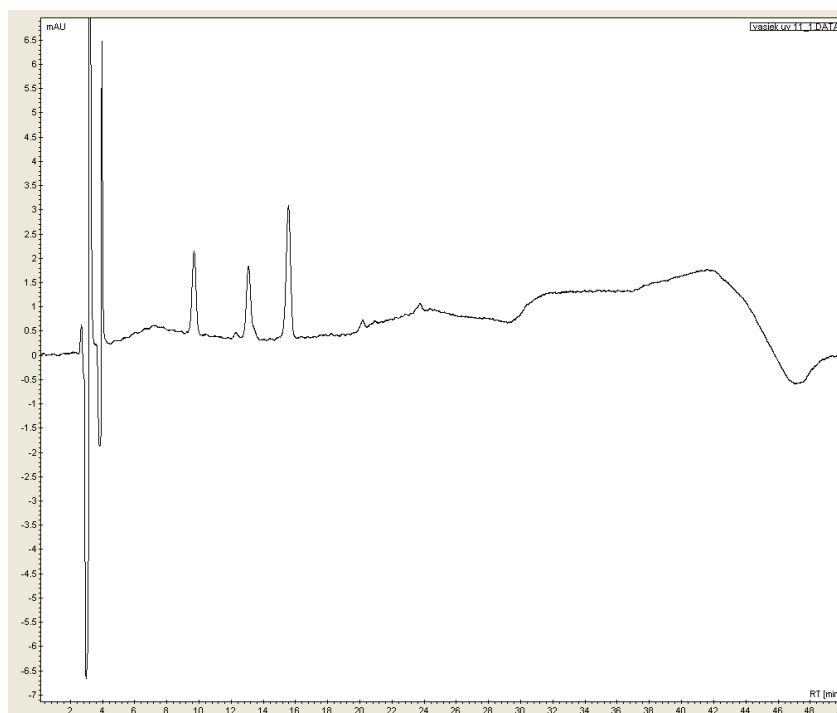


Рисунок 130 – Типичная хроматограмма извлечения из сырья цветков василька синего (пробоподготовка ГФ XIV)

На хроматограмме, представленной на Рисунке 128, отчетливо видны четыре пика антоцианов с временами удерживания около 13, 15, 17, 21 минуты, из которых наиболее интенсивным является первый пик с временем удерживания около 13 мин.

Хроматограмма извлечений из цветков василька синего (Рисунок 129) демонстрирует наличие 7 антоцианов удовлетворительно разделяющихся в предлагаемых хроматографических условиях. Времена удерживания пиков составляют около: 10, 12, 13, 16, 20, 21, 24 мин; пик с временем удерживания около 16 мин является наиболее интенсивным.

Разработанная методика пробоподготовки в мягких условиях и предлагаемые унифицированные хроматографические условия могут быть сопоставимы с фармакопейными спектрофотометрическими методиками количественного определения. Для этого растворы, полученные в результате проведенной пробоподготовки (согласно ГФ XIV), анализировались спектрофотометрическим и ВЭЖХ методами. Результаты представлены в Таблице 116.

Таблица 115 – Определение суммы антоцианов спектрофотометрическим и ВЭЖХ методами

| Образец | Пробоподготовка, рекомендованная ГФ XIV | | Разработанная методика |
|--|--|---------------------|------------------------|
| | X _{ВЭЖХ} , % | X _{УФ} , % | X _{ВЭЖХ} , % |
| Черники обыкновенной плоды (<i>Vaccinii myrtilli fructus</i>) | 1,25±0,08* | 1,53±0,11* | 1,29±0,07* |
| Аронии черноплодной плоды сухие (<i>Aroniae melanocarpae sicco fructus</i>) | 0,94±0,10* | 6,88±0,13* | 0,25±0,05* |
| Василька синего цветки (<i>Centaureae cyani flores</i>) | 0,44±0,08* | 0,83±0,07** | 0,35±0,06* |

* – в пересчете на цианидин-3-глюкозид; ** – в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид

Данные, представленные в Таблице 115, свидетельствуют о хорошем согласовании результатов, полученных с помощью разработанной и фармакопейной методик для сухих плодов черники. Результаты, полученные при определении суммы антоцианов методом ВЭЖХ в извлечениях (подготовлены по описанной в фармакопее процедуре) из сухих плодов черники, совпадают; хроматограмма испытуемого раствора аналогична хроматограмме, приведенной на Рисунке 125.

Для цветков василька синего наблюдаемая картина сложнее. Так, результаты определения суммы антоцианов ВЭЖХ-методом в пересчете на цианидин-3-глюкозид после фармакопейной пробоподготовки (Рисунок 130) и пробоподготовки, разработанной в данной работе (Рисунок 129), показывают удовлетворительное согласование. Однако, при определении аналитов спектрофотометрическим методом результат анализа оказывается завышенным практически в два раза. Это различие может быть объяснено способом пересчета суммы действующих веществ. При определении суммы антоцианов фармакопейным спектрофотометрическим методом пересчет ведется на цианидин-3,5-дигликозид – основной антоциан цветков василька, в то время как при использовании ВЭЖХ перерасчет ведется на более доступный, дешевый фармакопейный СО цианидин-3-глюкозида – вещества, содержащимся в цветках василька в меньших количествах. Тем не менее, можно ожидать, что при наличии СО цианидин-3,5-дигликозида фармакопейного качества, метод ВЭЖХ даст

результаты достаточно близкие к результатам, получаемым спектрофотометрическим методом.

Анализ извлечений, получаемых из сухих плодов аронии черноплодной, позволил установить, что содержание антоцианов в свободной форме не превышает 1 %. В тоже время полученные данные позволяют выдвинуть предположение, что антоцианы в плодах аронии черноплодной находятся в связанной полимерной форме. При определении антоцианов по ГФ XIV происходит, по-видимому, гидролиз полимерных форм анализов в результате чего образуется смесь окрашенных продуктов (антоцианидинов) распада. Последнее приводит к существенному росту оптической плотности при спектрофотометрическом определении. На возможность такого процесса указывает и вид хроматограмм (Рисунок 131), зарегистрированных для извлечений, полученных по ГФ XIV. Так, на Рисунке 131 наблюдается уширенный пик с временем удерживания около 33 минут, который может указывать на наличие таких продуктов гидролиза, а также пик, отсутствующий на хроматограмме на Рисунке 128, с временем удерживания около 22 мин.

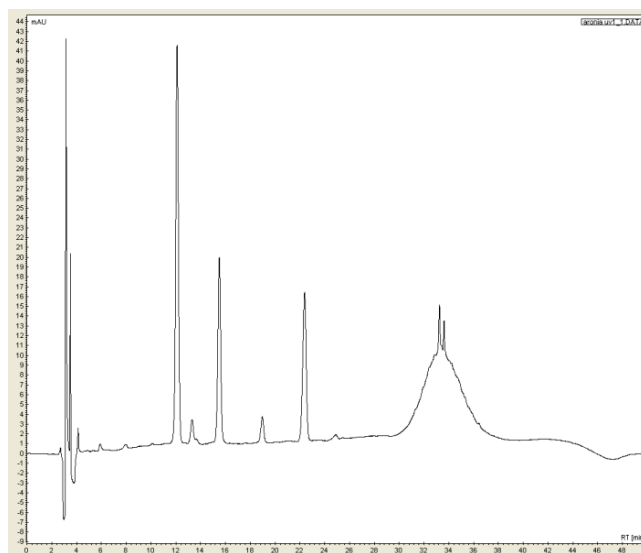


Рисунок 131 – Типичная хроматограмма извлечения из сырья сухих плодов аронии черноплодной (пробоподготовка ГФ XIV)

Несмотря на очевидные преимущества извлечения определяемых веществ в «мягких» условиях с использованием ультразвука, применение этого метода требует затрат времени значительно больших, чем при использовании методов пробоподготовки, описанных в ГФ XIV. Поэтому для целей стандартизации и

контроля качества ЛРС особенно в заводских условиях можно рекомендовать более быстрые фармакопейные методики пробоподготовки в сочетании с определением анализируемых веществ методом ВЭЖХ, который обеспечивает максимальную унификацию и автоматизацию процесса, а также позволяет получать антоциановый профиль, позволяющий судить о подлинности сырья. Для научных исследований более предпочтительным является сочетание фармакопейной и разработанной методик. Приготовление растворов представлено в таблицах 116 и 117.

Методика

Таблица 116 – Унифицированная методика количественного определения суммы антоцианов в ЛРС методом ВЭЖХ/УФ: приготовление растворов ([63] – методика разработана автором)

| Этап | Описание этапа |
|--|---|
| <i>Подвижная фаза А</i> | В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл муравьиной кислоты. Объем раствора доводят водой до метки, перемешивают. |
| <i>Подвижная фаза Б</i> | В стакане смешивают 100 мл муравьиной кислоты, 400 мл воды, 500 мл ацетонитрила. |
| <i>Стандартный раствор</i> | Около 2,5 мг (точная навеска) СО цианидин-3-глюкозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в метаноле при перемешивании, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (концентрация цианидин-3-глюкозида <i>около 0,1 мг/мл</i>). Раствор хранят в холодильнике при температуре не выше +2°C. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация цианидин-3-глюкозида <i>около 0,01 мкг/мл</i>). Раствор используют свежеприготовленным |
| <i>Испытуемый раствор (ультразвуковая обработка при комнатной температуре)</i> | Около 2 г (точная навеска) сырья с размером частиц, проходящими через сито 0,5 мм (для сухих плодов черники и аронии черноплодной) или 1 мм (для цветков василька синего), помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл 40% спирта этилового (для сухих плодов черники или аронии черноплодной) или воды (для цветков василька), помещают в ультразвуковую баню и озвучивают в течение 60 мин (для сухих плодов черники), 30 мин (для сухих плодов аронии черноплодной), 120 мин (для цветков василька синего) при комнатной температуре, периодически помешивая. Реакционную массу фильтруют на воронке Бюхнера, высланной фильтровальной бумагой типа «Белая лента», под вакуумом, остаток на фильтре помещают в ту же колбу, в которой проводили извлечение. Экстракцию повторяют еще один раз. Полученные фильтраты объединяют и переносят в мерную колбу объемом 250 мл, доводят объем раствора 40% спиртом этиловым до метки и перемешивают (раствор А). 1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б). Раствор используют свежеприготовленным. Перед определением 5 мл раствора Б пропускают через гидрофобный политетрафторэтиленовый мембранный фильтр ETI Syringe с размером пор 0,45 мкм и диаметром 13 мм |

Таблица 117 – Унифицированная методика количественного определения суммы антоцианов в ЛРС методом ВЭЖХ/УФ: фармакопейные методы подготовки испытуемых растворов

| <i>Тип сырья и стадия</i> | <i>Обработка аналитической пробы</i> |
|---|---|
| <i>Плоды черники</i> | Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, но не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, добавляют 50 мл спирта 60%, содержащего хлористоводородной кислоты 1 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 60 минут, затем охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент спиртом 60 %, содержащим хлористоводородной кислоты 1 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр |
| <i>Плоды аронии черноплодной сухие</i> | Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл спирта 96%, содержащего 1%-й хлористоводородной кислоты концентрированной. Экстракцию проводят при нагревании на водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой во флакон темного стекла |
| <i>Василька синего цветки</i> | Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0,3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты 1 %, выдерживают на водяной бане при температуре 40–45 °С в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл. Вату с сырьем помещают в коническую колбу, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты 1 %, предварительно смывая частицы сырья с воронки в колбу, и повторяют экстракцию в указанных выше условиях. Затем содержимое колбы фильтруют через вату в ту же мерную колбу. Сырье на фильтре промывают 40 мл хлористоводородной кислоты 1 %. После охлаждения содержимое колбы доводят хлористоводородной кислотой 1 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 мл, отбрасывая первые 10 мл |
| <i>Финишная подготовка к определению антоцианов</i> | Перед определением антоцианов методом ВЭЖХ 1 мл извлечения, полученного по фармакопейным методикам пробоподготовки, помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят водой до метки. Перед помещением в вials полученный раствор пропускают через гидрофобный политетрафторэтиленовый мембранный фильтр ETI Syringe с размером пор 0,45 мкм и диаметром 13 мм |

Хроматографические условия приведены в таблице 109. «Время хроматографирования в этих условиях 50 мин. Время удерживания пика цианидин-3-глюкозида около 13 мин.

Регистрируют хроматограммы испытуемого и стандартного растворов.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка ППХС».

Проверка ППХС. Хроматографируют стандартный раствор цианидин-3-глюкозида не менее 5 раз. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цианидин-3-глюкозида *не менее 3000 теоретических тарелок*;
- фактор асимметрии пика цианидин-3-глюкозида *не менее 0,8 и не более 1,5*;
- относительное стандартное отклонение площади пика цианидин-3-глюкозида *не более 4 %*», (Никифорова М. В., 2020, Приложение Г) времени удерживания *не более 2 %*.

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы. При извлечении антоцианов из сырья с использованием ультразвуковой обработки при комнатной температуре содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид в субстанциях растительного происхождения, в процентах (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 250 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 1000}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S – сумма площадей всех пиков антоцианов на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика цианидин-3-глюкозида на хроматограммах стандартного раствора;

a_0 – навеска СО цианидин-3-глюкозида, г;

a – навеска сырья, г;

P – содержание основного вещества в СО цианидин-3-глюкозида, %;

W – влажность сырья, %.

При использовании пробоподготовок, описанных в ГФ XIV, содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид в плодах черники, сухих плодах аронии черноплодной, цветках василька синего в процентах (X, %) рассчитывают по формулам:

- для плодов черники

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot 200 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

– для сухих плодов аронии черноплодной

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot 120 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

– для цветков василька синего

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 250 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1000 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S – сумма площадей всех пиков антоцианов на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика цианидин-3-глюкозида на хроматограммах стандартного раствора;

a_0 – навеска СО цианидин-3-глюкозида, г;

a – навеска сырья, г;

P – содержание основного вещества в СО цианидин-3-глюкозида, %;

W – влажность сырья, %.

Таким образом, разработана ВЭЖХ-методика определения антоцианов в ЛРС, обладающая удовлетворительной точностью (относительная погрешность – 3,05 %). Методика дает возможность не только количественно определять сумму антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид или для цветков василька – на цианидин-3-5-дигликозид), но и одновременно с этим получать «антоциановый профиль», что важно при фитохимических исследованиях. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют сделать вывод о допустимости использования норм, установленных в ГФ XIV для плодов черники, при определении суммы антоцианов в том же ЛРС с помощью разработанной в настоящей работе ВЭЖХ/УФ-методики.

Подготовлена ОФС «Определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ» (см. Приложение Б).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Разработана и валидирована методика количественного определения арбутина методом ВЭЖХ. Показано, что масс-спектрометрический детектор, работающий в режиме MRM, значительно менее чувствителен, чем УФ-детектор. В процессе разработки были получены масс-спектры арбутина в условиях ионизации типа «Электроспрей»; с помощью современных методов квантовой

химии объяснен вид масс-спектра и устойчивость образующихся в результате распада родительского иона дочерних ионов. МС-детектор может использоваться в тех случаях, когда содержание арбутина в сырье составляет более 6–7 % (листья толокнянки обыкновенной). При содержании арбутина менее 5 % чувствительности данного типа детектора не достаточно, поэтому в данном случае он не подходит для разработки унифицированной ВЭЖХ-методики. Более перспективным с этой точки зрения является спектрофотометрический детектор, который позволил определять арбутин в сырье различных морфологических групп (листья толокнянки обыкновенной, листья брусники обыкновенной, корневища бадана толстолистного, ферментированные листья бадана толстолистного (Чигирский чай), трава зимолюбки, трава ортилии однобокой).

2. Разработана унифицированная методика ультразвуковой пробоподготовки при комнатной температуре и отсутствии кислот, предлагаемой в работе, для извлечения антоцианов из ЛРС с условиями пробоподготовки, приведенными в ГФ XIV. Проведенные исследования показали равнозначность подходов. В качестве метода определения был выбран ВЭЖХ, позволяющий проводить не только количественное определение аналитов, но и одновременно получать «антоциановый профиль» для каждого вида сырья. Установлено, метод ВЭЖХ с предлагаемыми унифицированными условиями хроматографического разделения прекрасно сочетается как с пробоподготовкой в условиях обработки ультразвуком, так и с пробоподготовкой, рекомендуемой в ГФ XIV. С использованием ВЭЖХ было показано, что для плодов аронии черноплодной сухих вопрос о стандартизации сырья по содержанию суммы антоцианов является дискуссионным.

ГЛАВА 7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РУТИННОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РАЗРАБОТАННЫХ МЕТОДИК В ЗАВОДСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Для подтверждения работоспособности АЭС-ИСП и ЭТААС-методик, а также для исследования возможностей ионометрии для определения бромидов и нитратов было проанализировано 35 образцов: трава душицы обыкновенной, трава горца птичьего, листья сенны, кора дуба, трава золототысячника, корни и корневища кровохлебки лекарственной, цветки липы, корни одуванчика лекарственного, листья подорожника большого, корни алтея, трава фиалки, семена льна посевного, корни лопуха, плоды шиповника, листья шалфея лекарственного, трава пустырника, цветки ромашки аптечной, трава чистотела большого, трава зверобоя, цветки пижмы обыкновенной, трава эрвы шерстистой, корни и корневища девясила высокого, листья мать-и-мачехи обыкновенной, слоевища ламинарии, цветки бессмертника песчаного, побеги багульника болотного, листья березы, листья ортосифона тычиночного, трава Melissa лекарственной, листья толокнянки обыкновенной, листья брусники обыкновенной, трава боровой матки, трава зимолюбки, ферментированные листья бадана, корневища бадана толстолистного. Йодиды определялись в слоевищах ламинарии, кремний (в пересчете на SiO_2) – в траве хвоща полевого. Унифицированность ВЭЖХ-методики определения арбутина продемонстрирована на 6 образцах ЛРС (листья толокнянки обыкновенной, листья брусники обыкновенной, корневища бадана толстолистного, трава боровой матки, трава зимолюбки, ферментированные листья бадана). Унификация ВЭЖХ-методики количественного определения суммы антоцианов проведена на трех образцах субстанций природного происхождения: черники обыкновенной плодах, аронии черноплодной плодах сухих, василька синего цветках, а спектрофотометрическая методика определения восстанавливающей суммы сахаров - на девяти субстанциях: листьях мать-и-мачехи обыкновенной, листьях подорожника большого, цветках липы, семенах льна посевного, траве фиалки, корнях алтея, корнях лопуха, корнях одуванчика лекарственного, корнях и корневищах девясила высокого.

Результаты, полученные в настоящей работе, позволили сформулировать единый подход к стандартизации ЛРС, содержащих одинаковую группу биологически активных веществ. Единый подход заключается в анализе субстанций природного происхождения по методикам, реализуемым в одинаковых условиях; при этом подбираются только индивидуальные параметры пробоподготовки, зависящие от структуры и морфологии сырья (измельченность, условия экстракции), которые принципиально невозможно унифицировать. Последнее является следствием разного морфологического строения структур, содержащих биологически активные вещества, присутствием других действующих веществ, которые также влияют на извлекаемость целевых соединений. Несмотря на это, методики скорректированы и оптимизированы в части непосредственного проведения инструментального анализа, полученных из ЛРС извлечений. Все разработанные методики апробированы на значительном количестве материала разных видов субстанций природного происхождения, что подтвердило возможность применения этих методик и нашло свое отражение в соответствующих ОФС.

7.1. Пробоподготовка ЛРС к определению микроэлементов

При определении элементов, находящихся на макро- и микроуровне содержаний, рекомендуется использовать методы, сочетающие в себе быстроту и многоэлементность, что особенно важно для лабораторий, занимающихся контролем качества и стандартизацией ЛРС. Таким методом, безусловно является АЭС-ИСП. Несмотря на очевидные преимущества, методу АЭС-ИСП присущ ряд недостатков, которые необходимо учитывать при определении металлов этим методом: невозможность введения в плазму растворов, содержание органических веществ в которых превышает 1–2 %, спектральные влияния со стороны эмиссионных линий других элементов, аргидные влияния, наиболее сильно проявляющиеся в видимой области спектра. Очевидными методологическими подходами, позволяющими устранить эти нежелательные эффекты, являются:

– использование азотной кислоты. Азотная кислота позволяет эффективно разлагать органическую матрицу ЛРС, а также реагирует с определяемыми

металлами, давая растворимые и в большинстве случаев нелетучие нитраты. Разложение желательно вести в закрытых МВ-системах, которые способствуют сокращению времени разложения образца в разы (по сравнению с классическими методами, представленными в ГФ XIV) за счет объемного нагрева реакционной массы. Применение МВ-систем позволяет избежать потерь элементов, в том числе летучих, если температура разложения не превышает 170 °С. Повышение и снижение температуры реакционной массы следует проводить постепенно во избежание неконтролируемого роста давления в сосудах и их преждевременной разгерметизации, сопровождающейся обычно выбросом содержимого. Необходимо избегать присутствия серной (многие элементы дают с ней нерастворимые сульфаты) и хлорной (чрезвычайно взрывоопасна) кислот. Более того, измерение эмиссии (или абсорбции) элементов, находящихся в азотнокислых растворах, способствуют снижению/устранению эффектов памяти, вероятность возникновения которых при анализе растворов сложного состава весьма высока;

– адекватный выбор из справочника, встроенного в прибор, аналитических длин волн эмиссии, лежащих в ультрафиолетовой области спектра (исключение – щелочные металлы, у которых наиболее чувствительные линии лежат в видимой области спектра) и позволяющих обеспечить высокую чувствительность определения. Для повышения точности рекомендуется проводить измерение эмиссии одновременно на двух длинах по соответствующим калибровочным кривым, а результат рассчитывать как среднее арифметическое из полученных значений концентраций. При измерении элементов в разбавленных растворах, полученных кислотным разложением субстанций растительного происхождения, возникновение сильных матричных эффектов и эффектов памяти маловероятно, поэтому использование добавки внутреннего стандарта для их учета, как правило, не требуется.

Определение концентрации металлов в испытуемых растворах необходимо проводить не по раствору стандарта, а по калибровочной кривой.

Возможности АЭС-ИСП для определения йода являются ограниченными, так как его аналитические линии характеризуются высокими энергиями

возбуждения, что не позволяет достигать удовлетворительных метрологических характеристик. По этой причине рекомендуется для определения йода в сырье применять иные инструментальные методы. На сегодняшний день единственным природным источником йода, рекомендованным к медицинскому применению, являются слоевища ламинарии. Поскольку значительная часть йода в данной водоросли находится в форме йодидов, то методологически обоснованным является применение достаточно простого и недорогого метода ионометрии при условии использования высокоселективных йодид-электродов. Йодиды извлекаются из сырья горячей водой; при этом следует избегать применения кислот, щелочей, перекисей, так как они могут разрушить селективную мембрану электрода. Нежелательно использовать в процессе пробоподготовки органические экстрагенты, поскольку они также способны повредить ионселективную мембрану. Далее в полученных извлечениях ведется определение йодид-ионов по заранее построенному калибровочному графику с помощью индикаторного йодид-селективного электрода; в качестве электрода сравнения используется хлорсеребряный электрод. При определении требуется использовать только промышленно изготовленные электроды. В качестве фонового электролита рекомендуется применять раствор 1 М KNO_3 .

Определение кремния методом АЭС-ИСП затруднено вследствие невозможности определения данного элемента в растворах, содержащих плавиковую кислоту (необходима для перевода кремния в раствор). Поэтому для определения Si рекомендуется использовать спектрофотометрию. В качестве метода пробоподготовки необходимо использовать сплавление со смесью натрия карбоната и натрия тетрабората, что позволяет полностью избавиться от органической матрицы анализируемого объекта. Окрашивание проводится раствором аммония молибдатом 5%, получающийся нестойкий комплекс далее восстанавливается метолом, который устойчив в течение длительного времени. Мешающее влияние других элементов при спектрофотометрическом определении кремния маскируется добавкой винной кислоты. Определение Si в пересчете на SiO_2 проводится по калибровочной кривой построенной на основе СО природного

объекта, содержащего кремний. В связи с отсутствием СО кремнефильных растений и наличием этапа сплавления, разрушающего не только органическую, но и силикатную матрицу образцов, можно использовать любой геохимический СО (руды, породы, донные отложения и т. д.) с содержанием SiO_2 около 40 %.

7.2. Определение кадмия, свинца, мышьяка

При определении следовых количеств (нг/г) кадмия, свинца и мышьяка в природных объектах наиболее коммерчески доступным методом является высокоселективный метод ЭТААС. Определение Cd, Pb, As ведут на длинах волн 228,8, 283,3, 193,7 нм соответственно в растворах после кислотного разложения растительного материала в МВ-печах (см. Пробоподготовка ЛРС к определению макроэлементов). Кадмий определяется без каких-либо затруднений. Однако физико-химические особенности свинца и мышьяка диктуют необходимость использования растворов модификаторов для устранения потерь элементов на стадии термообработки. В качестве эффективных модификаторов предлагается использовать раствор $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 1 % (для мышьяка) и раствор аскорбиновой кислоты 1 % (для свинца). Для получения адекватных результатов анализа желательно:

- применять графитовую кювету с пиропокрытием;
- выбирать температурно-временные условия определения для каждого элемента при использовании разных марок графитовых кювет или приборов. Для этого сначала выбирают постоянную температуру атомизации выше 2000 °С, но ниже 2700 °С (чтобы избежать чрезмерного износа кюветы), например 2100 °С, регистрируют сигналы абсорбции элемента на стадии термообработки начиная с температуры 100 °С до температуры 1500 °С с шагом 50–100 °С. Максимальную температуру, при которой не наблюдаются потерь элемента, принимают за температуру термообработки (пиролиза). Аналогично поступают при определении температуры атомизации: при выбранной температуре пиролиза регистрируют сигнал абсорбции элемента. Минимальную температуру, при которой наблюдается максимальный сигнал абсорбции принимают за температуру атомизации;

– чтобы объем аликвоты анализируемого раствора, вводимого в кювету, равнялся объему вводимого модификатора для обеспечения наибольшей эффективности модифицирования определяемого элемента в процессе термообработки (обычно 10–20 мкл);

– чтобы температура отжига (очистки) кюветы определялась увеличением температуры атомизации на 100–200 °С;

– использовать градуировочную кривую для определения концентрации элементов в испытуемых растворах.

