

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

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук**

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук

Потанина Ольга Георгиевна

Официальные оппоненты:

Дайронас Жанна Владимировна, доктор фармацевтических наук, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов, профессор кафедры

Киселева Татьяна Леонидовна, доктор фармацевтических наук, профессор, Некоммерческая организация «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов», директор Научно-исследовательского центра – президент Некоммерческой организации «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов»

Лякина Марина Николаевна, доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, заместитель директора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Защита диссертации состоится «15» июня 2022 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

И. о. ученого секретаря
диссертационного совета ДСУ 208.002.01,
доктор фармацевтических наук, профессор

Селиванова Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 рапунтикума 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 спектрометрии 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 достижения поставленной цели необходимо было 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 спектроскопии 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 антоциансодержащих 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 антоцианосодержащего 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 для 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 деталями (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, свидетельствует 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; объединенном 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 конференции «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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

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 зимолобки, 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).

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).

Для выполнения квантово-химических исследований применяли программный пакет Gaussian 09. Визуализацию расчетов осуществляли с помощью редактора GaussView 5.0.8.

Результаты исследования

Изучение и выбор оптимальных условий для разработки унифицированных методик количественного определения элементов методом АЭС-ИПС и ЭТААС

Изучение и выбор оптимальных условий кислотного разложения образцов ЛРС в условиях МВ-нагрева 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 использовали метод добавок. Добавки вводили в раствор таким образом, чтобы после переведения полученного в результате

разложения раствора в мерную колбу концентрация мышьяка находилась на нанограммовом

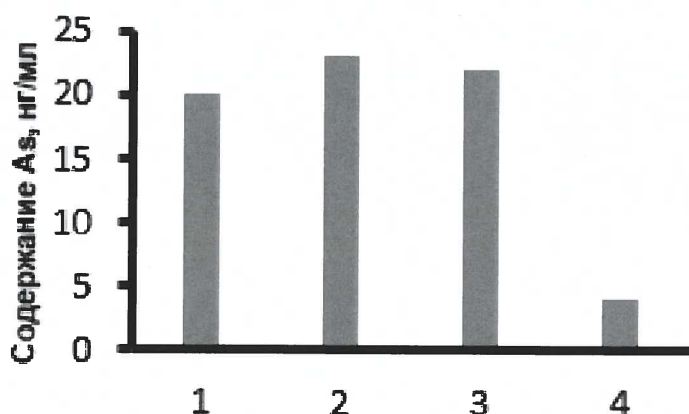


Рисунок 1 – Содержание As в испытуемых растворах, полученных при разных температурах кислотного разложения в условиях МВ-нагрева (1 – 25 °С, 2 – 150 °С, 3 – 170 °С, 4 – 200 °С)

уровне. В качестве анализируемого объекта были выбраны плоды шиповника, так как предварительным анализом было установлено отсутствие мышьяка в данном объекте. Основным варьируемым параметром была температура, поскольку в МВ-условиях она оказывает наибольшее влияние на качество разложения органической матрицы. Было установлено, что наиболее оптимальным оказался диапазон температур 150-170 °С, при

котором достигается не только разложение исследуемого материала, но и не наблюдается потерь мышьяка (рис. 1). При температурах ниже 150 °С происходит неполное разложения органической матрицы. В результате проведенных исследований были выбраны «мягкие» (в отличие от условий, рекомендованных в ГФ XIV) условия пробоподготовки, позволяющие избежать потерь элементов, неконтролируемого роста давления и, как следствие, разгерметизации сосудов. Разработанная методика кислотного разложения позволяет также использовать микроволновые печи без датчика давления, что значительно удешевляет анализ по сравнению с методикой в ГФ XIV, так как в последней желательна помимо датчика температуры и датчик давления (табл. 1).

Таблица 1 – Программа кислотного разложения образцов субстанций растительного происхождения в условиях МВ-нагрева (масса навески 0,5-1,0 г)

Этап	Время, мин	Температура, °С
1	20	25 °С→170 °С
2	20	170 °С
3	50	170 °С→25 °С

Предложены основные принципы выбора длин волн для определения элементов методом АЭС-ИСП, условия и модификаторы для ЭТААС-определения кадмия, свинца и мышьяка. 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, никеля, стронция, цинка. Длины волн эмиссии (нм), на которых проводились измерения, следующие: 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). Установлено, что разработанные методики специфичны по отношению к анализам, поскольку при определении перечисленных выше элементов отсутствуют спектральные наложения на выбранные аналитические линии эмиссии. Относительная погрешность АЭС-ИСП-методики не превышает 3,0 %. Разработка ЭТААС-методики определения наногаммовых количеств кадмия, свинца и мышьяка осуществлялась на длинах волн 228,8 (кадмий), 283,3 (свинец), 193,7 (мышьяк) нм. Для исключения потерь таких легко летучих элементов как свинец и мышьяк на стадии термообработки, предложено использовать достаточно простые и дешевые модификаторы – раствор $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 1 % для определения мышьяка, раствор аскорбиновой кислоты 1 % для определения свинца. Выбранные оптимальные условия ЭТААС-определения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – 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 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (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

Подобранные модификаторы и условия ЭТААС-определения тяжелых металлов в сочетании с разработанной пробоподготовкой позволило унифицировать методику количественного определения кадмия, свинца и мышьяка. АЭС-ИСП- и ЭТААС-методики были валидированы согласно современным требованиям.

Адекватность и унифицированность разработанной АЭС-ИСП и ЭТААС-методик для определения макро- и микросодержаний элементов была подтверждена анализом субстанций растительного происхождения. Данные приведены в таблице 3. Содержание Cd, Pb, As было ниже установленных ГФ XIV норм.

По результатам проведенных исследований, а