Схематично определение металлов и кремния представлено на Рисунке 132.

7.3. Определение суммы восстанавливающих сахаров. Выделение полисахаридов из ЛРС

При определении суммы сахаров и полисахаридов с помощью разработанной спектрофотометрической методики (по методу Дюбуа) рекомендуется в качестве СО использовать глюкозу в тех случаях, когда сахара в растворах преимущественно находятся в пиранозной форме. К такому типу сырья относятся растения, содержащие, например, слизи: листья мать-и-мачехи, листья подорожника большого, цветки липы, трава фиалки, корни алтея. При определении суммы сахаров и полисахаридов в инулинсодержащем сырье: корнях лопуха, корнях одуванчика, корнях и корневищах девясила более методологически правильно в качестве СО использовать фруктозу, поскольку аналиты присутствуют в растворах преимущественно в форме фураноз.

При прибавлении реагентов, необходимых для развития окраски, желательно использовать вихревую мешалку, так как при смешении водных смесей испытуемых растворов с фенолом с серной кислотой концентрированной выделяется значительное количество теплоты. Смешение необходимо вести в открытых пробирках. Дополнительного нагрева для развития окраски, в отличие от фармакопейных методик, не требуется. Принципиальная схема определения сахаров представлена на Рисунке 133.

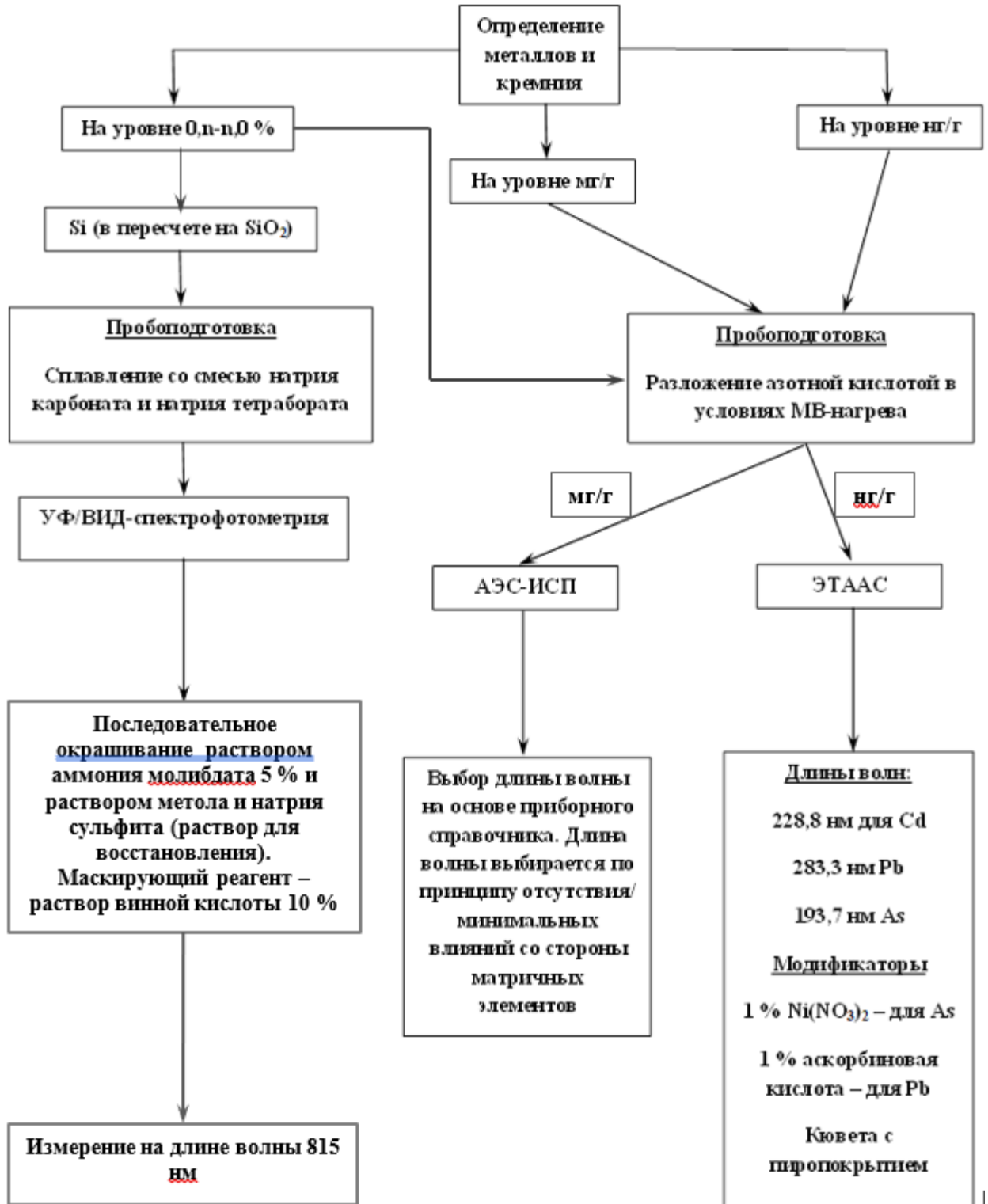


Рисунок 132 – Схема определения металлов и кремния в ЛРС с использованием современных инструментальных методов

При наличии в молекулах сахаров реакционноспособных фрагментов, отличных от гидроксильных групп и способных к ионизации, вместо спектрофотометрии можно рекомендовать более современные

автоматизированные инструментальные методы анализа, например ВЭЖХ/МС как в случае с определением глюкозамин сульфата в геле для наружного применения.

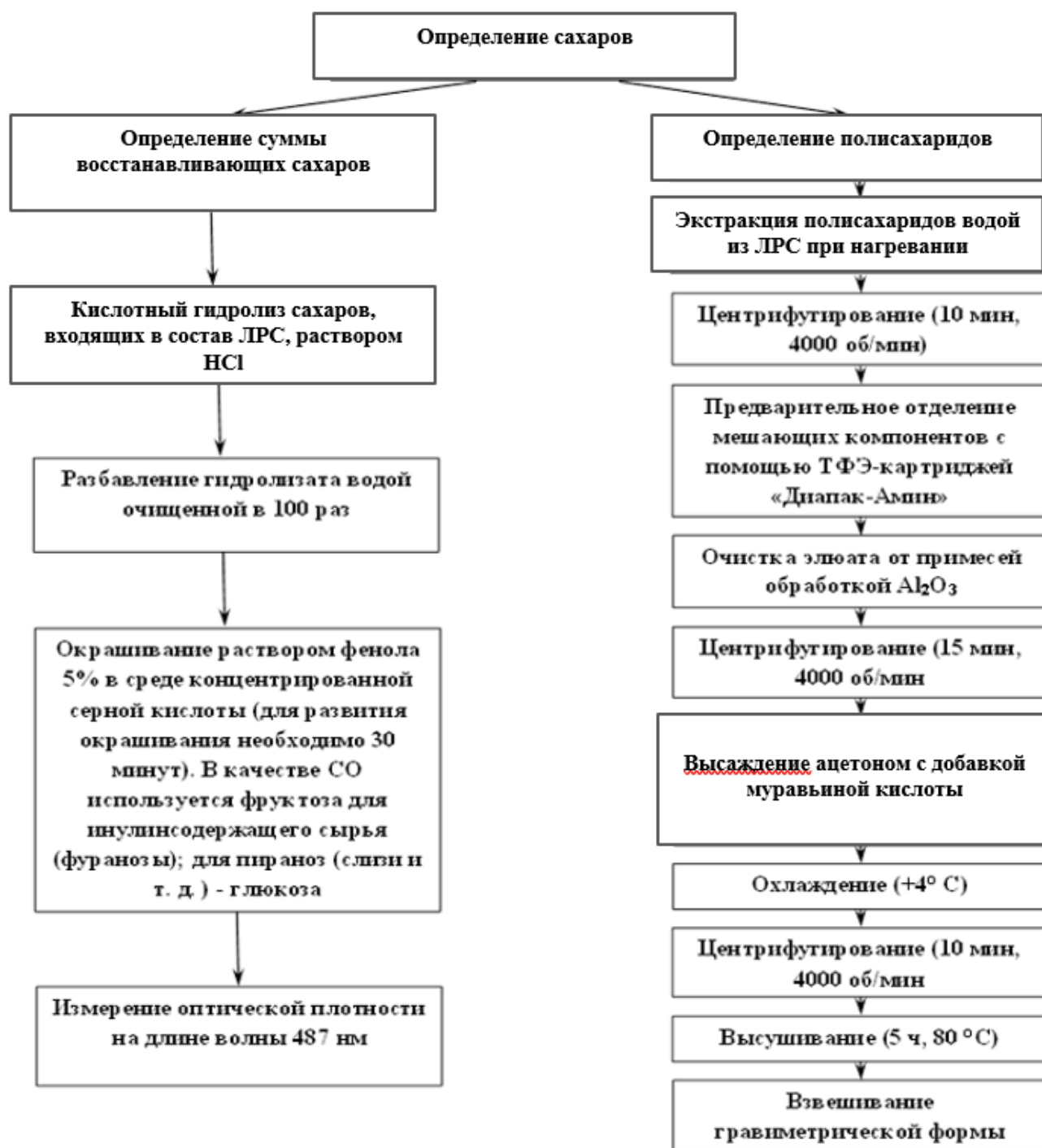


Рисунок 133 – Принципиальная схема определения сахаров (пояснения в тексте)

Пробоподготовку образцов к определению аналитов в ЛРС желательно вести на плитке для более полного кислотного гидролиза полимерных углеводных молекул. В качестве кислот рекомендуется использовать сильные

концентрированные кислоты, не обладающие окисляющим действием, например хлористоводородную. Концентрация кислоты в реакционной массе должна быть не ниже 3 и не выше 8 %.

При необходимости гравиметрического определения полисахаридов высаживать последние рекомендуется апротонными растворителями, например, ацетоном с добавкой муравьиной кислоты, так как данный осадитель в отличие от спирта этилового 95 % позволяет обеспечить более полное осаждение гравиметрической формы. Осаждение рекомендуется проводить при температурах 4–8 °С, поскольку в этом случае наблюдается ускорение роста частиц аналитов. Перед прибавлением осадителя испытуемый раствор необходимо обязательно очищать от сопутствующих веществ пропусканием через картридж «Диапак Амин» и встряхиванием полученного элюата с окисью алюминия. Осадок центрифугируют при скорости 4000 об/мин и далее сушат в сушильном шкафу до постоянной массы.

7.4. Определение арбутина и суммы антоцианов в ЛРС

При определении индивидуальных веществ – арбутина в ЛРС методом ВЭЖХ для лучшего разделения определяемых веществ от сопутствующих компонентов сырья рекомендуется использовать длинные колонки: 4,6×250 мм, размер частиц 5 мкм. При выборе аналитической колонки следует особое внимание обращать на выполнение теста пригодности хроматографической системы – только при выполнении данного теста колонка может быть использована для анализа. Объем вводимой аликвоты не должен превышать объема петли хроматографа и возможностей колонки. При применении разработанных методик к анализу субстанций растительного происхождения на содержании арбутина необходимо по возможности избегать области дальнего ультрафиолета, поскольку на длинах волн ниже 220 нм поглощают практически все органические вещества, включая растворители и подвижные фазы. Необходимо вести измерение аналитического сигнала при длине волны 280 нм. При содержании действующих веществ менее 0,5

% рекомендуется для получения точных данных анализа рекомендуется увеличить объем вводимой аликвоты до 50 мкл.

Определение суммы антоцианов в ЛРС методом ВЭЖХ/УФ в условиях заводских лабораторий контроля качества и острой нехватки времени можно проводить после пробоподготовки, рекомендуемой в ГФ XIV. В научно-исследовательских целях может быть проведена пробоподготовка озвучиванием при комнатной температуре в отсутствие добавок кислот (по методике прописанной выше). В качестве хроматографической необходимо использовать колонку марки Zorbax SB-Phenyl C18, 5 мкм, 250×4,6 мм, так как она устойчива к низким значениям pH и позволяет добиться лучшего разделения и формы пиков. Аналитическую длину волны следует выбирать в области 530 нм (видимая область), поскольку в этой области поглощают только интенсивно окрашенные антоцианы. Перед определением антоцианов водно-спиртовые и водные подкисленные извлечения (полученные по ГФ XIV) необходимо разбавить в 10 раз. Расчет суммы антоцианов в пересчете на СО проводится после суммирования всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора. Принципиальная схема определения арбутина, суммы антоцианов методом ВЭЖХ/УФ представлена на Рисунке 134.

7.5. Квантово-химические расчеты

Выбор конкретного метода должен осуществляться только исходя из поставленных задач, приемлемого уровня расчета и соответствия между экспериментальными и расчетными результатами. Так при расчете необходимо задать первоначальную конфигурацию молекулы, указав заряд и мультиплетность, рассчитать структуру полуэмперическим методом (AM1, PM3, CNDO, MNDO и т. д.). Оптимизированная с помощью этих методов структура будет первой итерацией для последующего расчета неэмперическими методами (метод Хартри–Фока–Рутана, теория функционала плотности, теория возмущений, метод связанных кластеров и т.д.). При выборе базисных наборов можно рекомендовать наиболее широко используемые наборы Попла. Для расчетов молекул необходимо

ориентироваться на следующее правило: чем более точные результаты (с точки зрения описания свойств) желает получить исследователь, тем больше должен быть базисный набор.

Например: 3–21G – двухэкспоненциальный базисный набор включает в себя 3 орбитали гауссова типа для описания внутренних оболочек атомов, цифры 2,1 определяют число гауссовых функций, входящих в СОГТ и описывают валентные оболочки атомов.

Для исследования слабых взаимодействий на качественном уровне рекомендуется увеличить базисный набор включением например поляризационных функций, как например в базисе 6–311G (d,p). При этом нужно учитывать, что с увеличением базисного набора, а также при переходе от полуэмперических методов к неэмперическим машинное время, необходимое для расчета, существенно возрастает. Поэтому чем ниже уровень расчета необходим, тем проще должен быть базисный набор при использовании неэмперических методов. Для получения приближенных данных можно ограничиться применением полуэмперических методов. Однако нужно помнить, что в данной категории методов параметризация осуществляется по определенному кругу элементов и по их определенным свойствам. Тем не менее, при недостаточности машинных ресурсов их можно использовать. Наиболее современным полуэмперическим методом является PM3 и его разновидности. Не рекомендуется описывать слабые взаимодействия методом AM1; при выборе DFT-методов базис расчета должен быть не ниже 6–311G(d,p).

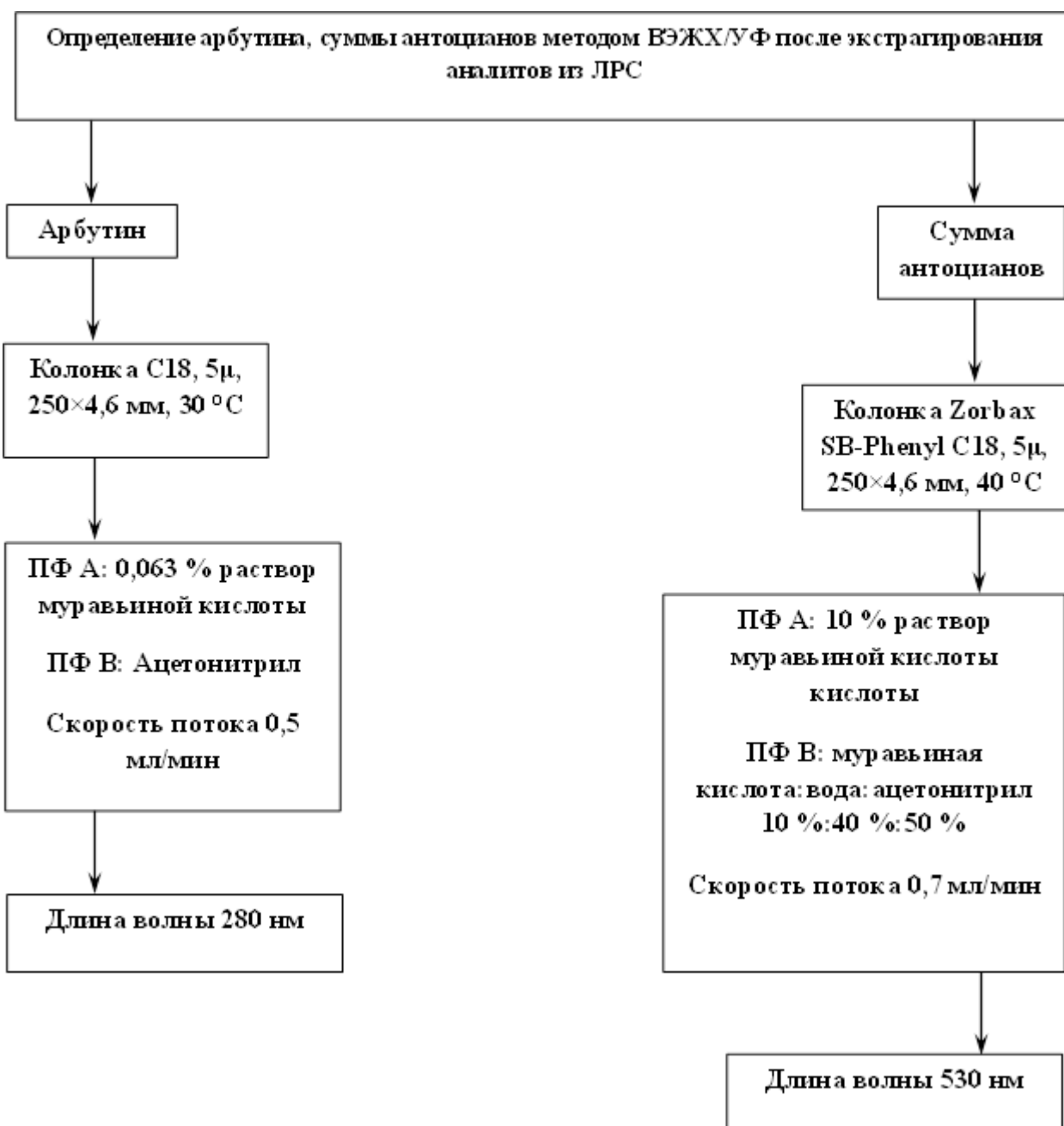


Рисунок 134 – Принципиальная схема определения арбутина, суммы антоцианов методом ВЭЖХ/УФ (пояснения в тексте)

Основываясь на результатах проделанной работы, была предложена схема-алгоритм (Рисунок 135), определяющая последовательность действий при разработке унифицированных методик анализа для целей стандартизации и контроля качества ЛРС. Предложенная последовательность, разработанная для анализа ЛРС, в дальнейшем может быть использована и для улучшения стандартизации лекарственных препаратов, полученных на основе субстанций природного происхождения.

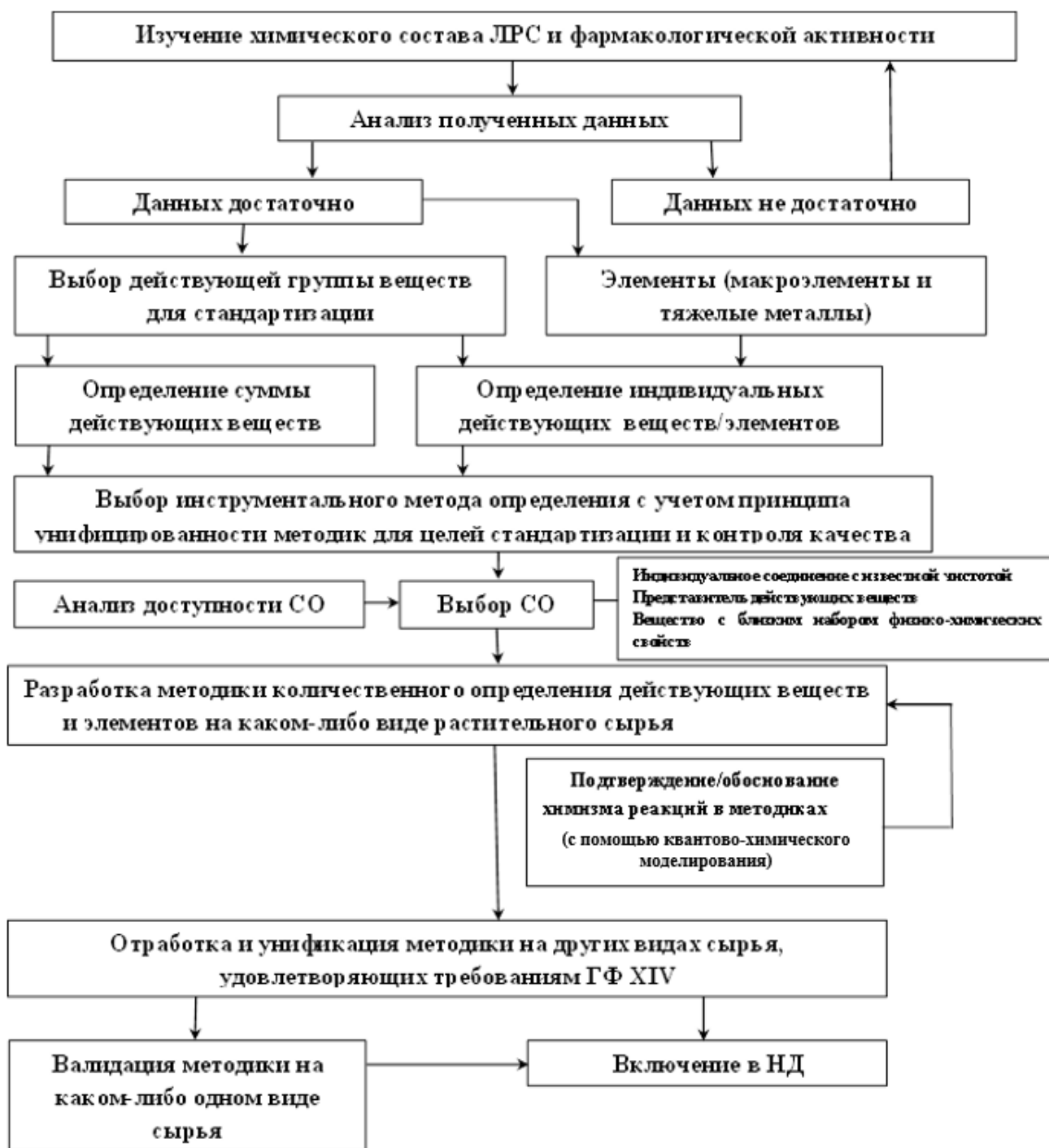


Рисунок 135 – Последовательность действий при разработке унифицированных методик анализа для целей стандартизации и контроля качества ЛРС

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

1. Проведено обобщение полученных в работе данных и предложен общий алгоритм разработки методик количественного определения действующих веществ и элементов в ЛРС с использованием современных инструментальных методов: АЭС-ИСП, ЭТААС, ионометрия, УФ/ВИД-спектрофотометрия,

ВЭЖХ/МС/УФ на основе принципа унифицированности, позволяющей определять одни и те же компоненты в растительном сырье различных морфологических групп.

2. На основании проведенных в работе исследований представлены рекомендации по использованию квантово-химических методов для целей разработки аналитических методик определения действующих веществ в ЛРС и лекарственных средств на его основе.

3. Исходя из полученных настоящей работе результатов, даны рекомендации по использованию разработанных методик в лабораториях, специализирующихся в области контроля качества и стандартизации субстанций природного происхождения и лекарственных средств на их основе.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ литературных данных по методам и методикам определения эссенциальных элементов, тяжелых металлов (кадмия, свинца, мышьяка), действующих веществ в сырье: арбутина, сахаров, антоцианов. Показано, что основным инструментальным фармакопейным методом анализа лекарственного растительного сырья является спектрофотометрия в силу коммерческой доступности, а также необходимостью определять сумму действующих веществ. Согласно ГФ XIV ВЭЖХ/УФ используется для количественного определения биологически активных веществ только в 7 видах сырья. Определение арбутина и суммы антоцианов в ЛРС ведется спектрофотометрическим методом. ОФС в ГФ РФ предусмотрены только для определения суммы дубильных веществ и содержания эфирного масла. При определении тяжелых металлов и мышьяка методом ЭТААС условия пробоподготовки и определения, рекомендуемые в ГФ XIV, не являются оптимальными, так как не учитывают физико-химических свойств элементов. Определение йодидов в слоевищах ламинарии и кремния в траве хвоща не предусмотрено.

2. Подобраны и детализированы условия пробоподготовки, АЭС-ИСП-определения эссенциальных элементов и ЭТААС-определения наиболее проблемных тяжелых металлов: кадмия, свинца и мышьяка с учетом их физико-химических свойств. Выбраны условия определения эссенциальных элементов методом АЭС-ИСП и тяжелых металлов (кадмия, свинца, мышьяка) методом ЭТААС, которые (в отличие от методик, изложенных в ГФ XIV) являются более удобными, унифицированными, и при этом позволяющими обеспечивать удовлетворительные метрологические характеристики результатов анализа. Унифицированность разработанной методики продемонстрирована анализом более 30 образцов ЛРС. Относительная погрешность методики определения элементов методом АЭС-ИСП не превышает 3,0 %; относительная погрешность методики определения кадмия, свинца, мышьяка методом ЭТААС – не превышает

7,0 %. Подтверждены значения норм, установленных ГФ XIV. Подготовлен проект ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье» для ГФ РФ.

3. Разработана и валидирована методика определения кремния в траве хвоща полевого спектрофотометрическим методом. Методика заключается в сплавлении травы хвоща полевого с смесью натрия карбоната безводного и обезвоженного натрия тетрабората с последующим переводом плава в раствор. Относительная погрешность методики определения кремния в пересчете на SiO_2 составляет 1,59 %. Установлена норма содержания кремния в пересчете на диоксид кремния – не менее 3,0 %.

4. Подобраны условия, разработана и валидирована ионометрическая методика определения йодидов в слоевищах ламинарии с относительной погрешностью 7,14 %. Предложен способ определения органической и неорганической (йодиды) форм йода. Представлен способ полуколичественного определения нитратов и бромидов ионометрическим методом. По результатам анализа более 30 образцов установлено значительное содержание нитратов (от 4,86 мг/г для травы золототысячника до 101,0 мг/г для травы Melissa лекарственной), превышающие нормы, установленные в пищевой промышленности для листовых овощей (нормы для ЛРС отсутствуют). При этом необходимо учитывать, что пищевые нормы разработаны для свежего сырья с учетом ежедневного потребления зелени, значительно превышающее терапевтические дозы готовых лекарственных форм, получаемых из ЛРС.

5. Оптимизированы условия пробоподготовки, разработана и валидирована унифицированная спектрофотометрическая методика определения суммы восстанавливающих сахаров на основе реакции с фенолом (метод Дюбуа). Анализ полученных результатов позволил установить, что для двух видов сырья, где проводится определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом (листья мать-и-мачехи обыкновенной и цветки липы), нормы, рекомендованные ГФ XIV, могут быть сохранены. По литературным данным, содержание восстанавливающих сахаров в цветках липы, определенное

спектрофотометрическим методом с пикриновой кислотой, согласуется с данными, полученными в настоящей работе, но отличается от нормы, указанной в ГФ XIV. Унифицированность методики подтверждена анализом 8 видов ЛРС. Для получения более точных результатов было рекомендовано использование двух типов СО: глюкоза (для сырья, содержащего сахара, молекулы которых в растворе находятся преимущественно в форме пираноз) и фруктоза (для сырья, содержащего сахара, молекулы которых в растворе находятся преимущественно в форме фураноз). Относительная погрешность методики количественного определения суммы сахаров и полисахаридов не превышает 5 %. На основе квантово-химических методов предложена схема превращений, приводящих к развитию аналитического сигнала. Подготовлен проект ОФС «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом» для ГФ РФ. Для определения полисахаридов гравиметрическим методом предложена пробоподготовка, которая в отличие процедур в ГФ XIV позволяет посредством сорбционной очистки от матричных компонентов получать достаточно чистые гравиметрические формы. Подобранная пробоподготовка включает использование смеси ацетона и муравьиной кислоты, позволившей улучшить осаждение полисахаридов из извлечений; отделение осадка от маточного раствора с помощью центрифуг. Разработанные процедуры обеспечивают результаты определения полисахаридов с относительной погрешностью не более 6,0 %.

6. Предложены условия, разработана методика определения глюкозамина сульфата в геле для наружного применения методом ВЭЖХ/МС, проведена валидация. Относительная погрешность составляет не более 5,0 %. На основе квантово-химических данных объяснен процесс масс-фрагментации, лежащий в основе выбранных условий определения.

7. Подобраны условия и разработана методика количественного определения арбутина в ЛРС методом ВЭЖХ/УФ/МС, проведена ее валидация. Относительная погрешность составляет 1,44 %. Проведен анализ 3 видов фармакопейного лекарственного растительного сырья и 3 нефармакопейных видов. Полученные результаты для фармакопейного ЛРС соответствуют указанным в ГФ XIV нормам,

установленным по результатам определения аналита спектрофотометрическим методом. Наблюдаемая масс-фрагментация при использовании ВЭЖХ/МС метода была объяснена с использованием квантово-химических методов. Подготовлен проект ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения» для ГФ РФ и дополнение к ФС «Бадана толстолистного корневища».

8. Подобраны условия, разработана и валидирована унифицированная ВЭЖХ/УФ-методика количественного определения суммы антоцианов в плодах черники обыкновенной, плодах аронии черноплодной сухих, цветках василька синего. Относительная погрешность составила 3,05 %. Норма содержания суммы антоцианов, установленная для черники обыкновенной спектрофотометрическим методом, соответствует ГФ XIV. Результаты анализа плодов аронии черноплодной сухих, цветков василька синего, полученные с помощью разработанной ВЭЖХ/УФ-методики (в пересчете на цианидин-3-глюкозид), ниже результатов, полученных для тех же образцов по рекомендованным в фармакопее спектрофотометрическим методикам для каждого из анализируемых видов лекарственного растительного сырья. Предлагаемая методика позволяет также получать «антоциановый профиль», что может быть применено при определении основных групп биологически активных веществ одновременно с количественным определением. Подготовлен проект ОФС «Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ» для ГФ РФ.

9. На основании проведенных химико-аналитических и квантово-химических исследований был предложен алгоритм разработки унифицированных методик анализа для целей стандартизации и контроля качества ЛРС с использованием современных инструментальных методов. Представлены рекомендации по рутинному использованию разработанных методик в заводских лабораториях, занимающихся контролем качества субстанций природного происхождения. Подготовлены проекты ОФС для Государственной фармакопеи следующего издания, а именно: ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в

лекарственном растительном сырье», ОФС «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом», ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ», ОФС «Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ», изменение к ФС «Бадана толстолистного корневища».

Практические рекомендации

Результаты, полученные в диссертации, позволяют с меньшими трудозатратами по единому алгоритму разрабатывать унифицированные методики количественного определения элементов/одинаковых действующих веществ в лекарственном растительном сырье различных морфологических групп с учетом современных требований ГФ РФ. Полученные обобщенные данные могут быть использованы в аналогичных исследованиях, а также при изучении сырья, планируемого к введению в медицинскую практику; при составлении нормативной документации на субстанции природного происхождения (раздел «Количественное определение»).

Перспективы дальнейших исследований по данной тематике

Предложенные методики количественного определения действующих веществ в субстанциях природного происхождения с использованием современных инструментальных методов и принципа унификации могут быть включены в практику лабораторий, занимающихся фармакогностическими исследованиями, контролем качества и стандартизацией ЛРС, ГФ РФ. Они также дают основу для разработки методик анализа готовых лекарственных форм, полученных на основе исследованного в данной работе природного сырья. Рекомендуемый в настоящей работе принцип унификации очевидно распространяется и на другие типы субстанций растительного происхождения и содержащихся в них действующих веществ.

Предложенное в данной работе сочетание стадий разработки методики количественного определения с стадией квантово-химического исследования процессов, влияющих на формирование аналитического сигнала, можно

рекомендовать при исследовании других групп биологически активных соединений природного происхождения.

СПИСОК РАБОТ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Никулин А.В. Комбинированная методика определения элементного состава лекарственного растительного сырья / А.В. Никулин, Е.А. Платонов, О.Г. Потанина // Фармация. – 2016. – Т.65, №2. – С.22–25.
2. Никулин А.В. Микроэлементный состав лекарственного растительного сырья, содержащего полисахариды / А.В. Никулин, Е.А. Платонов, О.Г. Потанина // Фармация. – 2017. – Т.66, №2. – С.24–27.
3. Никулин А.В. Элементы, бромиды, нитраты в растительных средствах, содержащих арбутин / А.В. Никулин, О.Г. Потанина, М.В. Окунева, Р.А. Абрамович // Фармация. – 2018. – Т.67, №7. – С.21–26.
4. Никулин А.В. Разработка методики определения суммы антоцианов в плодах черники методом ВЭЖХ/УФ / А.В. Никулин, М.В. Окунева, О.Г. Потанина, С. Лазар, Р.А. Абрамович // Биофармацевтический журнал. – 2020. – Т.12, №5. – С.20–25.
5. Никулин А.В. Определение хлоридов, бромидов, нитратов методом ионометрии в лекарственном растительном сырье / А.В. Никулин, Г.С. Терещенко, О.Г. Потанина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2016. – №1 (11). – С.37–41.
6. Никулин А.В. Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в листьях мать-и-мачехи методом УФ-спектрофотометрии / А.В. Никулин, Г.С. Терещенко, О.Г. Потанина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т.19, №9. – С.3–7.
7. Никулин А.В. Бромиды и нитраты в лекарственном растительном сырье, содержащем полисахариды / А.В. Никулин, М.В. Окунева, О.Г. Потанина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2017. – №1 (15). – С.23–26.
8. Никулин А.В. Определение бромидов и нитратов в субстанциях растительного происхождения, относящихся к различным морфологическим группам / А.В. Никулин, Г.С. Терещенко, О.Г. Потанина, Р.А. Абрамович // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2017. – №4 (18). – С.4–7.

9. Никулин А.В. Изучение стабильности готовой лекарственной формы глюкозамина – геля для наружного применения / А.В. Никулин, Н.Р. Лебедева, О.Г. Потанина // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т.19, №4. – С.128–130.
10. Никулин А.В. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos Uva-ursi (L.) spreng.*) методом ВЭЖХ/МС / А.В. Никулин, М.В. Окунева, С.В. Горяинов, О.Г. Потанина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т.21, №5. – С.3–9.
11. Никулин А.В. Методика определения глюкозамина в геле методом ВЭЖХ/МС / А.В. Никулин, С.В. Горяинов, Н.И. Сеницына, Н.Р. Лебедева, О.Г. Потанина, Р.А. Абрамович // Биофармацевтический журнал. – 2017. – Т.9, №1. – С.41–45.
12. Никулин А.В. Определение суммы восстанавливающих сахаров и водорастворимых полисахаридов в субстанциях растительного происхождения / А.В. Никулин, С.И. Ямщикова, О.Г. Потанина, Р.А. Абрамович // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т.10, №5. – С.50–57.
13. Никулин А.В. Разработка и валидация методики определения арбутина в листьях толокнянки методом ВЭЖХ/УФ / А.В. Никулин, М.В. Окунева, С.В. Горяинов, О.Г. Потанина // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т.53, №8. – С.29–33.
14. Nikulin A.V. Development and validation of a spectrophotometric procedure for determining silicon in common horsetail (*Equisetum arvense L.*) herb / A.V. Nikulin, O.G. Potanina, E.A. Platonov, D.O. Bokov, O.A. Smyslova, R.A. Abramovich // Pharmacognosy Journal. – 2019. – Vol.11, Issue 5. – P.1124–1131.
15. Nikulin A.V. Evaluation of the nomenclature of herbal expectorants on Russian pharmaceutical market: current status and future prospects / S.D. Kakhramanova, D.O. Bokov, T.D. Rendyuk, V. Janulis, M. Sakr, I.A. Samylina, O.G. Potanina, A.V. Nikulin, R.A. Nasser // Systematic Reviews in Pharmacy. – 2020. – Vol.11, Issue 6. – P.196–205.

16. Nikulin A.V. Modern approaches to the analysis of kelp (*Laminaria sp.*) as pharmacopoeial herbal drugs and food products / D.O. Bokov, O.G. Potanina, A.V. Nikulin, V.M. Shchukin, V.A. Orlova, G.B. Bagirova, S.D. Kakhramanova, H. Khafaji, N.P. Balobanova, A.A. Evgrafov, I.A. Samylina, I.I. Krasnyuk (junior), O.A. Golubeva, E.S. Kuleshova // *Pharmacognosy Journal*. – 2020. – Vol.12, Issue 4. – P.929–937.
17. Nikulin A.V. Polysaccharides of crude herbal drugs as a group of biologically active compounds in the field of modern pharmacognosy: physicochemical properties, classification, pharmacopoeial analysis / D.O. Bokov, R.I. Sharipova, O.G. Potanina, A.V. Nikulin, R.A. Nasser, I.A. Samylina, V.V. Chevidaev, S.D. Kakhramanova, D.M. Sokhin, E.S. Klyukina, T.D. Rendyuk, V. Janulis, I.I. Krasnyuk (junior), V.V. Bessonov // *Systematic Reviews in Pharmacy*. – 2020. – Vol.11, Issue 6. – P.206–212.
18. Nikulin A.V. Methodical basis for analysis of monosaccharides profile of the polysaccharide complex in the mixture herbal product (Pectorales species № 2) / V.V. Chevidaev, D.O. Bokov, O.G. Potanina, A.V. Nikulin, R.A. Nasser, I.A. Samylina, D.M. Sokhin, E.V. Sergunova, N.V. Bobkova, T.Yu. Kovaleva, T.D. Rendyuk, V. Janulis, S.L. Morokhina, V.V. Grikh, I.I. Krasnyuk (junior), E.K. Galiakhmetova, DV. Moiseev // *Systematic Reviews in Pharmacy*. – 2020. – Vol.11, Issue 6. – P.213–220.
19. Nikulin A.V. Development and validation of the quantitative determination procedure of iodine in the iodides form in the kelp thallus by the ionometry method / A.V. Nikulin, O.G. Potanina, M.V. Okuneva, R.A. Abramovich, D.O. Bokov, O.A. Smyslova // *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. – 2020. – Vol.12, Issue 3. – P.277–283.
20. Nikulin A.V. Development of a technique for determining cadmium, lead, arsenic with the ETAAS method in medicinal plant raw materials / Nikulin A.V., Potanina O.G., Alyussef M., Vasil'ev V.G., Abramovich R.A., Novikov O.O., Boyko N.N., Khromov A.V., Platonov E.A. // *Farmacia*. – 2021. – Vol. 69, Issue 3. – P.566–575.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

БСА – N,O-бис(триметилсилил)ацетамид

БСТФА – N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид

ВИЛАР – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором

ВЭЖХ/УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором

ДЭА – допустимая ежедневная экспозиция

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МБД – международные базы данных

МВИ – микроволновое излучение

МС-ИСП – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

МЭСП – молекулярно-электростатический потенциал

ОГТ – орбитали гауссова типа

ОСТ – орбитали слейтеровского типа

ПААС – атомно-абсорбционная спектрометрия с пламенной атомизацией

ПИА – проточно-инжекционный анализ

ПО – предел обнаружения

ППХС – проверка пригодности хроматографической системы

ПС – переходное состояние

СО – стандартный образец

СОГТ – сжатые орбитали гауссова типа

ТМС – триметилсилильные производные

ТМХС – триметилхлорсилан

УФ/ВИД-спектр – спектр в ультрафиолетовом и видимом областях спектра

ЭП – электронная плотность

ЭТААС – атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией

Ab initio – неэмпирические квантово-химические методы

AM1 – полуэмпирический квантово-химический метод AM1

BP – британская фармакопея

CNDO – метод полного пренебрежения дифференциальным перекрыванием

DFT – методы функционала плотности

EP – европейская фармакопея

JP – японская фармакопея

MNDO – метод модифицированного пренебрежения двухатомным перекрыванием

PM3 - полуэмпирический квантово-химический метод PM3

USP – американская фармакопея

TIC – кривая полного ионного тока

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.Ю., Содержание полисахаридов в наземной части *Saussurea Controversa* DC / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов // Химия растительного сырья. – 2015. – № 3. – С.43–48.
2. Авцын, А.П. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчка. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
3. Бабичева, О.И. Технохимический контроль овощесушильного и пищевконцентратного производства / О.И. Бабичева, Г.А. Иванова, С.М. Немец. – М.: Пищевая промышленность, 1967. – 294 с.
4. Гельман, Е.М. Фотометрические методы определения порообразующих элементов в рудах, горных породах и минералах / Е.М. Гельман, И.З. Старобина. – М.: ГЕОХИ АН СССР, 1976. – 69 с.
5. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. II. – Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2007. – С.330.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. II. – Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2007. – С.446–447.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.6181–6187.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.5960–5964.
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. I. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.276–288.
10. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.6539–6548.
11. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. II. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.2370–2382.

12. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.6181–6187.
13. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.5188–6996.
14. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. I. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.845–872.
15. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.5933–5942.
16. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.6485–6493.
17. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.5864–5868.
18. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. IV. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С.6599–6605.
19. Государственная Фармакопея СССР XI издания. Выпуск 2. – М.: Медицина, 1990. – С.275–279.
20. Гравель, И.В. Региональные проблемы экологической оценки лекарственного сырья и фитопрепаратов на примере Алтайского края: дис. ... докт. фарм. наук: 15.00.02 / Гравель Ирина Валерьевна. – М., 2009. 363 с.
21. Даниэлс, Ф. Физическая химия / Ф. Даниэлс, Р. Олберти. – М.: Мир, 1978. – 646 с.
22. Дейнека, Л.А. ВЭЖХ антоцианов с амперометрическим детектором: оценка антиоксидантной активности / Л.А. Дейнека, С.Л. Макаревич, В.И. Дейнека, А.Н. Чулков // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т.70. – С.870–876.

23. Дроздова, И.Л. Исследование растительных источников полисахаридов и фенольных соединений и перспективы их практического использования в фармации: дис. ... докт. фарм. наук: 15.00.02 / Дроздова Ирина Леонидовна. – Пятигорск, 2009. 389 с.

24. Дьякова, Н.А. Разработка и валидация экспрессной методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.) / Н.А. Дьякова, И.А. Самылина, А.И. Сливкин, С.П. Гапонов, А.А. Мындра // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49 (№4) – С.35–38.

25. Евстигнеев, Э.И. Определение полисахаридов в растительном сырье и препаратах лигнина / Э.И. Евстигнеев // Химия растительного сырья. – 2016. – №2. – С.5–11.

26. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому контролю. Глава 2. Раздел 1. Требования пищевой безопасности и пищевой ценности пищевой продукции [в ред. Решений Комиссии таможенного союза от 17.08.2010 №341, от 18.11.2010 №456]. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – С.93–94.

27. Елохин, В.А. Масс-спектрометрия с ионизацией в индуктивно связанной плазме: основы метода и области применения / В.А. Елохин, С.М. Чернецкий, Д.Я. Чопоров // Журнал аналитической химии. – 1991. – Т.46. – С.1669–1674.

28. Кириченко, Е.Е. Выделение, физико-химическое исследование и определение солюбилизующей активности полисахаридов цветков пижмы обыкновенной / Е.Е. Кириченко, И.А. Сычев, Г.Ю. Чекулаева // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2012. – №4. – С.146–150.

29. Киселева, М.С. Микроволновая подготовка природных объектов с использованием новых технических решений / М.С. Киселева, О.А. Тютюнник,

А.В. Никулин, И.В. Кубракова // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2014. – Т.80. – С.7–11.

30. Кларк, Т. Компьютерная химия / Т. Кларк. – М.: Мир, 1990 – 384 с.
31. Клемпер, А.В. Изучение содержания неорганических экотоксикантов в некоторых видах лекарственного растительного сырья из Северо-Запада Российской Федерации: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Клемпер Алексей Владимирович. – С.-Петербург, 2013. 141 с.
32. Колесников, М.П. Формы кремния в растениях / М.П. Колесников // Успехи биологической химии. – 2001. – Т.41. – С.301–332.
33. Коломиец, Н.Э. Определение кремния в хвощах / Н.Э. Коломиец, Г.И. Калинин // Фармация. – 2009. – №3. – С.13–15.
34. Коренман, И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И.М. Коренман. – М.: Химия, 1975. – 358 с.
35. Корж, А.П. Исследование структуры полисахаридов мать-и-мачехи обыкновенной и разработка параметров их стандартизации: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Корж Анна Петровна. – Самара., 2012. 158 с.
36. Кубракова, И.В. Микроволновое излучение в аналитической химии: возможности и перспективы / И.В. Кубракова // Успехи химии. – 2002. – Т.71. – С. 327–334.
37. Курдюков, Е.Е. Фармакогностическое исследование семян льна и листьев стевии как компонентов растительного сбора «Стелинол»: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Курдюков Евгений Евгеньевич. – Пенза., 2019. 177 с.
38. Куркин, В.А. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // Химия растительного сырья. – 2015. – № 1. – С.95–100.
39. Куркин, В.А. Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т.51. – С.34–37.
40. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – М.: Техносфера, 2015. – 704 с.

41. Лидин, Р.А. Химические свойства неорганических веществ / Р.А. Лидин, В.А. Молочко, Л.Л. Андреева. – М.: Химия, 2000. – 480 с.
42. Лубсандоржиева, П.Б. Хроматоспектрофотометрическое определение арбутина в листьях *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. / П.Б. Лубсандоржиева, Б.С. Жигжитов, Т.Д. Даргаева, Ж.Г. Базарова, Л.А. Нагаслаева // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – Т.34. – С.38–41.
43. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2005. – 1200 с.
44. Мигдли, Д., Торренс К. Потенциометрический анализ воды / Д. Мигдли, К. Торренс. – М.: Мир, 1980. – 519 с.
45. Моисеев, Д.В. Экспериментально-теоретическое обоснование условий переработки, хранения и определения сроков годности лекарственного растительного сырья: дис. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Моисеев Дмитрий Владимирович. – Витебск., 2017. 421 с.
46. Морф, Е. Принципы работы ионоселективных электродов и мембранный транспорт / Е. Морф. – М.: Мир, 1985. – 280 с.
47. Москалев, Ю.И. Минеральный обмен / Ю.И. Москалев. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.
48. Мышляева, Л.В. Аналитическая химия кремния / Л.В. Мышляева, В.В. Краснощеков. – М.: Наука, 1972. – 207 с.
49. Назаренко, М.Н. Совершенствование технологий получения инулина и фруктозо-глюкозного сиропа из топинамбура и их применение в производстве функциональных молочных продуктов: дис. ... канд. тех. наук: 05.18.01 / Назаренко Максим Николаевич. – Краснодар., 2014. 171 с.
50. Нестерова, Н.В. Определение арбутина в лекарственном растительном сырье / Н.В. Нестерова, И.А. Самылина // Фармация. – 2018. – Т.67(№3). – С.21–25.
51. Никольский, Б.П. Ионоселективные электроды / Б.П. Никольский, Е.А. Матерова. – Ленинград: Химия, 1980. – 240 с.

52. Никулин, А.В. Бромиды и нитраты в лекарственном растительном сырье, содержащем полисахариды / А.В. Никулин, М.В. Окунева, О.Г. Потанина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2017. – №1. – С.23–26.
53. Никулин, А.В. Комбинированная методика определения элементного состава лекарственного растительного сырья / А.В. Никулин, Е.А. Платонов, О.Г. Потанина // Фармация. – 2016. – Т.65. – С.22–25.
54. Никулин, А.В. Комбинированные методы определения платины, палладия и золота с использованием новых сорбционных материалов: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Никулин Александр Владимирович. – М., 2013, 144 с.
55. Никулин, А.В. Методика определения глюкозамина в геле методом ВЭЖХ/МС / А.В. Никулин, С.В. Горяинов, Н.И. Сеницына, Н.Р. Лебедева, О.Г. Потанина, Р.А. Абрамович // Биофармацевтический журнал. – 2017. – Т.9. – С.41–45.
56. Никулин, А.В. Микроэлементный состав лекарственного растительного сырья, содержащего полисахариды / А.В. Никулин, Е.А. Платонов, О.Г. Потанина // Фармация. – 2017. – Т.66. – С.24–27.
57. Никулин, А.В. Определение бромидов и нитратов в субстанциях растительного происхождения, относящихся к различным морфологическим группам / А.В. Никулин, Г.С. Терещенко, О.Г. Потанина, Р.А. Абрамович // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2017. – №4. – С.4–7.
58. Никулин, А.В. Определение суммы восстанавливающих сахаров и водорастворимых полисахаридов в субстанциях растительного происхождения / А.В. Никулин, С.И. Ямщикова, О.Г. Потанина, Р.А. Абрамович // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т.10. – С.50–57.
59. Никулин, А.В. Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в листьях мать-и-мачехи методом УФ-спектрофотометрии / А.В. Никулин, Г.С. Терещенко, О.Г. Потанина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т.19. – С.3–7.
60. Никулин, А.В. Определение хлоридов, бромидов, нитратов методом ионометрии в лекарственном растительном сырье / А.В. Никулин, Г.С. Терещенко,

О.Г. Потанина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2016. – №1(11). – С.37–41.

61. Никулин, А.В. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в листьях толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos Uva-ursi* (L.) spreng.) методом ВЭЖХ/МС / А.В. Никулин, М.В. Окунева, С.В. Горяинов, О.Г. Потанина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т.21(№5). – С.3–9.

62. Никулин, А.В. Разработка и валидация методики определения арбутина в листьях толокнянки методом ВЭЖХ/УФ / А.В. Никулин, М.В. Окунева, С.В. Горяинов, О.Г. Потанина // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т.53(№8). – С.60–64.

63. Никулин, А.В. Разработка методики определения суммы антоцианов в плодах черники методом ВЭЖХ/УФ / А.В. Никулин, М.В. Окунева, О.Г. Потанина, С. Лазар, Р.А. Абрамович // Биофармацевтический журнал. – 2020. – Т.12(№5). – С.40–45.

64. Никулин, А.В. Элементы, бромиды, нитраты в растительных средствах, содержащих арбутин / А.В. Никулин, О.Г. Потанина, М.В. Окунева, Р.А. Абрамович // Фармация. – 2018. – Т.67(№7). – С.21–26.

65. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 816 с.

66. Оленников, Д.Н. Исследование колориметрической реакции фруктозы с резорцином в зависимости от условий ее проведения / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2008. – № 2. – С.69–74.

67. Оленников, Д.Н. Полисахариды. Современное состояние изученности: экспериментально-наукометрическое исследование / Д.Н. Оленников, Н.И. Кащенко // Химия растительного сырья. – 2014. – №1. – С.5–26.

68. Оленников, Д.Н. Структурно-функциональное исследование биополимеров растительного и грибного происхождения и совершенствование методов их анализа: дис. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Оленников Даниил Николаевич. – Улан-Удэ., 2012. 302 с.

69. Пат. RU 2480746 С1, Рос. Федерация, G01N 33/15 (2006.01). Способ количественного определения полисахаридов в траве видов рода фиалки / А.М. Мартынов, Т.Д. Даргаева; заявитель и патентообладатель ГБОУ высшего образования «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования». 2011145407/15, заявл. 08.11.2011; опубл. 27.04.2013.
70. Пат. RU 2510846 С2, Рос. Федерация, С12Q 1/06 (2006.01), G01N 30/34 (2006.01), С12R 1/19 (2006.01). Способ определения гексоз в супрамолекулярных структурах клеток *Escherichia coli* / Э.А. Иванова, Г.Х. Вафина, Т.С. Тропынина; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт биологии Уфимского научного центра РАН (ИБ УНЦ РАН). 2012119645/10, заявл. 12.05.2012; опубл. 10.04.2014.
71. Пентин, Ю.А. Физические методы исследования в химии / Ю.А. Пентин, Л.В. Вилков. – М.: Мир, 2003. – 684 с.
72. Перова, И.Б. Исследование содержания и специфического профиля антоцианинов лекарственного растительного сырья: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Перова Ирина Борисовна. – М., 2015. 171 с.
73. Попов, Д.М. Сравнительное качественное и количественное определение углеводов в цветках и листьях липы сердцевидной / Д.М. Попов, Н.В. Зарубина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №2. – С.50–53.
74. Пупышев, А.А. Атомно-абсорбционный спектральный анализ / А.А. Пупышев. – М.: Техносфера, 2009. – 782 с.
75. Пупышев, А.А. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Образование ионов / А.А. Пупышев, В.Т. Суриков. – Екатеринбург: ИХТТ УрО РАН, 2006. – 273 с.
76. Ровкина, К.И. Водорастворимые полисахариды травы люцерны посевной *Medicago Sativa* (Fabaceae) флоры Красноярского края / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов // Химия растительного сырья. – 2017. – №2. – С.57–64.

77. Самылина, И.А. Определение сахаров спектрофотометрическими методами / И.А. Самылина, И.П. Рудакова, Ж.И. Аладышева, С.В. Ковалева // Фармация. – 2009. – №4. – С.3–5.
78. Седых, Э.М. Атомизация соединений серебра, свинца, кобальта, никеля и теллура в процессе электротермического атомно-абсорбционного анализа проб сложного состава: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Седых Эвелина Максимовна. – М., 1980. 155 с.
79. Скалозубова, Т.А. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Фармация. – 2012. – №2. – С.5–7.
80. Сычев, И.А. Биологическая активность растительных полисахаридов / И.А. Сычев, О.В. Калинин, Е.А. Лаксаева // Российский медико-биологический вестник им. Академика И. П. Павлова. – 2009. – Т.17. – №4. – С.143–148.
81. Тращенко, Д.А. Содержание полисахаридов в сборе анксиолитического действия и его компонентах / Д.А. Тращенко, Т.Ю. Ковалева, И.А. Самылина // Фармация. – 2018. – №67. – С.15–18.
82. Тринеева, О.В. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – №1. – С.164–169.
83. Тринеева, О.В. Разработка и валидация методики определения суммы свободных и связанных простых сахаров в плодах облепихи крушиновидной / О.В. Тринеева, М.А. Казьмина, А.И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №1. – С.138–143.
84. Федосеева, Л.М. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* L.), произрастающего на Алтае / Л.М. Федосеева // Химия растительного сырья. – 2003. – №1. – С.73–77.
85. Agatemor, C. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review / C. Agatemor, D. Beauchemin // Anal. Chim. Acta. – 2011. – V.706. – P.66–83.

86. Alexander, P.W. Potentiometric flow-injection determination of sugars using a metallic copper electrode / P.W. Alexander, P.R. Haddad, M. Trojanowicz // *Analytical letters*. – 1985. – V.18. – P.1953–1978.
87. Alves, E.R. Spectrophotometric flow-injection determination of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation / E.R. Alves, P.R. Fortes, E.P. Borges, E.A.G. Zagatto // *Anal. Chim. Acta*. – 2016. – V.564. – P.231–235.
88. Amarowicz, R. // Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies / R. Amarowicz, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J.A. Weil // *Food Chem*. – 2004. – V.84. – P.551–562.
89. Anthocyanins by HPLC. International federation of fruit juice producers, 1998. №71. – P.1–26.
90. Araujo-Andrade, C. Conformational study of arbutin by quantum chemical calculations and multivariate analysis / C. Araujo-Andrade, S. Lopes, R. Fausto, A. Gómez-Zavaglia // *Journal of molecular structure*. – 2010. – V.975. – P.100–109.
91. Arpadjan, S. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fraction / S. Arpadjan, G. Çelik, S. Taşkesen, Ş. Güçer // *Food and chemical toxicology*. – 2008. – V.46. P.2871–2875.
92. Asghari, F. Acid-catalyzed production of 5-hydroxymethylfurfural from D-fructose in subcritical water / F. Asghari, H. Yoshida // *Industrial and engineering chemistry research*. – 2006. – V.45. – P.2163–2173.
93. Assaf, M. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*, quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone / M. Assaf, A. Ali, M. Makboul, J. Beck, R. Anton // *Planta medica*. – 1987. – V.53. – P.343–345.
94. Babu Shet, V. Optimization of reducing sugars production from agro-residue coconut leaflets using autoclave-assisted HCl hydrolysis with response surface methodology / V. Babu Shet, C. Varun, A. Uday, A. Madu Palan, S.U. Rao, L. Concepta Goveas, S. Raja, C. Vaman Rao, U. Puttur // *Agriculture and natural resources*. – 2018. – V.52. – P.280–284.

95. Bacon, J.R. Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis / J.R. Bacon, O.T. Butler, W.R.L. Cairns, J.M. Cook, C.M. Davidson, O. Cavoura, R. Mertz-Kraus // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2020. – V.35. – P.9–53.
96. Barsoom, B.N. Indirect spectrophotometric determination of arbutin, whitening agent through oxidation by periodate and complexation with ferric chloride / B.N. Barsoom, A.M. Abdelsamad, N.M. Adib // *Spectrochim. Acta.* – 2006. – V.64. – P.844–852.
97. Bebeshko, G.I. Use of purbe diagrams in prediction of optimum conditions of separation and determination of halogens in natural objects using ionometry / G.I. Bebeshko // *Inorganic materials.* – 2009. – V.45. – P.1548–1554.
98. Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior / A.D. Becke // *Phys. Rev. A.* – 1988. – V.38. – P.3098–3100.
99. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange / A.D. Becke // *J. Chem. Phys.* – 1993. – V.98. – P.5648–5652.
100. Bentz, E.N. Structure and electronic properties of (+)-catechin: aqueous solvent effects / E.N. Bentz, A.B. Pomilio, R.M. Lobayan // *J. Mol. Model.* – 2014. – V.20. – P.1–3.
101. Bermejo-Barrera, P. Atomic absorption spectrometry as an alternate technique for iodine determination (1968-1998) / P. Bermejo-Barrera, M. Aboal-Somoza, A. Bermejo-Barrera // *J. Anal. At. Spectrom.* – 1999. – V.14. – P.1009–1018.
102. Bermejo-Barrera, P. Indirect atomic absorption spectrometry (IAAS) as a tool for the determination of iodide in infant formulas by precipitation of AgI and redissolution with cyanide / P. Bermejo-Barrera, L.M. Fernandez-Sanchez, M. Aboal-Somoza, R.M. Anllo-Sedin, A. Bermejo-Barrera // *Microchem. J.* – 2001. – V.69. – P.205–211.
103. Bermejo-Barrera, P. Microwave-assisted distillation of iodine for the indirect atomic absorption spectrometric determination of iodine in milk samples / P.

Bermejo-Barrera, M. Aboal-Somoza, A. Bermejo-Barrera, M.L. Cervera, M. de la Guardia // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2001. – V.16. – P.382–389.

104. Bernal, F.A. Exploitation of the complexation reaction of ortho-dihydroxylated anthocyanins with aluminum(III) for their quantitative spectrophotometric determination in edible sources / F.A. Bernal, L.L. Orduz-Diaz, E. Coy-Barrera // *Food Chemistry.* – 2015. – V.185. – P.84–89.

105. Bestaoui-Berrekchi-Berrahma, N. Density functional conformational study of 2-O-sulfated 3,6 anhydro- α -D-galactose and of neo-k- and ι -carrabiose molecules in gas phase and water / N. Bestaoui-Berrekchi-Berrahma, P. Derreumaux, M. Sekkal-Rahal, M. Springborg, A. Sayede, N. Yousfi, A.-Ed-D. Kadoun // *J. Mol. Model.* – 2013. – V.19. – P.893–904.

106. Bestaoui-Berrekchi-Berrahma, N. MP2 and DFT studies of β -D-neocarrabiose and β -D-neocarrabiose monohydrate / N. Bestaoui-Berrekchi-Berrahma, M. Sekkal-Rahal, P. Derreumaux, N. Yousfi // *Computational and theoretical chemistry.* – 2016. – V.1091. – P.24–30.

107. Bicker, M. Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub- and supercritical acetone / M. Bicker, J. Hirth, H. Vogel // *Green chemistry.* – 2003. – V.5. – P.280–284.

108. Bizzi, C.A. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques / C.A. Bizzi, M.F. Pedrotti, J.S. Silva, J.S. Barin, J.V. Nóbrega, E.M.M. Flores // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2017. V.32. – P.1–57.

109. Bolshov, M.A. Flow methods for the determination of elements in solutions based on sorption preconcentration and inductively coupled plasma mass spectrometry / M.A. Bolshov, V.K. Karandashev, G.I. Tsinin, Yu.A. Zolotov // *Journal of analytical chemistry.* – 2011. – V.66. – P.548–565.

110. Borel, E. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,5-Dinitrosalicysäure und Phenol / E. Borel, F. Hostettler, H. Deuel // *Helv. Chim. Acta.* – 1952. – V.35. – P. 115–120.

111. Boros, B. Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin, and gallic acid in leaves of different bergenia species / B. Boros, S. Jakabová, T. Madarász, R. Molnár, B. Galambosi, F. Kilar, A. Felinger, Á. Farkas // *Chromatographia*. – 2014. – V.77. – P.1129–1135.
112. Bozhanov, S. Determination of trace elements in the lavenderin florescence (lavandula angustifolia Mill.) – Lavender oil system / S. Bozhanov, I. Karadjova, S. Alexandrow // *Microchemical journal*. – 2007. – V.86. – P.119–123.
113. British Pharmacopoeia. V. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. Fresh bilberry fruit dry extract, refined and standardized. – London: Crown Copyright, 2008. – P.1–5.
114. British Pharmacopoeia. V. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. Kelp. – London: Crown Copyright, 2008. – P.1–2.
115. British Pharmacopoeia. V. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. TSO. – London: Crown Copyright, 2008. – P.6762–6764.
116. Brito, A. Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some chilean edible berry extracts / A. Brito, C. Areche, B. Sepúlveda, E.J. Kennelly, M.J. Simirgiotis // *Molecules*. – 2014. – V.19. – P.10936–10955.
117. Buck, R.P. Electroanalytical chemistry of membranes / R.P. Buck, S. Ciani // *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* – 1975. – V.5. – P.323–420.
118. Bulduk, I. Arbutin analysis in leaves, fruit and branches of *Pyrus anatolica*, method optimization / I. Bulduk, M.D. Şahin, S. Şanlı // *Eurasian J. Anal. Chem.* – 2016. – V.11. – P.233–244.
119. Bunca, A. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells / A. Bunca, D. Rugină, Z. Sconta, R.M. Pop, A. Pinteă, C. Socaciu, F. Tăbăran, C. Grootaert, K. Struijs, J. VanCamp // *Phytochemistry*. – 2013. – V.95. – P.436–444.

120. Butler, O.T. 2013 Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis / O.T. Butler, W.R.L. Cairns, J.M. Cook, C.M. Davidson // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2014. – V.29. – P.17–50.
121. Cal-Prieto, M.J. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000 / M.J. Cal-Prieto, M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J.M. Andrade, P. López-Mahía, S. Muniategui, D. Prada // *Talanta.* – 2002. – V.56. – P.1–51.
122. Castañeda-Ovando, A. Chemical studies of anthocyanins: a review / A. Castañeda-Ovando, Ma. de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma.E. Páez-Hernández, J.A. Rodríguez, C.A. Galán-Vidal // *Food chemistry.* – 2009. – V.113. – P.859–871.
123. Chakraborty, R. Literature study of microwave-assisted digestion using electrothermal atomic absorption spectrometry / R. Chakraborty, A.K. Das, M.L. Cervera, M. de la Guardia // *Fresenius journal of analytical chemistry.* – 1996. – V.355. – P.99–111.
124. Chen, Z. Flow-injection potentiometric detection of metal ions based on tungsten oxide electrode / Z. Chen, P.W. Alexander // *Electroanalysis.* – 1997. – V.9. – P.141–144.
125. Cheng, L. Preparation, structural characterization and bioactivities of Se-containing polysaccharide: A review / L. Cheng, Y. Wang, X. He, X. Wei // *International journal of biological macromolecules. Part A.* – 2018. – V.120. – P.82–92.
126. Cooke, C.L. Method for profiling mucin oligo saccharides from gastric biopsies of rhesus monkey with and without *Helicobacter pylori* infection / C.L. Cooke, H.J. An, J. Kim, J.V. Solnick, C.B. Lebrilla // *Analytical Chemistry.* – 2007. – V.79. – P.8090–8097.
127. Crecente-Campo, J. Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria ananassa* Duch, cv Selva) / J. Crecente-Campo, M. Nunes-Damaceno, M.A. Romero-Rodríguez, M.L. Vázquez-Odériz // *J. Food Compos. Anal.* – 2012. – V.28. – P.23–30.
128. Currie, H.A. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies / Currie H.A., Perry C.C. // *Ann. Bot.* 2007. – V.100. – P.1383–1389.

129. da Silva, H.R. Obtaining and characterization of anthocyanins from *Euterpe oleracea* (açai) dry extract for nutraceutical and food preparations / H.R. da Silva, D. da Cruz de Assis, A.L. Prada, J.O.C.S. Junior, M.B. de Sousa, A.M. Ferreira, J.R.R. Amado, H. de Oliveira Carvalho, A.V.T. de Lima Teixeira dos Santos, J.C.T. Carvalho // *Revista brasileira de farmacognosia*. – 2019. – V.29. – P.677–685.
130. Davey, D.E. Effect of membrane composition on the flow-injection response of an ion-selective electrode: a comparative study based on selectivity coefficients calculated using a data linearization technique / D.E. Davey, D.E. Mulcahy, G.R. O'Connell // *Electroanalysis*. – 1996. – V.8. – P.274–279.
131. Davey, D.E. Potentiometric flow-injection determination of iodide and iodine / D.E. Davey, D.E. Mulcahy, G.R. O'Connell // *Talanta*. – 1990. – V.37. – P.313–316.
132. de Souza, M.F. Neutral sugars determination in *Chlorella*: use of a one-step dilute sulfuric acid hydrolysis with reduced sample size followed by HPAEC analysis / M.F. de Souza, D.S. Pereira, S.P. Freitas, E.P. da Silva Bon, M.A. Rodrigues // *Algal research*. – 2017. – V.24. – P.130–137.
133. de Villiers, A. High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine anthocyanins / A. de Villiers, D. Cabooter, F. Lynen, G. Desmet, P. Sandra // *J. Chromatogr. A*. – 2011. – V.1218. – P.4660–4670.
134. Del Carpio Jiménez, C. Characterisation and preliminary bioactivity determination of *Berberis boliviana* Lechler fruit anthocyanins / C. Del Carpio Jiménez, C.S. Flores, J. He, Q. Tian, S.J. Schwartz, M.M. Giusti // *Food Chemistry*. – 2011. – V.128. – P.717–724.
135. Delange, F. Iodine deficiency in Europe and its consequences: an update / F. Delange // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2002. – V.29(Suppl. 2). – P.S404–S416.
136. Dewar, M.J.S. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model / M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart // *J. Am. Chem. Soc.* – 1985. – V.107. – P.3902–3909.

137. Dewar, M.J.S. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters / M.J.S. Dewar, W. Thiel // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – V.99. – P.4899–4907.
138. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith // *Analytical Chemistry*. – 1956. – V.28. – P.350–357.
139. Durak, B.Y. Accurate and sensitive reverse phase high-performance liquid chromatographic determination of arbutin in blueberries and characterization of its stability in simulated gastric fluid and under ultraviolet irradiation / B.Y. Durak, S. Sel, S. Bakirdere // *Analyt. Lett.* – 2020. – V.53. – P.1504–1511.
140. Dwek, R.A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars / R.A. Dwek // *Chemical Reviews*. – 1996. – V.96. – P.683–720.
141. Dyke, J.V. Trace iodine quantitation in biological samples by mass spectrometric methods: the optimum internal standard / J.V. Dyke, P.K. Dasgupta, A.B. Kirk // *Talanta*. – 2009. – V.79. – P.235–242.
142. Escarpa, A. Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars / A. Escarpa, M.C. González // *Chromatographia*. – 2000. – V.51. – P.37–43.
143. European Medicines Agency. Assessment report on *Arctostaphylosuva-ursi* (L.) Spreng., folium. – London: An agency of the European Union, 2017. 46P.
144. European Pharmacopoeia 8th Ed. 2.8.4. Swelling index. – Strasbourg: EDQM, 2013. – P.271.
145. European pharmacopoeia 8th Ed. Bearberry leaf. – Strasbourg: EDQM, 2013. – P.1162–1163.
146. European Pharmacopoeia 8th Ed. Bilberry fruit, fresh. – Strasbourg: EDQM, 2013. – P.1173.
147. European Pharmacopoeia 8th Ed. Kelp. 2008. – Strasbourg: EDQM, 2013. – P.1286–1287.
148. Faccin-Galhardi, L.C. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus / L.C. Faccin-Galhardi, K.A. Yamamoto, S. Ray, B. Ray,

R.E. Carvalho Linhares, C. Nozawa // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2012. – V.142. – P.86–90.

149. Fan, S. Antitumor effects of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells / S. Fan, J. Zhang, W. Nie, W. Zhou, L. Jin, X. Chen, J. Lu // *Food and Chemical Toxicology*. – 2017. – V.102. – P.53–62.

150. Feng, X. Microwave digestion of plant and grain standard reference materials in nitric and hydrofluoric acids for multi-elemental determination by inductively coupled plasma mass-spectrometry / X. Feng, S. Wu, A. Wharmby, A. Wittmeier // *J. Anal. At. Spectrom.* – 1999. – V.14. – P.939–946.

151. Filipiak-Szok, A. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements / A. Filipiak-Szok, M. Kurzawa, E. Szłyk // *Journal of trace elements in medicine and biology*. – 2015. – V.30. – P.54–58.

152. Filipiak-Szok, A. Elemental analysis of medicinal herbs and dietary supplements / A. Filipiak-Szok, M. Kurzawa, M. Cichosz, E. Szłyk // *Analytical Letters*. – 2015. – V.48. – P.2626–2638.

153. Fiorito, S. Selenylated plant polysaccharides: A survey of their chemical and pharmacological properties / S. Fiorito, F. Epifano, F. Preziuso, V.A. Taddeo // *Phytochemistry*. – 2018. – V.153. – P.1–10.

154. Freire, R.O. Sparkle model for the calculation of lanthanide complexes: AM1 parameters for Eu (III), Gd (III), and Tb (III) / R.O. Freire, G.B. Rocha, A.M. Simas // *Inorg. Chem.* – 2005. – V.44. – P.3299–3310.

155. Ganjali, M.R. Novel bromide PVC-based membrane sensor based on iron (III)-salen / M.R. Ganjali, P. Norouzi, M. Golmohammadi, M. Rezapour, M. Salavati-Niasari // *Electroanalysis*. – 2004. – V.16. – P.910–914.

156. Gao, Q.H. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms / Q.H. Gao, X. Fu, R. Zhang, Z. Wang, M. Guo // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – V.106. – P.749–754.

157. Garcia de Arriba, S. Änderungen des Urin-pH-Wertshaben keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von *Uvae ursi folium* / S. Garcia de Arriba, U. Stammwitz, S. Pickartz, V. Goclik, C. Bodinet, K.U. Nolte // *Z. Phytother.* – 2010. – V.31. – P.95–97.

158. Garcia de Arriba, S. Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi folium* herbal preparations / S. Garcia de Arriba, B. Naser, K.U. Nolte // *Int. J. Toxicol.* – 2013. – V.32. – P.442–453.

159. Ghaedi, M. Preparation of iodide selective carbon paste electrode with modified carbon nanotubes by potentiometric method and effect of CuS-NPs on its response / M. Ghaedi, S.Y.S. Jaber, S. Hajati, M. Montazerzohori, M. Zarr, A. Asfaram, L.K. Kumawat, V.K. Gupta // *Electroanalysis.* – 2015. – V.27. – P.1–8.

160. Giusti, M.M., Molar absorptivity and colour characteristics of acylated and non acylated Pelargonidin-based anthocyanins / M.M. Giusti, L.E. Rodriguez-Saona, R.E. Wrolstad // *Journal of agricultural and food chemistry.* – 1999. – V.47. – P.4631–4637.

161. Glöckl, I. Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis / I. Glöckl, G. Blaschke, M. Veit // *Journal of chromatography B.* – 2001. – V.761. – P.261–266.

162. Gomez, M.R. Determination of heavy metals for the quality control in Argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES / M.R. Gomez, S. Cerutti, L.L. Sombra, M.F. Silva, L.D. Martínez // *Food and chemical toxicology.* – 2007. – V.45. – P.1060–1064.

163. Gomez, M.R. Metal content monitoring in hypericum perforatum pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry / M.R. Gomez, S. Cerutti, R.A. Olsina, M.F. Silva, L.D. Martinez // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* – 2004. – V.34. – P.569–576.

164. Halberstein, R.A. Botanical medicines for diuresis: cross-cultural comparisons / R.A. Halberstein // *Stud. Nat. Prod. Chem.* – 2012. – V.37. – P.1–41.

165. Haldimann, M. Direct determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass-spectrometry using isotope dilution with iodine-129 / M. Haldimann, B. Zimmerli, C. Als, H. Gerber // *Clin. Chem.* – 1998. – V.44. – P.817–824.
166. Haldimann, M. Iodine content of food groups / M. Haldimann, A. Alt, A. Blanc, K. Blondeau // *J. Food Comp. Anal.* – 2005. – V.18. – P.461–471.
167. Halls, D.J. Application of rapid furnace programmes in atomic absorption spectrometry to the determination of lead, chromium and copper in digests of plant materials / D.J. Halls // *Analyst.* – 1987. – V.112. – P.185–189.
168. Hashimoto, M. Water-soluble polyphenolsynthesis via oxidative coupling polymerisation of β -arbutin with copper catalyst in alkaline media / M. Hashimoto, S. Iwabuchi, Y. Oishi, Y. Shibasaki // *Europ. Poly. J.* – 2016. – V.81. – P.152–160.
169. Hassan, S.S.M. Sequential flow-injection potentiometric determination of iodide and iodine in Povidone iodine pharmaceuticals / S.S.M. Hassan, S.A.M. Marzouk // *Electroanalysis.* – 1993. – V.5. – P.855–861.
170. Hodson, M.J. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants / M.J. Hodson, P.J. White, A. Mead, M.R. Broadley // *Ann. Bot.* 2005. – V.96. – P.1027–1046.
171. Hou, X. Determination of chemical species of iodine in some seaweeds (I) / X. Hou, C. Chai, Q. Qian, X. Yan, X. Fan // *Sci. Total. Environ.* – 1997. – V.204. – P.215–221.
172. https://studbooks.net/2279803/matematika_himiya_fizika/kolichestvennoe_opredelenie_saharov_reaktsii_pikrinovoy_kislotoy_krezelius_zeyfert
173. Huyskens-Keil, S. Impact of light quality (white, red, blue light and UV-C irradiation) on changes in anthocyanin content and dynamics of PAL and POD activities in apical and basal spear sections of white asparagus after harvest / S. Huyskens-Keil, I. Eichholz-Dünbar, K. Hassenberg, W.B. Herppich // *Postharvest biology and technology.* – 2020. – V.161. – P.1–6.
174. ICH guideline Q3D on elemental impurities. – London: European medicines agency, 2016. P.1–84.

175. Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook. Ed. S.M. Nelms. – Oxford: CRC Press, 2005. – 485 p.
176. Isidorov, V.A. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of glycosides without prior hydrolysis / V.A. Isidorov, J. Nazaruk // *Journal of Chromatography A*. – 2017. – V.1521. – P.161–166.
177. Jackwerth, E. General aspects of trace analytical methods-VI. Acid pressure decomposition in trace element analysis / E. Jackwerth, S. Gomiscek // *Pure Appl. Chem.* – 1984. – V.56. – P.480–489.
178. Jayakody, R.S. Bergenin: a computationally proven promising scaffold for novel galectin-3 inhibitors / R.S. Jayakody, P. Wijewardhane, C. Herath, S. Perera // *J. Mol. Model.* – 2018. – V.24 – P.1–11.
179. Jermyn, M.A. Increasing the sensitivity of the anthrone method for carbohydrate / M.A. Jermyn // *Analytical biochemistry*. – 1975. – V.68. – P.332–335.
180. Ji, X. Physicochemical properties, structures, bioactivities and future prospective for polysaccharides from *Plantago L.* (Plantaginaceae): A review / X. Ji, C. Hou, X. Guo // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – V.135. – P.637–646.
181. Jin, M. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum L.* / M. Jin, Q. Huang, K. Zhao, P. Shang // *International journal of biological macromolecules*. – 2013. – V.54. – P.16–23.
182. Jin, Y.H. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism / Y.H. Jin, S.J. Lee, M.H. Chung, J.H. Park, Y.I. Park, T.H. Cho, S.K. Lee // *Arch. Pharm. Res.* – 1999. – V.22. – P.232–236.
183. Jue, C.K., Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue / C.K. Jue, P.N. Lipke // *Journal of biochemical and biophysical methods*. – 1985. – V.11. – P.109–115.
184. Jurica, K. The effects of strawberry tree water leaf extract, arbutin and hydroquinone on haematological parameters and levels of primary DNA damage in white blood cells of rats / K. Jurica, I.B. Karačonji, T. Cikač, V. Benković // *Journal of ethnopharmacology*. – 2018. – V.215. – P.83–90.

185. Kajiwara, R. Enhanced antimicrobial activities of polymerized arbutin and its derivatives prepared by oxidative polymerization of arbutin / R. Kajiwara, A. Seto, H. Kofujita, Y. Shiba, Y. Oishi, Y. Shibasaki // *Reactive and functional polymers*. – 2019. – V.138. – P.39–45.
186. Kallithraka, S. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity / S. Kallithraka, A.A.-A. Mohdaly, D.P. Makris, P. Kefalas // *J. Food Compos. Anal.* – 2005. – V.18. – P.375–386.
187. Kalny, P. Determination of selected microelements in polish herbs and their infusions / P. Kalny, Z. Fijalek, A. Daszczuk, P. Ostapczuk // *Sci. Total Environ.* – 2007. – V.381. – P.99–104.
188. Kamel, A.H. A novel flow-through planar solid contact sensor for the determination of lead with potentiometric anionic response / A.H. Kamel // *Electroanalysis*. – 2007. – V.19. – P.2419–2427.
189. Kananykhina, E.N. Characteristics of the pigments from anthocyan-containing food plants, raw material for production of bioflavonoid dyes / E.N. Kananykhina, I.V. Pilipenko // *Chemistry of natural compounds*. – V.36. – 2000. – P.148–151.
190. Karabulut, S. Anomeric and rotameric preferences of glucopyranose in vacuo, water and organic solvents / S. Karabulut, J. Leszczynski // *J. Mol. Model.* – 2013. – V.19. – P.3637–3645.
191. Karadjova, I. ETAAS determination of Cd and Pb in plants / I. Karadjova, M. Karadjov // *Fresenius journal of analytical chemistry*. – 1998. – V.360. – P.246–251.
192. Kenndler, E. Determination of arbutin in *uva-ursi* folium (bearberry leaves) by capillary zone electrophoresis / E. Kenndler, C. Schwer, B. Fritsche, M. Pöhm // *Journal of Chromatography*. – 1990. – V.514. – P.383–388.
193. Khan, T. Polysaccharides as potential anticancer agent – A review of their progress / T. Khan, A. Date, H. Chawda, K. Patel // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – V.210. – P.412–428.

194. Kingston, H.M., Jassie L.B. Introduction to microwave sample preparation. Theory and practice / H.M. Kingston, L.B. Jassie. – Washington DS: ACS Professional reference book, 1988. – 333 p.
195. Kohn, W. Density functional theory in 1997 / W. Kohn // Strongly coupled coulomb systems. – 1998. – P.9–13.
196. Kolachi, N.F. Determination of selenium content in aqueous extract of medicinal plants used as herbal supplement for cancer patients / N.F. Kolachi, T.G. Kazi, H.I. Afridi, S. Khan, S.K. Wadhwa, A.Q. Shah, F. Shah, J.A. Baig, Sirajuddin // Food and chemical toxicology. – 2010. – V.48. – P.3327–3332.
197. Kormosh, Z. New potentiometric sensor for the determination of iodine species / Z. Kormosh, T. Savchuk // Materials science and engineering C. – 2012. – V.32. – P.2286–2291.
198. Koryta J. Iontove-selektivni elektrody / J. Koryta, K. Stulik. – Praha: Academia, 1984. – 268 p.
199. Kubrakova, I.V. Microwave sample preparation for geochemical and ecological studies / I.V. Kubrakova, E.S. Toropchenova // Journal of analytical chemistry. – 2013. – V.68. – P.467–476.
200. Küçükbay, F.Z. Determination of some essential elements and composition of the essential oils of achillea grandifolia Friv (Asteraceae) from different localities / F.Z. Küçükbay, H. Çetin // Anal. Chem. Lett. – 2012. – V.2. – P.337–350.
201. Küpper, F.C. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide / F.C. Küpper, N. Schweigert, E. Ar Gall, J.-M. Legendre, H. Vilter, B. Kloareg // Planta. – 1998. – V.207. – P.163–171.
202. La Rocca, M.V. Benchmarking the DFT methodology for assessing antioxidant-related properties: quercetin and edaravone as case studies / M.V. La Rocca, M. Rutkowski, S. Ringeissen, J. Gomar, M-C. Frantz, S. Ngom, C. Adamo // J. Mol. Model. – 2016. – V.22. – P.2–10.
203. Lamén-Meda, A. Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts / A. Lamén-

Meda, B. Lukas, C. Schmiderer, C. Franz, J. Novak // *Phytochem. Anal.* – 2009. – V.20. – P.416–420.

204. Lee, C. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density / C. Lee, W. Yang, R.G. Parr // *Phys. Rev. B.* – 1988. – V.37. – P.785–789.

205. Lee, K.B. Quantification of arbutin in plant extracts by stable isotope dilution gas chromatography – mass spectrometry / K.B. Lee, J. Choi, S.K. Ahn, J.K. Na, K.K. Shrestha, S. Nguon, S.U. Park, S. Choi, J.K. Kim // *Chromatographia.* – 2018. – V.81. – P.533–538.

206. Leong, S.Y. Influence of pulsed electric fields processing at high-intensity electric field strength on the relation – ship between anthocyanins composition and colour intensity of Merlot (*Vitis vinifera* L.) musts during cold maceration / S.Y. Leong, M. Treadwell, T. Liu, M. Hochberg, M. Sack, G. Mueller, J. Sigler, P. Silcock, I. Oey // *Innovative food science and emerging technologies.* – 2020. – V.59. – P.1–11.

207. Leykin, A.Yu. Systems for the supression of spectral interferences for inductively coupled plasma mass-spectrometry / A.Yu. Leykin, P.V. Yakimovich // *Journal of analytical chemistry.* – 2012. – V.67. – P.677–686.

208. Li, D. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis / D. Li, X. Meng, B. Li // *J. Food Compos. Anal.* – 2016. – V.47. – P.1–7.

209. Lindner, E. A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: An analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfalls / E. Lindner, B.D. Pendley // *Anal. Chim. Acta.* – 2013. – V.762. – P.1.

210. Liu, C. Improvement of anthocyanins rate of blueberry powder under variable power of microwave extraction / C. Liu, H. Xue, L. Shen, C. Liu, X. Zheng, J. Shi // *Separation and purification technology.* – 2019. – V.226. – P.286–298.

211. Liu, J. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications / J. Liu, S. Willför, C. Xu // *Bioactive carbohydrates and dietary fibre.* – 2015. – V.5. – P.31–61.

212. Liu, J.-fu Spectrophotometric flow injection determination of total reducing sugars in tobacco based on oxidation by ferricyanide and formation of Prussian blue / J.-fu Liu, G.-bin Jiang // *Analytical Letters*. – 2001. – V.34. – P.1923–1934.
213. Lobayan, R.M. Structural and electronic properties of Z isomers of (4 α →6', 2 α →O→1'')-phenylflavans substituted with R=H, OH and OCH₃ calculated in aqueous solution with PCM salvation model / R.M. Lobayan, E.N. Bentz, A.H. Jubert, A.B. Pomilio // *J. Mol. Model*. – 2012. – V.18. – P.1667–1676.
214. Lockowandt, L. Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: the blue flowers and the unexplored non-edible part / L. Lockowandt, J. Pinela, C.L. Roriz, C. Pereira, R.M.V. Abreu, R.C. Calhelha, M.J. Alves, L. Barros, M. Bredol, I.C.F.R. Ferreira // *Industrial crops and products*. – 2019. – V.128. – P.496–503.
215. Lv, H. Elemental characteristics of Sanqi (*Panax notoginseng*) in Yunnan province of China: multielement determination by ICP-AES and ICP-MS and statistical analysis / H. Lv, Y. Zhang, Y. Sun, Y. Duan // *Microchemical journal*. – 2019. – V.146. – P.931–939.
216. Maberly, G.F. Iodine deficiency: consequences and progress toward elimination / G.F. Maberly, D.P. Haxton, F. van der Haar // *Food Nutr. Bull*. – 2003. – V.24 (Suppl. 1). – P.S91–S98.
217. Machado, I. Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynaracardunculus* L. subsp. *Gardunculus*) / I. Machado, I. Dol, E. Rodríguez–Arce, M.V. Cesio, M. Pistón // *Microchemical journal*. – 2016. – V.128. – P.128–133.
218. Maeda, K. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture / K. Maeda, M. Fukuda // *Pharmacol. Exp. Ther*. – 1996. – V.276. – P.765–769.
219. Marczenko, Z., Balcerzak M. Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis / Z. Marczenko, M. Balcerzak. – Amsterdam: Elsevier, 2000. – 521 p.

220. Marczenko, Z., Balcerzak M. Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej / Z. Marczenko, M. Balcerzak. – Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998. – 711 p.

221. Martin-Domingo, M.C. Determination of metalloid, metallic and mineral elements in herbal teas. Risk assessment for the consumers / M.C. Martin-Domingo, A. Pla, A.F. Hernandez, P. Olmendo, A. Navas-acien, D. Lozano-Paniagua, F. Gil // *J. Food Comp. Anal.* – 2017. – V.60. – P.81–89.

222. Masse, M.-O. Identification and quantitative analysis of kojic acid and arbutin in skin-whitening cosmetics / M.-O. Masse, V. Duvallet, M. Borremans, L. Goeyens // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2001. – V.23. – P.219–232.

223. Mattos, I.L. Spectrophotometric flow injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses / I.L. Mattos, E.A.G. Zagatto, A.O. Jacinthao // *Anal. Chim. Acta.* – 1988. – V.214. – P.247–257.

224. Mattson, A.M. Colorimetric determination of reducing sugars with triphenyltetrazolium chloride / A.M. Mattson, C.O. Jensen // *Analytical chemistry.* – 1950. – V.22. – P.182–185.

225. Medvedev, M.G. Density functional theory is straying from the path toward the exact functional / M.G. Medvedev, I.S. Bushmarinov, J. Sun, J.P. Perdew, K.A. Lyssenko // *Science.* – 2017. – V.255. – P.49–52.

226. Meeravali, N.N. Comparison of open microwave digestion and digestion by conventional heating for the determination of Cd, Cr, Cu and P in algae using transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry / N.N. Meeravali, S.J. Kumar // *Fresenius journal of analytical chemistry.* – 2000. – V.366. – P.313–315.

227. Michałowski, J. Simultaneous determination of sucrose and reducing sugars using indirect flow-injection biamperometry / J. Michałowski, A. Kojło, M. Trojanowicz, B. Szostek, E.A.G. Zagatto // *Anal. Chim. Acta.* – 1993. – V.271. – P.239–246.

228. Migas, P. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics / P. Migas, M. Krauze-Baranowska // *Phytochemistry letters.* – 2015. – V.13. – P.35–40.

229. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // *Analytical chemistry*. – 1959. – V.31. – P.426–428.
230. Min, K. A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase / K. Min, G.W. Park, Y.J. Yoo, J.S. Lee // *Bioresource technology*. – 2019. – V.289. – P.1–8.
231. Moens, L., Jakubowski N. Double-focusing mass spectrometers in ICP-MS. www.textronica.com/aplicate/elements/icphrms.htm.
232. Momany, F., Schnupf U. DFT optimization and DFT-MD studies of glucose, ten explicit water molecules enclosed by an implicit solvent, COSMO / F. Momany, U. Schnupf // *Computational and theoretical chemistry*. – 2014. – V.1029. – P.57–67.
233. Moore, M. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments for uncomplicated urinary tract infection in women (ATAFUTI): a factorial randomized trial / M. Moore, J. Trill, C. Simpson, F. Webley, M. Radford, L. Stanton, T. Maishman, A. Galanopoulou, A. Flower, C. Eyles, M. Willcox, A.D. Hay, E. van der Werf, S. Gibbons, G. Lewith, P. Little, G. Griffiths // *Clinical microbiology and infection*. – 2019. – V.25. – P.973–980.
234. Morales-Muñoz, S. Acidified pressurized hot water for the continuous extraction of cadmium and lead from plant materials prior to ETAAS / S. Morales-Muñoz, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro // *Spectrochimica acta. Part B: atomic spectroscopy*. – 2003. – V.58. – P.159–165.
235. Moreda-Piñeiro, A. A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields / A. Moreda-Piñeiro, V. Romaris-Hortas, P. Bermejo-Barrera // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V.26. – P.2107–2152.
236. Muller, A.L.H. Microwave-assisted digestion using diluted acids for toxic elements determination in medicinal plants by ICP-MS in compliance to United States Pharmacopeia requirements / A.L.H. Muller, E.I. Muller, J.S. Barin, E.M.M. Flores // *Analytical Methods*. – 2015. – V.7. – P.5218–5225.
237. Muñoz, S. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of

different standards / S. Muñoz, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V.628. – P.104–110.

238. Muzika, K. Evaluation of calibration table and calibration averaging routines for quantitative determination of sucrose, glucose, and fructose using high performance liquid chromatography / K. Muzika, J. Kovar // *Journal of liquid chromatography.* – 1987. – V.10. – P.2291–2304.

239. Naushad, M. A mercury ion selective electrode based on poly-o-toluidine Zr(IV) tungstate composite membrane / M. Naushad, Inamuddin, T.A. Rangreez, Z.A. Alothman // *Journal of electroanalytical chemistry.* – 2014. – V.713. – P.125–130.

240. Negi, J.S. Determination of mineral contents of *Digitalis purpurea* L. and *Digitalis lanata* Ehrh. / J.S. Negi, V.K. Bisht, A.K. Bhandari, R.C. Sundriyal // *Biological trace elements research.* – 2012. – V.12. – P.463–469.

241. Ni, Z. Determination of trace elements in *Dendrobium officinale* cultivated in various conditions / Z. Ni, Z. Chen, R. Bai, F. Tang // *Analytical Letters.* – 2017. – V.51. – P.648–658.

242. Nischwitz, V. First comprehensive study on total contents and hot water extractable fraction of selected elements in 19 medicinal plants from various locations in Nyamira County, Kenya / V. Nischwitz, R. Mogwasi, S. Zor, Z. Getenga, D.K. Kariuki, K. Günther // *Journal of trace elements in medicine and biology.* – 2016. – V.39. – P.54–61.

243. Nycz, J.E. Arbutin: isolation, X-ray structure / J.E. Nycz, G. Malecki, M. Morag, G. Navak, L. Ponikiewski, J. Kusz // *Journal of Molecular Structure.* – 2010. – V.980. – P.13–17.

244. Oliveira, A.F. Flow injection spectrophotometric determination of reducing sugars using a focalized coiled reactor in a domestic microwave oven / A.F. Oliveira, O. Fatibello-Filho // *Talanta.* – 1999. – V.50. – P.899–904.

245. Parejo, I. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylosuva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography / I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina // *Phytochem. Anal.* – 2001. – V.12. – P.336–339.

246. Pavlović, R.D. Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species / R.D. Pavlović, B. Lakušić, Z. Došlov-Kokoruš, N. Kovačević // *Die Pharmazie*. – 2009. – V.64. – P.656–659.
247. Pawelek, J.M. Factors regulating growth and pigmentation of melanoma cells / J.M. Pawelek // *J. Invest. Dermatol.* – 1976. – V.66. – P.201–209.
248. Peng, L.-Q. Pyridinium ionic liquid-solid extraction of inorganic and organic iodine from *Laminaria* / L.-Q. Peng, W.-Y. Yu, J.-J. Xu, J. Cao // *Food Chemistry*. – 2018. – V.239. – P.1075–1084.
249. Perdew, J.P. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: generalized gradient approximation / J.P. Perdew, W. Yue // *Phys. Rev. B*. – 1986. – V.33. – P.8800–8802.
250. Perdew, J.P. Generalized gradient approximation made simple / J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof // *Phys. Rev. Lett.* – 1996. – V.77. – P.3865–3868.
251. Peris-Tortajada, M. Determination of reducing sugars by the neocuproine method using flow injection analysis / M. Peris-Tortajada, R. Puchades, A. Maquieira // *Food chemistry*. – 1992. – V.43. – P.65–69.
252. Pohl, P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes / P. Pohl, A. Dzimitrowicz, D. Jedryczko, A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Jamroz // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2016. – V.130. – P.326–335.
253. Popov, S.V. Anti-inflammatory activity of low and high methoxylated citrus pectins / S.V. Popov, P.A. Markov, G.Yu. Popova, I.R. Nikitina, L. Efimova, Yu.S. Ovodov // *Biomedicine and preventive nutrition*. – 2013. – V.3. – P.59–63.
254. Popov, S.V. Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre* / S.V. Popov, G.Yu. Popova, R.G. Ovodova, Yu.S. Ovodov // *Fitoterapia*. – 2005. V.76. – P.281–287.
255. Popović, S. Analysis of tea for metals by flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry with multivariate analysis / S. Popović, A. Pantelić, Ž. Milovanović, J. Milinkov, M. Vidović // *Analytical Letters*. – 2017. – V.50. – P.2619–2633.

256. Pröfrock, D. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences a review of challenges, solutions and trends / D. Pröfrock, A. Prange // *Applied Spectrometry*. – 2012. – V.66. – P.843–868.
257. Pyka, A. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*vacciniumvitisidaee*) / A. Pyka, K. Bober, A. Stolarczyk // *Acta Pol. Pharm.* – 2007. – V.63. – P.395–400.
258. Raposo, M.F.D. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae / M.F.D. Raposo, R. de Morais, A. de Morais // *Marine Drugs*. – 2013. – V.11. – P.233–252.
259. Raposo, M.F.D. Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke / M.F.D. Raposo, A.M.M.B. de Morais // *Life Sciences*. – 2015. – V.125. – P.32–41.
260. Reinhardt, W. Effect of small doses of iodine on thyroid function in patients with Hashimoto's thyroiditis residing in an area of mild iodine deficiency / W. Reinhardt, M. Luster, K.H. Rudorff, C. Heckmann, S. Petrasch, S. Lederbogen, R. Haase, B. Saller, C. Reiners, D. Reinwein, K. Mann // *Eur. J. Endocrinol.* – 1998. – V.139. – P.23–28.
261. Resano, M. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities / M. Resano, M.R. Flórenz, E. García-Ruiz // *Spectrochim. Acta. Part B*. – 2013. – V.88. – P.85–97.
262. Robison, L.M. Comparison of the effects of iodine and iodide on thyroid function in humans / L.M. Robison, P.W. Sylvester, P. Birkenfeld, J.P. Lang, R.J. Bull // *J. Toxicol. Environ. Health. PartA*. – 1998. – V.55. – P.93–106.
263. Rocha, G.B. RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I / G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, J.J.P. Stewart // *J. Comput. Chem.* – 2006. – V.27. – P.1101–1111.
264. Rodriguez-Lopez, J.N. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway / J.N. Rodriguez-Lopez, J. Tudela, R. Varon, F. Garcia-Carmona, F. Garcia-Carnovas // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V.267. – P.3801–3810.

265. Romaris-Hortas, V. Speciation of the bio-available iodine and bromine forms in edible seaweed by high performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry / V. Romaris-Hortas, P. Bermejo-Barrera, J. Moreda-Piñeiro, A. Moreda-Piñeiro // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V.745. – P.24–32.
266. Rondel, C. Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars / C. Rondel, C.-E. Marcato-Romain, E. Girbal-Neuhauser // *Waters research.* – 2013. – V.47. – P.2901–2908.
267. Rychlińska, I., Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant material by HPLC / I. Rychlińska, S. Nowak // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.* – 2012. – V.40. – P.109–113.
268. Rzhavskaia, A.V. Anion-selective electrodes based on solidified 1,3-dihexadecyl imidazolium ionic liquids with halide and pseudohalide anions / A.V. Rzhavskaia, N.V. Shvedene, I.V. Pletnev // *Journal of electroanalytical chemistry.* – 2016. – V.783. – P.274–279.
269. Sahani, M.K. Novel potentiometric sensor for selective monitoring of Ce³⁺ ion in environmental samples / M.K. Sahani, S. Bhardwaj, A.K. Singh // *Journal of electroanalytical chemistry.* – 2016. – V.780. – P.209–216.
270. Saleh, M.B. A novel PVC membrane sensor for potentiometric determination of thallium(I) / M.B. Saleh // *Journal of electroanalytical chemistry.* – 1998. – V.448. – P.33–39.
271. Samoilova, Z. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics / Z. Samoilova, G. Smirnova, N. Muzyka, O. Oktyabrsky // *Microbiol. Res.* – 2014. – V.169. – P.307–313.
272. Sang, J. Deep eutectic solvent-based extraction coupled with green two-dimensional HPLC-DAD-ESI-MS/MS for the determination of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. Fruit / J. Sang, B. Li, Y.-ya Huang, Q. Ma, K. Liu, C.-qin Li // *Anal. Methods.* – 2018. – V.10. – P.1247–1257.
273. Sang, J. Development and validation of a green chromatography for the determination of anthocyanins in haskap berry, mulberry and blackberry / J. Sang, Q. Ma, C.-q. Li // *Anal. Methods.* – 2017. – V.9. – P.2535–2545.

274. Sardans, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry / J. Sardans, F. Montes, J. Peñuelas // *Spectrochimica Acta. Part. B.* – 2010. – V.65. – P.97–112.

275. Sarma, H. Accumulation of heavy metals in selected medicinal plants / H. Sarma, S. Deka, H. Deka, R.R. Saikia // *Reviews of environmental contamination and toxicology.* – 2011. – V.214. – P.63–86.

276. Sartini, R.P. Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry / R.P. Sartini, C.C. Oliveira, E.A.G. Zagatto, H.B. Filho // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – V.366. – P.119–125.

277. Sati, A. Mineral composition of berberis aristata DC roots / A. Sati, S.C. Sati, J.S. Negi, O.P. Sati // *Anal. Chem. Lett.* – 2018. – V.8. – P.361–367.

278. Schepetkin, I.A. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential / I.A. Schepetkin, M.T. Quinn // *International Immunopharmacology.* – 2006. – V.6. – P.317–333.

279. Schindler, G. Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uvae ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans / G. Schindler, U. Patzak, B. Brinkhaus, A. von Niecieck, J. Wittig, N. Kraemer, I. Glöckl, M. Veit // *J. Clin. Pharmacol.* – 2002. – V.42. – P.920–927.

280. Schuetz, M. Continuum source-atomic absorption spectrometry using a two-dimensional charge coupled device / M. Schuetz, J. Murphy, R.E. Fields, J.M. Harnly // *Spectrochim. Acta. Part. B.* – 2000. – V.55. – P.1895–1912.

281. Shah, M. Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection / M. Shah, R.G. Wuilloud, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2005. – V.20. – P.176–182.

282. Shahine, S. Indirect spectrophotometric determination of reducing sugars and ascorbic acid using phenolphthalein as reagent / S. Shahine, R. Mahmoud // *Mikrochimica acta.* – 1980. – V.1. – P.119–122.

283. Shelor, C.P. Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices / C.P. Shelor, P.K. Dasgupta // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V.702. – P.16–36.
284. Shvedene, N.V. Iodide-selective screen-printed electrodes based on low-melting ionic solids and metallated phthalocyanine / N.V. Shvedene, O.A. Avramenko, V.E. Baulin, L.G. Tomilova, I.V. Pletnev // *Electroanalysis.* – 2011. – V.23. – P.1067–1072.
285. Sinopoli, A. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: a review / A. Sinopoli, G. Calogero, A. Bartolotta // *Food chemistry.* – 2019. – V.297. – P.1–12.
286. Siwiec, K. The application of germanium(IV)-porphyrins as fluoride-selective ionophores for polymeric membrane electrodes / K. Siwiec, Ł. Górski // *Journal of electroanalytical chemistry.* – 2019. – V.833. – P.498–504.
287. Skrzypczak-Pietraszek, E. HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *origanum majorana* L. shoot culture / E. Skrzypczak-Pietraszek, I. Kwiecień, A. Gołdyn, J. Pietraszek // *Phytochemistry letters.* – 2017. – V.20. – P.443–448.
288. Šmídová, B. The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of highbush blueberry anthocyanins / B. Šmídová, D. Šatínský, K. Dostálova, P. Solich // *Talanta.* – 2017. – V.166. – P.249–254.
289. Smith, J.D. Spectrophotometric determination of silicate in natural waters by formation of α -molybdosilicic acid and reduction with a tin(IV)-ascorbic acid mixture / J.D. Smith, P.J. Milne // *Anal. Chim. Acta.* – 1981. – V.123. – P.263–270.
290. Sołoniewicz, R. Spectrometric determination of reducing sugars with aromatic nitro compounds / R. Sołoniewicz, M. Teodorczyk // *Mikrochimica Acta.* – 1982. – V.1. – P.105–114.
291. Soto-Rojo, R. Comparison of several protocols for the computational prediction of the maximum absorption wavelength of chrysanthemine / R. Soto-Rojo, J.

Baldenebro-López, N. Flores-Holguin, D. Glossman-Mitnik // *J. Mol. Model.* – 2014. – V.20. – P.1–9.

292. Srogi, K. Development in the determination of trace elements by atomic spectroscopic techniques / K. Srogi // *Analytical Letters.* – 2008. – V.41. – P.677–724.

293. Stambergova, A.M.S.I.L. Hodnocenifenolických Irtek v *Arctostaphylosuvae-ursi*. IV. Stanovení arbutinu, methylarbutinu a hydrochinonu v listech metodou HPLC / A.M.S.I.L. Stambergova // *Ceskoslov. Farm.* – 1985. – V.34. – P.179–182.

294. Stanković, I.M. Carbohydrate-protein aromatic ring interactions beyond CH/ π interactions: a protein data bank survey and quantum chemical calculations / I.M. Stanković, J.P. Blagojević Filipović, S.D. Zarić // *International journal of biological macromolecules.* – 2020. – V.157. – P.1–9.

295. Staroverov, V.N. Test of a ladder of density functionals for bulk solids and surface / V.N. Staroverov, G.E. Scuseria, J. Tao, J.P. Perdew // *Phys. Rev. B.* – 2004. – V.69. – P. 075102-1-075102-11.

296. Stephen Inbaraj, B. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS / B. Stephen Inbaraj, H. Lu, T.H. Kao, B.H. Chen // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* – 2010. – V.51. – P.549–556.

297. Stewart, J.J.P. Comparison of the accuracy of semiempirical and some DFT methods for predicting heats of formation / J.J.P. Stewart // *J. Mol. Model.* – 2004. – V.10. – P.6–12.

298. Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods IV: extension of MNDO, AM1, and PM3 to more main group elements / J.J.P. Stewart // *J. Mol. Model.* – 2004. – V.10. – P.155–164.

299. Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method / J.J.P. Stewart // *J. Comput. Chem.* – 1989. – V.10. – P.209–220.

300. Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements / J.J.P. Stewart // *J. Mol. Model.* – 2007. – V.13. – P.1173–1213.

301. Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters / J.J.P. Stewart // *J. Mol. Model.* – 2013. – V.19. – P.1–32.
302. Takagaki, K. Determination of the reducing terminal sugars of glucosaminoglycans using 2-aminopyridine / K. Takagaki, T. Nakamura, H. Kawasaki, A. Kon, S. Ohishi, M. Endo // *Journal of biochemical and biophysical methods.* – 1990. – V.21. – P.209–215.
303. The Japanese Pharmacopoeia. 15 Ed. Pharmaceuticals and medicinal devices agency. – Tokyo: The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006. – P.1262–1263.
304. The United States Pharmacopeia 36/NF 31. V. 1. – Rockville: Twinbrook Parkway, 2013. – P.1350–1352.
305. The United States Pharmacopeia 36/NF31. V. 1. – Rockville: Twinbrook Parkway, 2013. – P.151–153.
306. The United States Pharmacopeia 36/NF31. V. 1. – Rockville: Twinbrook Parkway, 2013. – P.1488–1489.
307. Thomas, W. The colorimetric determination of carbohydrates in plants by the picric acid reduction method. I. The estimation of reducing sugars and sucrose / W. Thomas, A. Dutcher // *Analytical Chemistry.* – 1924. – V.46. – P.1662–1669.
308. Thongchai, W. Arbutin determination in medicinal plants and creams / W. Thongchai, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2009. – V.31. – P.87–96.
309. Thongchai, W. High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts / W. Thongchai, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2007. – V.29. – P.487–489.
310. Thongsaw, A. Determination of cadmium in herbs by SFODME with ETAAS detection / A. Thongsaw, W. Chuachud Chaiyasith, R. Sanannmuang, G.M. Ross, R.J. Ampiach-Bonney // *Food chemistry.* – 2017. – V.219. – P.453–458.
311. Tinggi, U. Determination of iodine in selected foods and diets by inductively coupled plasma-mass spectrometry / U. Tinggi, N. Schoendorfer, P.S.W. Davies, P. Scheelings, H. Olszowy // *Pure Appl. Chem.* – 2012. – V.84. – P.291–299.

312. Toczek, D. Theoretical studies of structure, energetic and properties of Ca^{2+} complexes with alizarin glucoside / D. Toczek, K. Kubas, M. Turek, S. Roszak, R. Gancarz // *J. Mol. Model.* – 2013. – V.19. – P.4209–4214.
313. Tokalioğlu, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis / Ş. Tokalioğlu // *Food chemistry.* – 2012. – V.134. – P.2504–2508.
314. Toma, R.B. Determination of reducing sugars in French fried potatoes by 3,5-dinitrosalicylic acid / R.B. Toma, H.K. Leung // *Food chemistry.* – 1987. – V.23. – P.29–33.
315. Tong, W. Metabolism of I131 by the marine alga, *nereocystis luetkeana* / W. Tong, I.L. Chaikoff // *J. Biol. Chem.* – 1955. – V.215. – P.473–484.
316. Tonon, R.V. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents / R.V. Tonon, C. Brabet, M.D. Hubinger // *Food Res. Int.* – 2010. – V.43. – P.907–914.
317. Tyutyunnik, O.A. Microwave preparation of natural samples to the determination of mercury and other toxic elements by atomic absorption spectrometry / O.A. Tyutyunnik, M.L. Getsina, E.S. Toropchenova, I.V. Kubrakova // *Journal of analytical chemistry.* – 2013. – V.68. – P.377–385.
318. Upadhyay, A. Selective determination of Zn^{2+} ion in various environmental, biological and medicinal plant samples using a novel coated graphite electrode / A. Upadhyay, A.K. Singh, K.R. Bandi, A.K. Jain // *Electroanalysis.* – 2013. – V.25. – P.1–10.
319. Vanhaelen, M. Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography-densitometry / M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre // *Journal of chromatography.* – 1983. – V.281. – P.263–271.
320. Verhaeghe, E.F. Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggest a new mechanism for its accumulation / E.F. Verhaeghe, A. Fraysse, J.-L. Guerquin-Kern, T.-D. Wu, G. Deves, C. Mioskowski, C. Leblanc, R. Ortega, Y. Ambroise, P. Potin // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2008. – V.13. – P.257–269.

321. Vickman, A.E. Effects of varying the 6-position oxidation state of hexopyranoses: a systematic comparative computational analysis of 48 monosaccharide stereoisomers / A.E. Vickman, D.C. Ashley, M.-H. Baik, N.L.B. Pohl // *J. Mol. Model.* – 2017. – V.23. P.1–9.
322. Wang, J. Analytical electrochemistry / J. Wang. – Second Edition – New York: Wiley-VCH, 2000. – 209 p.
323. Wang, J. Determination of silica coating efficiency on metal particles using multiple digestion methods / J. Wang, N. Topham, C.Y. Wu // *Talanta.* – 2011. – V.85. – P.2655–2661.
324. Wang, P.C. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review / P.C. Wang, S. Zhao, B.Y. Yang, Q.H. Wang, H.X. Kuang // *Carbohydrate Polymers.* – 2016. – V.148. – P.86–97.
325. Wang, W. Optimization of reactions between reducing sugars and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) by response surface methodology / W. Wang, F. Chen, Y. Wang, L. Wang, H. Fu, F. Zheng, L. Beecher // *Food chemistry.* – 2018. – V.254. – P.158–164.
326. Wang, Y. Determination of selected elements in aqueous extractions of a traditional Chinese medicine formula by ICP-MS and FAAS: evaluation of formula rationality / Y. Wang, F. Feng, Z. Wang // *Analytical Letters.* – 2010. – V.43. – P.983–992.
327. Warrand, J. Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage / J. Warrand, P. Michaud, L. Picton, G. Muller, B. Courtois, R. Ralainirina, J. Courtois // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2005. – V.35. P.121–125.
328. Welz, B. Palladium nitrate-magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5. Performance for the determination of 21 elements / B. Welz, G. Schlemmer, J.R. Mudakavi // *JAAS.* – 1992. – V.7. – P.1257–1271.
329. Welz, B., High-resolution continuum source AAS: the better way to do atomic absorption spectrometry / B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann. – Weinheim: Wiley–VCH, 2005. – 285 p.

330. Wen, Y. Optimization of microwave assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using response surface methodology / Y. Wen, H. Chen, X. Zhou, Q. Deng, Y. Zhao, C. Zhao, X. Gong // *RCS Adv.* – 2015. – V.5. – P.19686–19695.
331. Wight, A. Determination of reducing sugars, sucrose, and inulin in chicory root by high-performance liquid chromatography / A. Wight, P.J. van Niekerk // *J. Agric. Food Chem.* – 1983. – V.31. – P.282–285.
332. Willemse, C.M. Comprehensive two-dimensional liquid chromatographic analysis of anthocyanins / C.M. Willemse, M.A. Stander, A.G.J. Tredoux, A. de Villiers // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V.1359. – P.189–201.
333. Willemse, C.M. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins / C.M. Willemse, M.A. Stander, A. de Villiers // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V.1319. – P.127–140.
334. Wrona, M. Antioxidant and antimicrobial markers by UPLC-ESI-Q-TOF-MS of a new multilayer active packaging based on *Arctostaphylos uva-ursi* / M. Wrona, S. Blasco, R. Becerril, C. Nerin, E. Sales // *Talanta.* – 2019. – V.196. – P.498–509.
335. Xie, J.H. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants / J.H. Xie, M.L. Jin, G.A. Morris, X.Q. Zha, H.Q. Chen, Y. Yi, J.E. Li, Z.J. Wang, J. Gao, S.P. Nie, P. Shang, M.Y. Xie // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2016. – V.56. – P.S60–S84.
336. Xie, J.H. Purification: physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves / J.H. Xie, X. Liu, M.Y. Shen, S.P. Nie, H. Zhang, C. Li, D.M. Gong, M.Y. Xie // *Food Chemistry.* – 2013. – V.136. – P.1453–1460.
337. Yarnell, E. Botanical medicines for the urinary tract / E. Yarnell // *World J. Urol.* – 2002. – V.20. – P.285–293.
338. Yeh, S.T. Analysis of iodine content in seaweed by GC-ECD and estimation of iodine intake / S.T. Yeh, N.H. Hung, T.C. Lin // *Journal of Food and Drug Analysis.* – 2014. – V.22. – P.189–196.

339. Yu, Y. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review / Y. Yu, M. Shen, Q. Song, Q. Xie, S. Xie // *Carbohydrates Polymers*. – 2018. – V.183. – P.91–101.

340. Zhang, C.-H. Simultaneous determination of neutral and uronic sugars based on UV-vis spectrometry combined with PLC / C.-H. Zhang, Y.-H. Yun, Z.-M. Zhang, Y.-Z. Liang // *International journal of biological macromolecules*. – 2016. – V.87. – P.290–294.

341. Zhong, W.-S. Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry / W.-S. Zhong, T. Ren, L.-J. Zhao // *Journal of food and drug analysis*. – 2016. – V.24. – P.46–55.

342. Zhou, W. Potentiometric iodide selectivity of polymer-membrane sensors based on Co(III) triazole derivative / W. Zhou, Y.-Q. Chai, R. Yuan, X. Wu, J.-X. Guo // *Electroanalysis*. – 2008. – V.20. – P.1434–1439.

343. Zohri, A.A. 2-Aminoethanaminium 2-(ethoxycarbonyl)-4,6-dinitrophenolate as a greener route in reducing sugar quantification / A.A. Zohri, M. Abdelazim, S. Ibrahim // *Methods X*. – 2018. – V.5. – P.609–612.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Примеры использования инструментальных методов анализа для определения элементов, арбутина, антоцианов в ЛРС

Таблица А.1 – Примеры использования ЭТААС и МС-ИСП для определения элементов в ЛРС

| <i>n/n</i> | <i>Пробоподготовка</i> | <i>Метод</i> | <i>Анализируемые растения</i> | <i>Определяемые элементы</i> | <i>Литература</i> |
|------------|--|--------------|--|---|-------------------|
| 1 | Предварительная минерализация в течение 24 ч, далее разложение проводилось в условиях МВ-нагрева | ЭТААС | Листья березы, плоды боярышника, корни одуванчика лекарственный | Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn | [187] |
| 2 | Разложение смесью концентрированной азотной кислоты и водорода пероксида в условиях МВ-нагрева | МС-ИСП | Варбургия, паслен индийский, эритрина, сенна, аурикулярия уховидная, крапива двудомная, кротон, череда волосистая, клокочина, манго индийское, акация абиссинская, алое вера, табернемонтана | B, Mg, Al, P, K, Ca, Ti, V, Cr, Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Rb, Sr, Y, Nb, Mo, Cd, Ba, Nd, Sm, Gd, Er, Yb, Tl, Pb | [242] |
| 3 | Экстракция водой в условиях МВ-нагрева | ЭТААС | Сельдерей пахучий, шатавари, сенна, эмблика лекарственная, паслен индийский, баиль, мята полевая, подорожник азиатский, портулак огородный, витания снотворная, дурнишник обыкновенный, сельдерей черешковый | Se | [196] |
| 4 | Разложение смесью концентрированной азотной кислоты и водорода пероксида в условиях МВ-нагрева | МС-ИСП | Крапива двудомная, липы цветки, вероника цимбалариевая, мак снотворный, звербой продырявленный, мята перечная, черника обыкновенная, Melissa лекарственная, семена льна, омела белая, базилик священный, имбирь аптечный, лаванда узколистная, шалфей лекарственный, манжетка обыкновенная, розмарин лекарственный, артишок, вереск обыкновенный, зизифус настоящий, ромашка римская, лаванда стэхадская, укроп огородный, хвощ полевой, гранат обыкновенный, шиповник собачий, сена остролистная, чернушка посевная, мальва лесная. | Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Pb | [313] |

Продолжение таблицы А.1

| | | | | | |
|----|---|-------------------|---|--|-------|
| 5 | Разложение смесью концентрированной азотной кислоты и водорода пероксида в условиях МВ-нагрева | МС-ИСП | Дягиль лекарственный, бакопа Монье, володушка китайская, куркума длинная, кола заостренная, эмблика лекарственная, гарциния камбоджийская, мукуна жгучая, базилик священный, пуэрария дольчатая, шалфей красный, лимонник китайский, шлемник байкальский, архат, терминалия арджуна, харитаки, эхинацея пурпурная, зверобой продырявленный, виноград культурный | Cd, Pb, Al, As, Ba, Ni, Sb | [151] |
| 6 | Разложение смесью концентрированной азотной кислоты и водорода пероксида в условиях МВ-нагрева | АЭС-ИСП МС-ИСП | Женьшень ложный | P, Ca, Mg, Al, S, Fe, Mn, Zn, Ba, Sr, Cu, Ni, Ce, V, La, Pb, Cr, Co, As, Se, Zr, Ga, Nb, Mo, Hg, Tl, Bi, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Nd, Y, Sc, Pr, Sm, Gd, Dy, Eu, Yb, Er, Tb, Ho, Lu, Tm, Ge, In, Re, Hf, Ta, Ir, Pt, Au, Ru, Rh | [215] |
| 7 | Разложение концентрированной азотной кислотой в условиях МВ-нагрева. Извлечение элементов горячей водой, с последующем пропусканием через ионообменную смолу и высаждение макромолекул белков и полисахаридов из полученного элюата | ЭТААС МС-ИСП | Тысячелистник обыкновенный, ромашка, толокнянка обыкновенная, гибискус сабдарифа, мята перечная, душица обыкновенная, тимьян ползучий. | As, Cd, Pb | [91] |
| 8 | Разложение смесью концентрированной азотной кислоты и водорода пероксида в условиях МВ-нагрева | ЭТААС ПААС | Тысячелистник крупнолистный | Al, Mn, Zn, B, Cu, Fe, Co, Se, Cd, Pb | [200] |
| 9 | Разложение смесью концентрированной азотной и серной кислот в условиях МВ-нагрева | МС-ИСП | Барбарис индийский | Li, Na, Mg, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Mo, Ag, Pb | [277] |
| 10 | Разложение смесью концентрированной азотной и серной кислот в условиях МВ-нагрева | МС-ИСП | Наперстянка пурпурная, наперстянка шерстистая | B, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, As, Pb | [240] |
| 11 | Разложение смесью азотной и хлорной кислот. В реакционную смесь также добавляют несколько капель плавиковой кислоты | ПААС ЭТААС | Зверобой продырявленный | Ca, Cu, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Zn | [163] |
| 12 | Двухстадийная пробоподготовка. На первой стадии – извлечение элементов водой при нагревании, на второй – обработка водного извлечения смесью концентрированной азотной кислоты и водорода пероксида | ПААС МС-ИСП | Gypsum fibrosum, анемаррена асфоделовидная, солодка уральская, рис посевной | Mg, Fe, Al, Ti, Mn, Co, Cu, Zn | [326] |

Продолжение таблицы А.1

| | | | | | |
|----|--|--|---|--|-------|
| 13 | При определении МС-ИСП разложение проводилось концентрированной азотной кислотой в условиях МВ-нагрева. При РФА-анализе из анализируемых образцов формировались таблетки. Определение элементов методом ионообменной хроматографии проводилось после обработки образцов водой в ультразвуковой бане. | РФА МС-ИСП Ионная хроматография | Гарциния камбоджийская, эмблика, дягиль лекарственный, лимонник китайский, шалфей красный, шлемник байкальский, базилик священный, эхинацея пурпурная, виноград культурный, цикорий обыкновенный. | K, Na, Ca, Mg, Zn, Cu, Cr, Se, Mn, Mo, Fe | [152] |
| 14 | Разложение смесью концентрированной азотной и серной кислот в условиях МВ-нагрева | МС-ИСП | Дендробиум | B, V, Cr, As, Mn, Fe, Mn, Fe, Mo, Cu, Zn, Se, Sr, Sn, Ti, Al, Co, As, Pb, Cd, Bi | [241] |
| 15 | Пробоподготовка проводится в две стадии. На первой стадии – озоление, на второй – обработка остатка царской водкой при наревании | ПААС ЭТААС | Зверобой продырявленный, крапива двудомная, бузина черная, камелия китайская, толокнянка обыкновенная, тимьян ползучий, тысячелистник обыкновенный, мята перечная | Fe, Zn, Cr, Ni, Pb, As, Cd | [255] |

Таблица А.2 – Примеры использования ВЭЖХ/УФ для определения арбутина в ЛРС

| № п/п | Колонка | Растворители для элюирования | Режим элюирования | Длина волны, нм | Условия экстракции | Анализируемые растения | Литература |
|-------|--|---|-------------------|-----------------|---|---|------------|
| 1 | Purospher RP-18e (250×4 мм, 5 мкм) | Метиловый спирт-вода | Изократический | 285 | Метиловый спирт, ультразвуковая обработка, 40 °С | Биомасса побегов майорана | [287] |
| 2 | Vydac C18 | Ацетонитрил-0,5 % водный раствор муравьиной кислоты | Градиентный | 280 | 50 % спирт этиловый, 90 °С | Дереза обыкновенная | [296] |
| 3 | ACE5 C-18 (250×4,6 мм, 5 мкм) | 7 % раствор метилового спирта в воде | Изократический | 280 | 49 % метиловый спирт, ультразвуковая обработка, 40 °С | Бергамот | [118] |
| 4 | Nucleosil C8 | Метиловый спирт-вода | Изократический | 280 | 5 % метиловый спирт, ультразвуковая обработка, 25 °С | Толокнянка обыкновенная | [245] |
| 5 | Luna C18(2)-HST (100×3,0 мм, 2,5 мкм) | 0,1 % ТФУ в ацетонитриле - 0,1 % ТФУ в воде | Градиентный | 280 | 50 % метиловый спирт, ультразвуковая обработка | Бадан толстолистный, бадан сердцелистный | [111] |
| 6 | Zorbax SB-C18 (250×4,6 мм, 5 мкм) | Метиловый спирт-вода-0,1 М HCl | Изократический | 220 | Подвижная фаза, 25 °С | Голубика | [139] |
| 7 | Altex ultrasphere ODS (250×1,5, 5 мкм) | Метиловый спирт-вода | Изократический | 280 | Вода, 80 °С | Майоран | [93] |
| 8 | C18 (250×4 мм, 5 мкм) | Метиловый спирт-вода | Изократический | 280 | Вода, 100 °С | Земляничное дерево, брукенталия шиловиднолистная, вереск обыкновенный, эрика древовидная, эрика травянистая, <i>Erica herbacea</i> , <i>Erica saxalilis</i> | [246] |
| 9 | Phenomenex Luna C18(2) (250×4,6 мм, 5 мкм) | Ацетонитрил-0,01 М KH_2PO_4 | Градиентный | 280 | 40 % этиловый спирт, 100 °С | Толокнянка обыкновенная | [38] |
| 10 | Phenomenex Luna C18(2) (250×4,6 мм, 5 мкм) | Ацетонитрил-0,01 М KH_2PO_4 | Градиентный | 288 | Вода, 100 °С | Брусника обыкновенная | [39] |
| 11 | C18 (250×4,6 мм, 5 мкм) | Ацетонитрил-0,01 М KH_2PO_4 | Градиентный | 280 | Вода, 100 °С | Брусника обыкновенная, бадан толстолистный | [45] |

Таблица А.3 – Примеры использования ВЭЖХ/УФ для определения антоцианов в ЛРС

| <i>№ п/п</i> | <i>Колонка</i> | <i>Растворители для элюирования</i> | <i>Режим элюирования</i> | <i>Длина волны, нм</i> | <i>Растворитель для экстракции</i> | <i>Анализируемые растения</i> | <i>Литература</i> |
|------------------|---|--|--------------------------|----------------------------|---|---|-------------------|
| 1 | Sun Fire C18 (250×4,6 мм) | 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде, ацетонитрил | Градиентный | 495, 513 | 0,1 % HCl в метаноле | Земляника | [127] |
| 2 | Zorbax Eclipse XDB- C18 (150×4,6 мм, 5 мкм) | 1 % муравьиная кислота в воде, 1 % муравьиная кислота в ацетонитриле | Градиентный | 530 | Этанол 60 % (МВИ) | Голубика | [210] |
| 3 | Agilent C-18 | Метанол:вода:уксусная кислота (14:85:1), ацетонитрил:уксусная кислота (99:1) | Градиентный | 520 | Этанол 92 % | Асаи сухой экстракт | [129] |
| 4 | Kromasil 100 C18 (250×3,0, 5 мкм) | 0,2 % трифторуксусная кислота в воде, 0,2 % трифторуксусная кислота в ацетонитриле | Градиентный | 520 | Смесь растворов метабисульфита натрия и азиды натрия в концентрациях 40 и 50 мг/мл соответственно | Семена красного винограда, экстракт кожуры красного винограда | [237] |
| 5 | Waters Symmetry C- 18 (150×4,6 мм, 3,5 мкм) | 10 % муравьиная кислота в воде, ацетонитрил | Градиентный | 520 | Вода:ацетон (30:70) | Барбарис боливийский | [134] |
| 6 | Spherisorb ODS-2 (250×4,0 мм, 5 мкм) | 10 % муравьиная кислота в воде, метанол | Градиентный | 520 | 1,0 % HCl в метаноле | Виноград культурной | [186] |
| 7 | Kinetex PFP (150×4,6 мм, 5 мкм) | 2 % муравьиная кислота в воде, ацетонитрил | Градиентный | 520 | 1,3 % муравьиной кислоты в метаноле (УЗ) | Голубика высокорослая | [288] |
| 8 | Symmetry C18 (250×4,6 мм, 5 мкм) | Смесь 10 % муравьиной кислоты и 6 % ацетонитрила воде, смесь 10 % муравьиной кислоты и 24 % ацетонитрила воде | Градиентный | 515 | 0,1 % HCl в метаноле | Различные сорта винограда | [22] |
| 9 | Zorbax Eclipse Plus C18 (100×4,5 мм, 3,5 мкм) | 0,1 % трифторуксусная кислота в воде, ацетонитрил | Градиентный | 520 | 0,1 % HCl в этаноле | Ежевика, голубая жимолость, шелковница | [273] |
| 10 | Zorbax Eclipse Plus C18 (100×4,5 мм, 3,5 мкм) | 0,3 моль/л винная кислота в воде, этанол | Градиентный | 520 | Хлорид холина:1,4-бутандиол (1:5) (УЗ) | Дереза русская | [272] |
| 11 | Phenomenex AQUA C18 (150×4,6 мм, 5 мкм) | 0,1 % трифторуксусная кислота в воде, ацетонитрил | Градиентный | 520 | Вода:метанол (80:20) | Экстракт василька синего | [214] |
| 12 | Phenomenex Luna C18 (250×4,6 мм, 5 мкм) | 0,1 % муравьиная кислота в воде, 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле | Градиентный | 210-800 | 0,1 % HCl в метаноле | Угни Молины, Лума остролистная, голубика, Atomyrtus meli, барбарис самшитовидный | [116] |

ПРИЛОЖЕНИЕ Б**Проекты общих фармакопейных статей**

Генеральному директору
ФГБУ «НЦ ЭСМП»
Минздрава России
Олефиру Ю.В.

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам общую фармакопейную статью «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье» для Государственной Фармакопеи XV изд.

Приложение:

1. Проект ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье» на 7 с.
2. Пояснительная записка к проекту ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье» на 36 с.

Директор Центра коллективного
пользования РУДН



Абрамович Р.А.



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути
в лекарственном растительном сырье****Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на альтернативный метод определения кадмия, свинца и мышьяка в субстанциях растительного происхождения, а также ртути.

Методика заключается в кислотном разложении субстанций растительного происхождения в закрытых системах в условиях микроволнового нагрева с последующим определением кадмия, свинца и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ЭТААС). Ртуть определяется методом атомно-абсорбционной спектроскопии в варианте «холодного пара» (ААС-ХП) (метод Полуэктова) в растворах, полученных после кислотного вскрытия растительного материала в закрытых фторопластовых сосудах, помещенных в металлический тубус.

Определение кадмия, свинца и мышьяка

Реактивы:

- вода квалификации «R».
- готовый раствор стандартного образца (ГСО) состава ионов кадмия (концентрация элемента 1000 мг/л) фирмы Merck или аналогичный
- готовый раствор стандартного образца (ГСО) состава ионов свинца (концентрация элемента 1000 мг/л) фирмы Merck или аналогичный
- готовый раствор стандартного образца (ГСО) состава ионов мышьяка (концентрация элемента 1000 мг/л) фирмы Merck или аналогичный

- азотная кислота концентрированная высокой степени чистоты («Trace metal grade») фирмы Fisher Chemical или аналогичного качества

- аскорбиновая кислота квалификации «ОСЧ»

- никель (II) азотнокислый 6-водный квалификации «ХЧ»

Приготовление растворов модификаторов

Раствор аскорбиновой кислоты (1 %)

1 г аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу объемом 100 мл, прибавляют 70 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, объем раствора доводят до метки тем же растворителем.

Раствор $Ni(NO_3)_2$ (1 %)

1,6 г никеля (II) азотнокислого 6-водного помещают в мерную колбу объемом 100 мл, прибавляют 70 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, объем раствора доводят до метки тем же растворителем.

Приготовление стандартных и испытуемого растворов

Стандартный раствор 1

2 мл стандарта кадмия помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация кадмия 20 мкг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 2

1 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация кадмия 200 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 3

500 мкл стандартного раствора 2 помещают в мерную колбу, доводят объем раствора водой до 10 мл, перемешивают (концентрация кадмия 10 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 4

2 мл стандарта свинца помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация свинца 20 мкг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 5

2,5 мл стандартного раствора 4 помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация свинца 500 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 6

2 мл стандарта мышьяка помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация мышьяка 20 мкг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 7

2,5 мл стандартного раствора 6 помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 1 мл азотной кислоты концентрированной, растворяют в воде при перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация мышьяка 500 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 8

1000 мкл стандартного раствора 3, 400 мкл стандартного раствора 5, 800 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора до метки, перемешивают (концентрация кадмия – 1 нг/мл , свинца – 20 нг/мл , мышьяка – 40 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 9

500 мкл стандартного раствора 3, 200 мкл стандартного раствора 5, 400 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 0,5 нг/мл, свинца – 10 нг/мл, мышьяка – 20 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 10

250 мкл стандартного раствора 3, 100 мкл стандартного раствора 5, 200 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10 мл, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 0,25 нг/мл, свинца – 5 нг/мл, мышьяка – 10 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 11

100 мкл стандартного раствора 3, 50 мкл стандартного раствора 5, 100 мкл стандартного раствора 7 помещают в мерную колбу объемом 10, доводят объем раствора до метки водой, перемешивают (концентрация кадмия – 0,1 нг/мл, свинца – 2,5 нг/мл, мышьяка – 5 нг/мл).

Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор

0,30-0,50 г (точная навеска) субстанций растительного происхождения помещают в тефлоновые сосуды, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Сосуды тщательно укупоривают и помещают в МВ-печь. Разложение образцов ведут по программе, представленной в таблице Б.1.

Таблица Б.1 – Программа кислотного разложения образцов субстанций растительного происхождения в условиях микроволнового нагрева

| Этап | Время, мин | Температура, °С |
|------|------------|-----------------|
| 1 | 20 | 25 °С→170 °С |
| 2 | 20 | 170 °С |
| 3 | 50 | 170 °С→25 °С |

Распечатывают сосуды и фильтруют содержимое в колбу объемом 100 мл через фильтровальную бумагу типа «Синяя лента», объем раствора доводят водой до метки. Полученные растворы далее анализируют методом ЭТААС по описанной ниже методике.

Раствор используют свежеприготовленным.

Холостой раствор

В пустой тefлоновый сосуд прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Сосуды тщательно укупоривают и помещают в МВ-печь. Разложение образцов ведут по программе, представленной в таблице 1. Распечатывают сосуды и фильтруют содержимое в колбу объемом 100 мл через фильтровальную бумагу типа «Синяя лента», объем раствора доводят водой до метки. Полученные растворы далее анализируют методом ЭТААС по описанной ниже методике.

Раствор используют свежеприготовленным.

Методика

Определение кадмия, свинца, мышьяка проводят с использованием графитовой печи с пиропокрытием. Условия определения элементов представлены в таблице Б.2.

Таблица Б.2 – Условия определения кадмия, свинца и мышьяка методом ЭТААС в испытуемых растворах, полученных разложением лекарственного растительного сырья в условиях МВ-нагрева

| Элемент | Длина волны, нм | Модификатор | Температурно-временные условия | | | |
|---------|-----------------|-------------|--------------------------------|--------|--------|-------------|
| | | | Номер стадии | T*, °C | t**, с | v***, л/мин |
| Cd | 228,8 | Отсутствует | 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| | | | 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| | | | 4 | 350 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 5 | 350 | 1,0 | 0,3 |
| | | | 6 | 350 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 7 | 1900 | 0,8 | 0,0 |
| | | | 8 | 1900 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 9 | 2000 | 2,0 | 0,3 |

Продолжение таблицы Б.2

| | | | | | | |
|----|-------|------------------------------------|---|------|------|-----|
| Pb | 283,3 | Раствор аскорбиновой кислоты (1 %) | 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| | | | 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| | | | 4 | 400 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 5 | 400 | 1,0 | 0,3 |
| | | | 6 | 400 | 1,0 | 0,0 |
| | | | 7 | 2100 | 0,9 | 0,0 |
| | | | 8 | 2100 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 9 | 2200 | 2,0 | 0,3 |
| As | 193,7 | Раствор Ni ²⁺ (1 %) | 1 | 85 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 2 | 95 | 40,0 | 0,3 |
| | | | 3 | 120 | 10,0 | 0,3 |
| | | | 4 | 1400 | 5,0 | 0,3 |
| | | | 5 | 1400 | 1,0 | 0,3 |
| | | | 6 | 1400 | 1,0 | 0,0 |
| | | | 7 | 2500 | 0,6 | 0,0 |
| | | | 8 | 2500 | 2,0 | 0,0 |
| | | | 9 | 2600 | 2,0 | 0,3 |

* - Температура

** - Время

*** - Расход аргона

Последовательно вводят в графитовую печь атомизатора стандартные растворы 8-11, холостой и испытуемый растворы, а также одновременно растворы модификаторов объемом 10 мкл не менее 3 раз. По полученным калибровочным кривым определяют концентрацию каждого элемента в холостом и испытуемом растворах.

Содержание кадмия, свинца, мышьяка в лекарственном растительном сырье (X, ppb) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot (C - C_{хол})}{m}, \text{ где}$$

C – концентрация элемента в испытуемом растворе, найденная по калибровочной кривой, нг/мл;

C – концентрация элемента в холостом растворе, найденная по калибровочной кривой, нг/мл;

m – масса навески сырья, г.

Определение ртути

Пробоподготовка проводится согласно ГФ IV, Т.1, ОФС.1.5.3.0009.15.

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья помещают во фторопластовый стакан металлического тубуса, смачивают 6 мл смеси серной кислоты концентрированной и азотной кислоты концентрированной в соотношении 1:5. Стакан, закрытый фторопластовой крышкой, помещают в металлический тубус. Металлический тубус закрывают, помещают в сушильный шкаф, нагревают до 100 °С и выдерживают при этой температуре в течение 4 ч, далее его вынимают, охлаждают, вскрывают и количественно переносят содержимое фторопластового стакана в мерную колбу вместимостью 200 или 250 мл, и проводят определение ртути методом ААС в варианте «холодного пара» (метод Полуэктова) согласно методике, прописанной в инструкции к прибору.

Содержание ртути в лекарственном растительном сырье (X, ppb) рассчитывают по формуле аналогичной формуле при определении кадмия, свинца и мышьяка.

И.О. Генерального директора
ФГБУ «НЦ ЭСМП»
Минздрава России
Косенко В.В.

Глубокоуважаемая Валентина Владимировна!

Направляем Вам общую фармакопейную статью «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом» для Государственной Фармакопеи следующего издания.

Приложение:

1. Проект ОФС «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом» на 7 с.
2. Пояснительная записка к проекту ОФС «Определение суммы восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом» на 16 с.

Директор Центра коллективного
пользования РУДН



Абрамович Р.А.

09.08.2021



ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение суммы восстанавливающих сахаров
спектрофотометрическим методом**

Проект ОФС

Для определения сахаров используют спектрофотометрический метод. Его проводят, осуществляя измерение оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с антроновым, орциновым, феноловым реактивами и пикриновой кислотой.

Метод определения с антроновым реактивом

Метод основан на расщеплении сложных углеводов до моносахаридов в сильноокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием гидроксиметилфурфузола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Интенсивность образовавшейся окраски прямо пропорциональна содержанию сахаров в реакционной среде.

Пропорциональная зависимость интенсивности окраски от содержания сахаров в испытуемом растворе соблюдается в области концентраций моносахаридов 0,02-0,10 мг/мл. Пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаридов до моносахаридов должны быть прописаны в фармакопейной статье. При анализе лекарственного растительного сырья такие параметры как: измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, температура и время экстракции – должны быть прописаны в частных статьях на лекарственное растительное сырье.

Методика. В пробирку помещают 3,0 мл раствора испытуемого препарата (пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаридов до моносахаридов должны быть описаны в фармакопейной статье), охлаждают на бане со льдом до 0 °С, осторожно при охлаждении приливают 6,0 мл 0,2 %

антронового реактива, перемешивают и немедленно нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 – 10 мин (точное время должно быть указано в фармакопейной статье), охлаждают и измеряют оптические плотности испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. В охлажденную на бане со льдом пробирку с 3,0 мл воды приливают 6,0 мл 0,2 % антронового реактива. Далее проводят анализ аналогично раствору испытуемого препарата.

Приготовление стандартного раствора. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г стандартного образца глюкозы, растворяют в воде или насыщенном растворе бензойной кислоты в воде, доводят этим же раствором до метки и перемешивают. Отбирают 2,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит 0,02 мг/мл глюкозы. Далее проводят анализ аналогично раствору испытуемого препарата.

Вместо использования одного стандартного раствора, если указано в фармакопейной статье, строят калибровочный график, используя разведенные растворы стандартного образца глюкозы с концентрацией от 0,01 до 0,05 мг/мл.

Калибровочный график строят при каждом анализе.

Содержание сахаров в 1 мл раствора испытуемого препарата находят по калибровочной кривой зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания стандартного образца глюкозы в 1 мл растворителя.

При анализе декстранов учитывают, что 1 г глюкозы соответствует 0,94 г декстранов.

Примечание. Приготовление 0,2 % антронового реактива. 0,20 г антрона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют серную кислоту, свободную от азота, или смесь серная кислота, свободная от азота, - вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в темное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч.

Срок годности при хранении в темном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

При использовании антронового реактива для анализа глюкозы или декстранов проводят определение чувствительности реактива к глюкозе.

Осторожно прибавляют 6 мл антронового реактива (в смеси серная кислота, свободная от азота, - вода, 19:1) к 3 мл раствора D – глюкозы (5 мкг/мл), нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Раствор, содержащий глюкозу, должен быть темнее раствора сравнения без глюкозы. Раствор сравнения темно-зеленого цвета.

Метод определения с феноловым реактивом

Метод основан на цветной реакции моносахаридов с фенолом в среде концентрированной серной кислоты (в случае полисахаридов – методика гидролиза должна быть описана в соответствующей фармакопейной статье). В присутствии серной кислоты моносахариды подвергаются дегидратации, что приводит к образованию гидроксиметилфурфузола, который далее реагирует с фенолом, давая краситель оранжево-розового цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию сахаров в реакционной среде.

Пропорциональная зависимость интенсивности окраски от содержания сахаров в испытуемом растворе соблюдается в области концентраций моносахаридов 0,01-0,10 мг/мл. Пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаридов до моносахаридов должны быть прописаны в фармакопейной статье. При анализе лекарственного растительного сырья такие параметры как: измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, температура и время экстракции – должны быть прописаны в частных статьях на лекарственное растительное сырье.

Методика. Для определения используют три пробирки вместимостью 15 мл. В первую пробирку прибавляют 1 мл испытуемого раствора, во вторую – 1 мл стандартного раствора, а в третью – 1 мл раствора сравнения, в каждую пробирку последовательно прибавляют по 1 мл раствора фенола 5 %, по 5 мл кислоты серной концентрированной. Все три пробирки с содержимым перемешивают, охлаждают под струей холодной воды и выдерживают при комнатной температуре в течение

30 мин. Оптическую плотность полученных растворов первой и второй пробирок измеряют на спектрофотометре при длине волны 487 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве раствора сравнения используют содержимое третьей пробирки.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Приготовление стандартного раствора. Около 0,1 г (точная навеска) глюкозы или фруктозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 60 мл воды очищенной, перемешивают до растворения, объем раствора доводят до метки тем же растворителем.

Раствор используют свежеприготовленным.

Вместо использования одного стандартного раствора, если указано в фармакопейной статье, строят калибровочный график, используя разведенные растворы стандартного образца глюкозы или фруктозы с концентрацией от 0,01 до 0,10 мг/мл.

Калибровочный график строят при каждом анализе.

Примечание. Приготовление раствора фенола 5,0 %. Около 5,0 г (точная навеска) кристаллического фенола помещают в термостойкий стакан и подогревают до расплавления кристаллов. К полученной жидкости прибавляют 80 мл воды очищенной, перемешивают до растворения, охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Доводят объем раствора в колбе водой очищенной до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Метод определения с пикриновой кислотой

Метод основан на цветной реакции моносахаридов с пикриновой кислотой, протекающей с образованием пикраминовой кислоты в результате восстановления сахаром группы NO_2 до NH_2 . Интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна количеству определяемого сахара (0,1 – 0,8 мг/мл) в испытуемом растворе препарата. Пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаридов до моносахаридов должны быть прописаны в фармакопейной

статье. При анализе лекарственного растительного сырья такие параметры как: измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, температура и время экстракции – должны быть прописаны в частных статьях на лекарственное растительное сырье.

Методика. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 3,0 мл натрия карбоната раствора 20 % и 1 – 5 мл раствора испытуемого образца (точное количество должно быть указано в фармакопейной статье). Колбу погружают на 10 мин на кипящую водяную баню, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца глюкозы на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны, указанной в фармакопейной статье (в области от 440 до 460 нм), в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) глюкозы, предварительно высушенной при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

1 мл раствора стандартного образца содержит около 0,2 мг глюкозы.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

2. Приготовление пикриновой кислоты раствора 1 %. 1 г кислоты пикриновой помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 90 мл воды на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора при хранении в склянках с притертой пробкой в защищенном от света месте 1 мес.

Метод определения с орциновым реактивом

При нагревании пентоз (или их фосфорных производных) в присутствии кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол; в присутствии орцина и железа (III) хлорида при этом развивается зеленое окрашивание.

Чувствительность метода определения значительно выше с рибозой, чем с дезоксирибозой и гексозами. Пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаридов до моносахаридов должны быть прописаны в фармакопейной статье. При анализе лекарственного растительного сырья такие параметры как: измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, температура и время экстракции – должны быть прописаны в частных статьях на лекарственное растительное сырье.

В пробирку помещают 2,0 мл разведенного в воде препарата с содержанием рибозы около 2,5 – 25,0 мкг/мл, прибавляют 2,0 мл железа (III) хлорида раствора 0,05% в хлористоводородной кислоте концентрированной, смесь встряхивают, прибавляют 0,2 мл орцина раствора 10% в этаноле. Пробирку со смесью помещают в кипящую водяную баню на 20 мин, затем охлаждают в ледяной воде. По достижении комнатной температуры измеряют оптическую плотность раствора испытуемого образца препарате на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Содержание сахаров (пентоз) в 1 мл испытуемого раствора препарата находят по калибровочной кривой зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания рибозы в мкг/мл воды.

Построение калибровочного графика. Перед определением разводят стандартный раствор рибозы в 10 раз водой (рабочий раствор). В 6 пробирок вносят 0,10, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 и 1,0 мл рабочего раствора, в каждую пробирку

прибавляют воду до 2,0 мл и далее проводят те же операции, что и с испытуемым раствором.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца рибозы. 25,0 мг стандартного образца рибозы (с содержанием не менее 99,0 %) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление железа (III) хлорида раствора 0,05 %. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,05 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, растворяют в хлористоводородной кислоте концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

3. Приготовление орцина раствора 10 % в этаноле. 10,0 г орцина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в этаноле, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным и защищают от света.

Генеральному директору
ФГБУ «НЦ ЭСМП»
Минздрава России
Олефиру Ю.В.

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам общую фармакопейную статью «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения» для Государственной Фармакопеи XIV изд.

Приложение:

1. Проект ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения» на 6 с.
2. Пояснительная записка к проекту ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения» на 24 с.

Директор Центра коллективного
пользования РУДН



ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение арбутина в субстанциях
растительного происхождения
методом ВЭЖХ****Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на альтернативный метод определения арбутина к общепринятому спектрофотометрическому методу определения арбутина в субстанциях растительного происхождения (листья толокнянки, листья брусники, корневища бадана).

Методика заключается в извлечении действующих веществ водно-спиртовыми смесями из субстанций растительного происхождения при нагревании последующим определении арбутина методом ВЭЖХ, оснащенный ультрафиолетовым (УФ) или диодно-матричным (ДМ) детектором.

Определение основных групп биологически активных веществ

Время удерживания пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО арбутина (см. раздел «Количественное определение»).

Количественное определение***Приготовление растворов***

0,063 %-ный раствор аммония формиата:

Около 630 мг (точная навеска) аммония формиата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды очищенной, перемешивают. Объем раствора до метки доводят тем же растворителем.

Стандартный раствор. Около 0,1 г (точная навеска) стандартного образца арбутина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 40 %, доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают. Концентрация раствора – 1000 мкг/мл (раствор А).

Раствор А используют свежеприготовленным.

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем раствора доводят до метки спиртом 40 %, перемешивают. Концентрация раствора – 100 мкг/мл (раствор Б).

Раствор Б используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 110 мл экстрагента (для листьев толокнянки и корневищ бадана – спирт 40 %, для листьев брусники – вода) и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 250 мл. Объем полученного извлечения доводят соответствующим экстрагентом до метки и перемешивают. 10 мл полученного извлечения фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор А).

Раствор А используют свежеприготовленным.

2 мл (раствора А) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки спиртом 40 %, перемешивают (раствор Б).

Раствор Б используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия:

| | |
|---------------------|---|
| Колонка | 250x4,6 мм, эндкепированный октадецилсилил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин; |
| Детектор | УФ или ДМ, 280 нм; |

| | | | |
|---------------------------|--|---------|-------|
| Объем аликвоты | 10 мкл | | |
| Подвижная фаза | ПФ А: 0,063 % раствор аммония формиата; ПФ Б: ацетонитрил; | | |
| Режим хроматографирования | Время, мин | ПФ А, % | ПФ, Б |
| | 0,00 | 90 | 10 |
| | 3,00 | 90 | 10 |
| | 10,00 | 10 | 90 |
| | 15,01 | 10 | 90 |
| | 15,10 | 90 | 10 |
| | 20.00 | 90 | 10 |
| Время хроматографирования | 20 мин. | | |

Время удерживания пика арбутина *около 6 мин.*

Регистрируют хроматограммы испытуемого и стандартного растворов.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверка пригодности хроматографической системы (ППХС)

Хроматографируют стандартный раствор арбутина не менее 5 раз.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику арбутина *не менее 3000 теоретических тарелок*;
- фактор асимметрии пика арбутина *не менее 0,8 и не более 1,5*;
- относительное стандартное отклонение площади пика арбутина *не более 4 %*, времени удерживания *не более 2 %*.

Методика

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы.

Содержание арбутина ($C_{12}H_{16}O_7$) в субстанциях растительного происхождения, в процентах (X , %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot 250 \cdot 10 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 10 \cdot (100 - W) \cdot 100} \cdot 100 \% = \frac{S \cdot a_0 \cdot 125 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 100} \cdot 100 \%,$$

где:

S – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика арбутина на хроматограмме стандартного раствора;

a – навеска субстанции растительного происхождения, г;

a_0 – навеска стандартного образца арбутина, г;

P – содержание основного вещества в СО арбутина, %;

W – влажность сырья, %.

Хроматограммы стандартного и испытуемого растворов приведены на рисунках Б.1-Б.4.

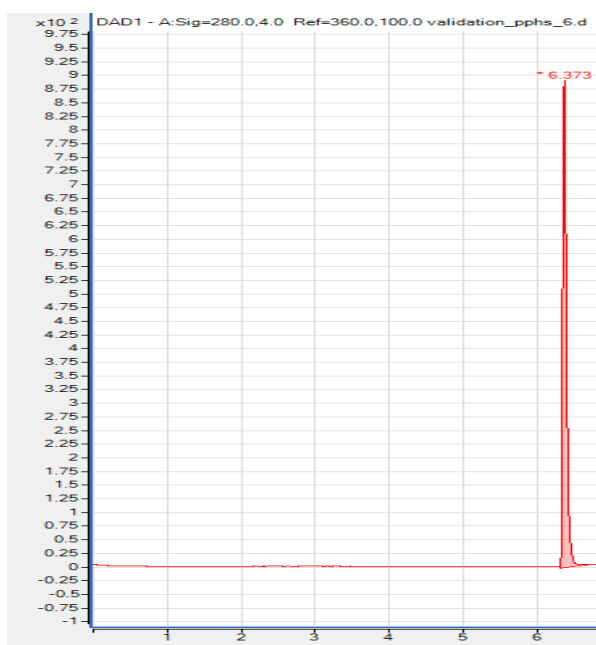


Рисунок Б.1 – Хроматограмма стандартного раствора при $\lambda=280$ нм

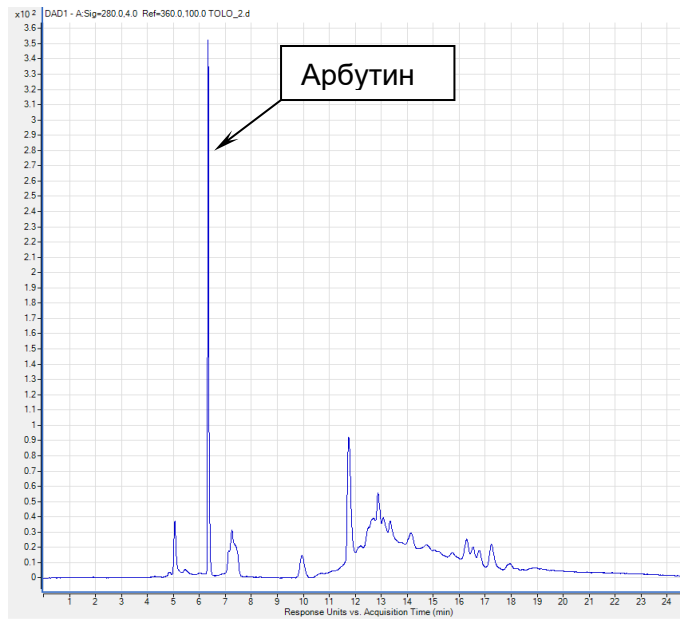


Рисунок Б.2 – Хроматограмма испытуемого раствора (листья толокнянки)
при $\lambda=280$ нм

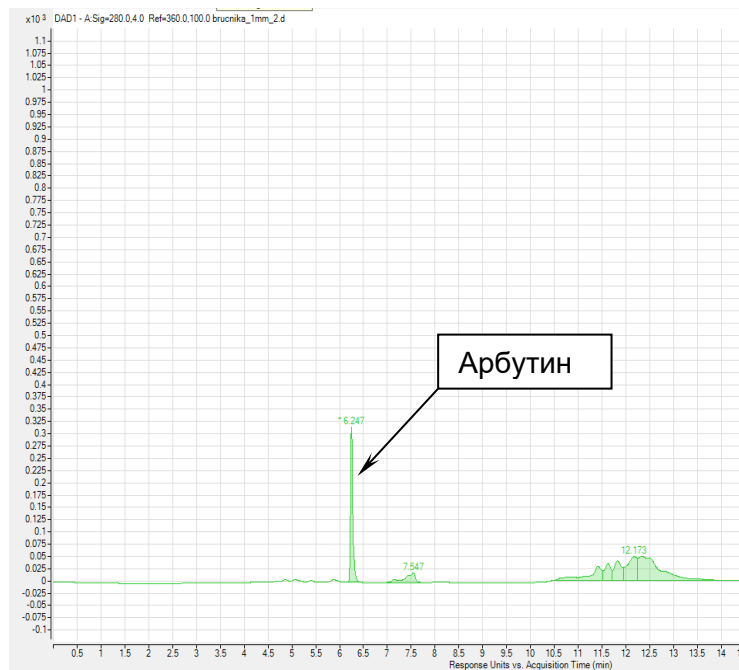


Рисунок Б.3 – Хроматограмма испытуемого раствора (листья брусники) при
 $\lambda=280$ нм

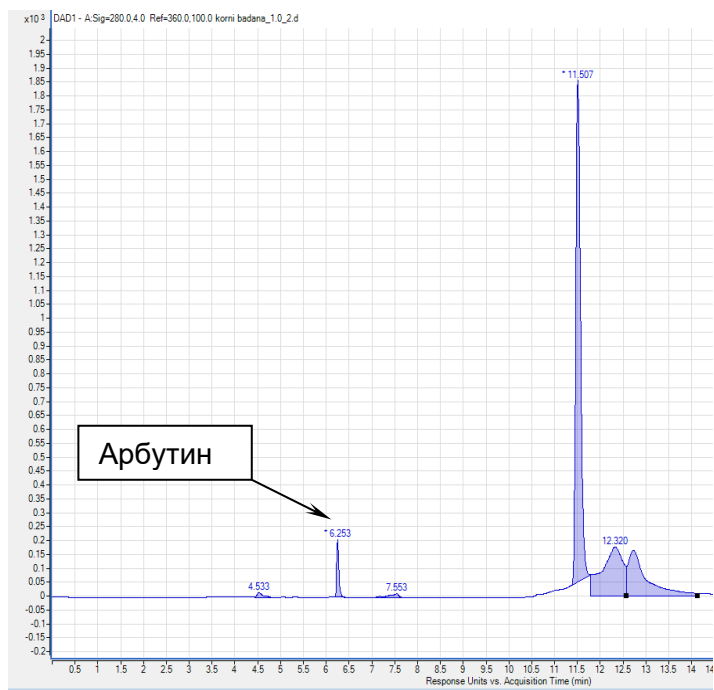


Рисунок Б.4 – Хроматограмма испытуемого раствора (корневища бадана)
при $\lambda=280$ нм

**Бадана толстолистного
корневища**

Изменение к ФС.2.5.0004.15

Настоящее дополнение распространяется на количественное определение действующих веществ в корневищах бадана. Для повышения качества сырья предлагается ввести количественное определение арбутина с использованием унифицированной ВЭЖХ-методики (см. проект ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ») помимо уже существующей в ФС.2.5.0004.15 методики определения дубильных веществ в пересчете на таннин.

Определение основных групп биологически активных веществ

Арбутин

Время удерживания пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО арбутина (см. раздел «Количественное определение»).

Количественное определение

Арбутин

Цельное сырье, измельченное сырье: арбутина – не менее 2,0 %.

Условия определения арбутина приведены в проекте ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ». Методика заключается в извлечении арбутина спиртом 40 % из корневищ бадана при нагревании с последующим определении арбутина методом ВЭЖХ, оснащенным ультрафиолетовым (УФ) или диодно-матричным (ДМ) детектором.

И.О. Генерального директора
ФГБУ «НЦ ЭСМП»
Минздрава России
Косенко В.В.

Глубокоуважаемая Валентина Владимировна!

Направляем Вам общую фармакопейную статью «Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ» для Государственной Фармакопеи следующего издания.

Приложение:

1. Проект ОФС «Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ» на 7 с.
2. Пояснительная записка к проекту ОФС «Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ» на 19 с.

Директор Центра коллективного
пользования РУДН



Абрамович Р.А.

09.08.2021



ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Количественное определение суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ**Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на альтернативную методику определения антоцианов к общепринятым спектрофотометрическим методикам определения суммы антоцианов в субстанциях растительного происхождения (черники обыкновенной плоды, аронии черноплодной плоды сухие, василька синего цветки).

Методика заключается в извлечении действующих веществ водно-спиртовыми смесями из субстанций растительного происхождения в условиях, рекомендованных ГФ XIV, и последующим определении суммы антоцианов методом ВЭЖХ, оснащенный ультрафиолетовым (УФ) или диодно-матричным (ДМ) детектором.

Количественное определение***Приготовление растворов******Подвижная фаза А***

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 мл муравьиной кислоты. Объем раствора доводят водой до метки, перемешивают.

Подвижная фаза В

В стакане смешивают 100 мл муравьиной кислоты, 400 мл воды, 500 мл ацетонитрила.

Стандартный раствор

Около 2,5 мг (точная навеска) стандартного образца цианидин-3-глюкозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в метаноле при

перемешивании, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (концентрация цианидин-3-глюкозида *около 0,1 мг/мл*).

Раствор хранят в холодильнике при температуре не выше +2 °С.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация цианидин-3-глюкозида *около 0,01 мкг/мл*).

Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор (черники обыкновенной плоды)

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, но не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, добавляют 50 мл спирта 60 %, содержащего хлористоводородной кислоты 1 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до ±0,01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 60 минут, затем охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент спиртом 60 %, содержащим хлористоводородной кислоты 1 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

Испытуемый раствор (аронии черноплодной плоды сухие)

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего 1 % хлористоводородной кислоты концентрированной. Экстракцию проводят при нагревании на водяной бане в течение 30 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой во флакон темного стекла.

Испытуемый раствор (василька синего цветки)

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Около 0,3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты 1 %, выдерживают на водяной бане при температуре 40-45 °С в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл. Вату с сырьем помещают в коническую колбу, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты 1 %, предварительно смывая частицы сырья с воронки в колбу, и повторяют экстракцию в указанных выше условиях. Затем содержимое колбы фильтруют через вату в ту же мерную колбу. Сырье на фильтре промывают 40 мл хлористоводородной кислоты 1 %. После охлаждения содержимое колбы доводят хлористоводородной кислотой 1 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 мл, отбрасывая первые 10 мл.

Перед определением антоцианов 1 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят водой до метки. Перед помещением в вials полученный раствор пропускают через гидрофобный политетрафторэтиленовый мембранный фильтр ETI Syringe с размером пор 0,45 мкм и диаметром 13 мм.

Хроматографические условия:

| | | |
|---------------------|---|---|
| Колонка | : | Zorbax SB-Phenyl C18, 5μ, 250×4,6 мм; |
| Температура колонки | : | 40 °С; |
| Скорость потока | : | 1 мл/мин; |
| Детектор | : | УФ или ДМ, 530 нм; |
| Объем аликвоты | : | 20 – 50 мкл; |
| Подвижная фаза А | : | 10% раствор муравьиной кислоты; |
| Подвижная фаза В | : | муравьиная кислота:вода:ацетонитрил (10:40:50) |

| Градиент | : | Время, мин | ПФ А, % | ПФ В, % |
|----------|---|---------------|---------|---------|
| | | 0,00 | 88 | 12 |
| | | 1,00 | 88 | 12 |
| | | 26,00 | 70 | 30 |
| | | 35,00 | 0 | 100 |
| | | 38,00 | 0 | 100 |
| | | 43,00 | 88 | 12 |
| | | 50,00 | 88 | 12 |

Время хроматографирования 50 мин.

Время удерживания пика цианидин-3-глюкозида *около 13 мин.*

Регистрируют хроматограммы испытуемого и стандартного растворов.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка ППХС».

Проверка ППХС

Хроматографируют стандартный раствор цианидин-3-глюкозида не менее 5 раз.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цианидин-3-глюкозида *не менее 3000 теоретических тарелок*;
- фактор асимметрии пика цианидин-3-глюкозида *не менее 0,8 и не более 1,5*;
- относительное стандартное отклонение площади пика цианидин-3-глюкозида *не более 4 %*, времени удерживания *не более 2 %*.

Методика

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид в чернике обыкновенной плодах, аронии черноплодной плодах сухих, василька синего цветках в процентах (X, %) рассчитывают по формулам:

- для черники обыкновенной плодов

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot 200 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

- для аронии черноплодной плодов сухих

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 30 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot 120 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

- для василька синего цветков

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 250 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100 = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1000 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где:

S – сумма площадей всех пиков антоцианов на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика цианидин-3-глюкозида на хроматограммах стандартного раствора;

a_0 – навеска стандартного образца цианидин-3-глюкозида, г;

a – навеска сырья, г;

P – содержание основного вещества в стандартном образце цианидин-3-глюкозида, %;

W – влажность сырья, %;

Хроматограммы стандартного и испытуемых растворов приведены на рисунках Б.5-Б.8.

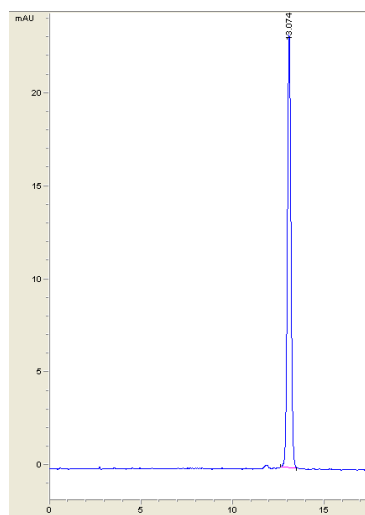


Рисунок Б.5 – Хроматограмма стандартного раствора

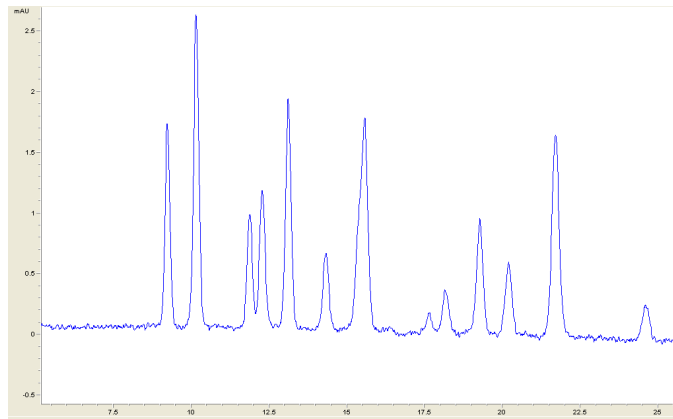


Рисунок Б.6 – Хроматограмма испытуемого раствора (черники обыкновенной плоды)

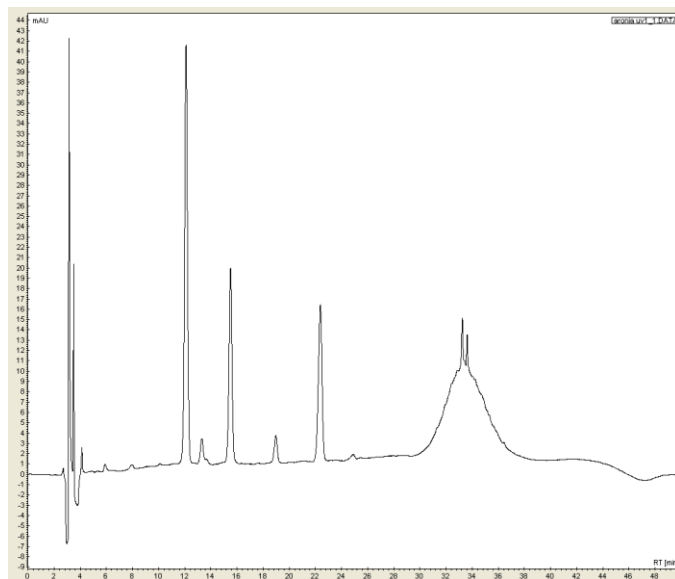


Рисунок Б.7 – Хроматограмма испытуемого раствора (аронии черноплодной плоды сухие)

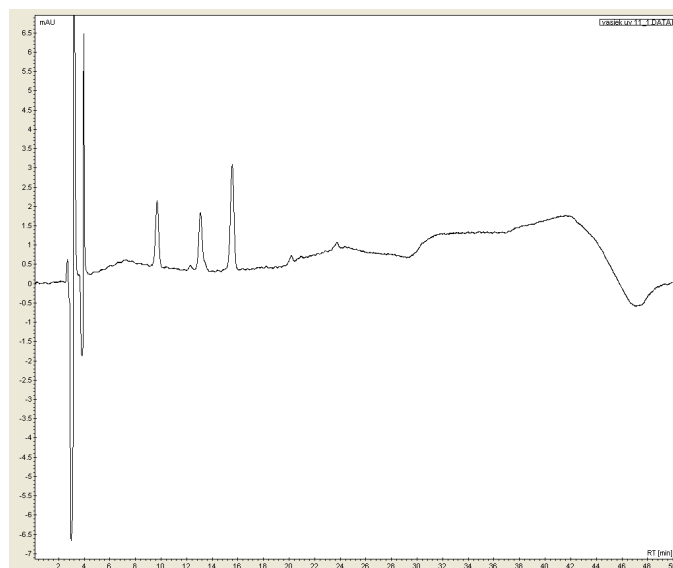


Рисунок Б.8 – Хроматограмма испытуемого раствора (василька синего цветки)

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акты внедрения

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«Фармцентр ВИЛАР»**

Юр. адрес: 123458, г. Москва, ул. Маршала Прошлякова д.30, оф.206 Факт. адрес: 117216, г. Москва, ул. Грина д.7

тел. (499) 519-30-88

факс (495) 388-33-09

www.vilar-plant.ru

5193088@mail.ru

от 16.08.2021 исх.№ _____

АКТ


о внедрении результатов диссертационного исследования

Никулина Александра Владимировича

Результаты диссертационной работы «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии» внедрены в практику деятельности организации Фармцентр ВИЛАР. В частности, внедрена унифицированная ЭТААС методика определения кадмия, свинца и мышьяка в лекарственном растительном сырье.

Зам. генерального директора



 А.В. Рогов



АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «Фармцентр ВИЛАР»

Юр. адрес: 123458, г. Москва, ул. Маршала Прошлякова д.30, оф.206 Факт. адрес: 117216, г. Москва, ул. Грина, д.7

тел. (499) 519-30-88

факс (495) 388-33-09

www.vilar-plant.ru

5193088@mail.ru

от 16.08.2024 исх. № _____

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования

Никулина Александра Владимировича

Результаты диссертационной работы «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии» внедрены в практику деятельности организации Фармцентр ВИЛАР. В частности, внедрена унифицированная ВЭЖХ методика определения антоцианов в лекарственном растительном сырье.

Зам. генерального директора

 А.В. Рогов





**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»
Испытательный центр**

Аттестат аккредитации № RA.RU.21ФМ42 выдан 28 сентября 2015 г
117216 г. Москва, ул. Грина, д.7. Тел. 8 (495) 388-45-66

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования

Никулина Александра Владимировича

Наименование: спектрофотометрическая методика определения кремния (в пересчете на SiO₂) в траве хвоща полевого.

Авторы внедрения: Никулин А.В., Потанина О.Г.

Место разработки: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр).

Источник информации: материалы докторской диссертации Никулина А.В. «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии»

Место внедрения: Испытательный центр ФГБНУ ВИЛАР.

Форма внедрения: используется с июня 2021 года в работе Испытательного центра ФГБНУ ВИЛАР при количественном определении кремния в траве хвоща полевого.

Эффективность внедрения: Указанная методика позволяет определять кремний (в пересчете на SiO₂) в траве хвоща полевого спектрофотометрическим методом. Методика является валидированной.

Руководитель Испытательного
центра



(Подпись)

Сайбель О.Л.
(Ф.И.О.)



**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»
Испытательный центр**

Аттестат аккредитации № RA.RU.21ФМ42 выдан 28 сентября 2015 г
117216 г. Москва, ул. Грина, д.7. Тел. 8 (495) 388-45-66

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования

Никулина Александра Владимировича

Наименование: унифицированная ВЭЖХ методика определения арбутина в лекарственном растительном сырье.

Авторы внедрения: Никулин А.В., Потанина О.Г.

Место разработки: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр).

Источник информации: материалы докторской диссертации Никулина А.В. «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии»

Место внедрения: Испытательный центр ФГБНУ ВИЛАР.

Форма внедрения: используется с июня 2021 года в работе Испытательного центра ФГБНУ ВИЛАР при фитохимическом анализе сырья, содержащего арбутин.

Эффективность внедрения: Указанная методика позволяет определять арбутин в лекарственном растительном сырье различных морфологических групп методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым или диодно-матричным детектором. Методика является валидированной.

Руководитель Испытательного
центра



(Подпись)

Сайбель О.Л.
(ФИО)



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»
Испытательный центр

Аттестат аккредитации № RA.RU.21ФМ42 выдан 28 сентября 2015 г.
117216 г. Москва, ул. Грина, д.7. Тел. 8 (495) 388-45-66

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования
Никулина Александра Владимировича

Наименование: унифицированная спектрофотометрическая методика определения суммы сахаров и полисахаридов в лекарственном растительном сырье (на основе фенол-серноокислого метода).

Авторы внедрения: Никулин А.В., Потанина О.Г.

Место разработки: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр).

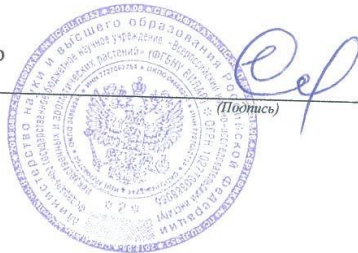
Источник информации: материалы докторской диссертации Никулина А.В. «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии»

Место внедрения: Испытательный центр ФГБНУ ВИЛАР.

Форма внедрения: используется с июня 2021 года в работе Испытательного центра ФГБНУ ВИЛАР при количественном определении сахаров в лекарственном растительном сырье.

Эффективность внедрения: Указанная методика позволяет определять сумму сахаров и полисахаридов (в пересчете на глюкозу или фруктозу) спектрофотометрическим методом (на основе метода М. Dubois) в лекарственном растительном сырье различных морфологических групп. Методика является валидированной.

Руководитель Испытательного
центра



Сайбель О.Л.
(ФИО)



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ» (РУДН)

«ЦЕНТР КОЛЛЕКТИВНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ
(НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР)»

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2
Тел./факс +7 (495) 787 38 03, доб. 20-95, 21-17
<http://ccp.rudn.ru>

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования

Никулина Александра Владимировича

Наименование: унифицированная AES-ICP методика определения элементов в лекарственном растительном сырье.

Авторы внедрения: Никулин А.В., Потанина О.Г.

Место разработки: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр).

Источник информации:

Никулин А.В. Комбинированная методика определения элементного состава лекарственного растительного сырья / А.В. Никулин, Е.А. Платонов, О.Г. Потанина // Фармация. – 2016. – Т. 65, № 2. – С. 22-25.

Место внедрения: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр), г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2.

Форма внедрения: используется с мая 2021 года в химико-аналитических исследованиях ЦКП (НОЦ) РУДН.

Эффективность внедрения: Усовершенствование анализа субстанций природного происхождения. Показана эффективность разработанной методики для количественного определения элементов (на уровне ppm и выше) в субстанциях природного происхождения

Директор ЦКП (НОЦ) РУДН

д. фарм. н.

Дата 12.05.2021



Р.А. Абрамович

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
**Федеральное государственное
 автономное образовательное
 учреждение высшего образования
 «Северо-Восточный
 федеральный университет
 имени М.К. Аммосова»
 (СВФУ)**

Белинского ул., д.58, г. Якутск
 Республика Саха (Якутия), 677000
 Тел. (4112) 35-20-90
 Факс (4112) 32-13-14
 E-mail: rector@s-vfu.ru
 http://www.s-vfu.ru

На № 14.05.21 № 06-238
 от _____

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования

Никулина Александра Владимировича

Результаты диссертационной работы «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии» внедрены в учебный процесс Медицинского института при изучении студентами отделения «Фармация» дисциплин «Фармакогнозия», «Фармацевтическая химия», «Использование биологически активных веществ растительного происхождения в фармации».

Проректор по образовательной
 деятельности
 14.05.2021 г.

  Голиков А. И.



ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
- ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11
ОКПО 01962942 ИНН/КПП 3444048472/263243001 тел. (8793) 32-44-74, 32-92-66, факс 32-92-67

26» 05 2021 г. № 02/3/1162
на № _____ от _____

«УТВЕРЖАЮ»

Заместитель директора Пятигорского
медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава
России по научной работе

Д.А. Коновалов
_____ Коновалов Д.А.
_____ 2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Название предложения для внедрения: Фрагмент диссертации Никулина А.В.: «Совершенствование стандартизации субстанций природного происхождения на основе современных инструментальных методов аналитической химии и теоретических методов квантовой химии».

2. Учреждение, его адрес, исполнители: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Российский Университет Дружбы Народов, Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр), г. Москва (Российская Федерация), ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2, д.фарм.н., Потанина О.Г., к.хим.н., Никулин А.В.

3. Источники информации:

- Nikulin A.V. Development and validation of the quantitative determination procedure of iodine in the iodides form in the kelp thallus by the ionometry method / A.V. Nikulin, O.G. Potanina, M.V. Okuneva, R.A. Abramovich, D.O. Bokov, O.A. Smyslova // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2020. – Vol.12, Issue 3. – P.277-283.

4. Внедрено: в лекционный курс и учебный процесс кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России при изучении дисциплин: «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия» - методика определения йода в форме йодидов в слоевищах ламинарии.

5. Срок внедрения: апрель-май 2021 года.

6. Эффективность внедрения: Усовершенствование учебного процесса, в частности, использование современных инструментальных методов анализа для определения йодидов в слоевищах ламинарии с целью более глубокого научного исследования данного вида лекарственного растительного сырья.

| Показатели | По данным | |
|---|---------------|------------------------------|
| | разработчиков | учреждение, которое внедряет |
| Использование разработки показало, что эффективность внедрения отвечает критериям, приведенным в источниках информации. Результаты научных исследований используются студентами, магистрами и аспирантами на кафедре фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов.. | | |

Ответственный за внедрение:

Заведующий кафедрой фармакогнозии, ботаники
и технологии фитопрепаратов, доктор фармнаук, профессор

Д.А. Коновалов
_____ Д.А. Коновалов

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Дополнительная литература

1. Дул, В.Н. Фармакогностическое изучение и стандартизация винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) листьев красных и сухого экстракта на их основе: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Дул Вячеслав Николаевич. – М., 2014. 118 с.
2. Марахова, А.Н. Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе: дис. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Марахова Анна Игоревна. – Самара, 2017. 313 с.
3. Неудачина, Л.К. Аналитическая химия. Комплекс методического обеспечения / Л.К. Неудачина, Е.С. Буянова, С.А. Штин [и др.]. – Екатеринбург: УФУ, 2011. – 159 с.
4. Никифорова, М.В. Разработка системы контроля качества лекарственных средств, произведенных с использованием автоматизированной микрофлюидной системы: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02. / Никифорова Марина Владимировна. – М., 2020. 152 с.
5. Раменская, Г.В. Контроль качества и стандартизация лекарственных средств: учебно-методическое пособие по производственной практике / под ред. Г.В. Раменской, С.К. Ордабаевой – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 352 с.
6. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии: практикум / под ред. Г.В. Раменской. – 3-е изд – М.: Лаборатория знаний, 2021. – 355 с.
7. Теслев А.А. Разработка составов и технологий препаратов на основе 4-(3-оксо-3-этоксипропанамидо)бензойной кислоты, обладающих антиоксидантным и антиишемическим действием: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01 / Теслев Андрей Александрович. – С.-Петербург, 2016. 225 с.
8. Обидченко Ю.А. Разработка инновационной трансбуккальной лекарственной формы на основе пептидов российского производства: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01 / Обидченко Юлия Анатольевна. – М., 2015. 159 с.
9. Харлампович Т.А. Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Харлампович Татьяна Анатольевна. – Пермь, 2015. 197 с.
10. Nikulin A.V. Development and validation of a spectrophotometric procedure for determining silicon in common horsetail (*Equisetum arvense* L.) herb / A.V. Nikulin, O.G. Potanina, E.A. Platonov, D.O. Bokov, O.A. Smyslova, R.A. Abramovich // *Pharmacognosy Journal*. – 2019. – Vol.11, Issue 5. – P.1124–1131.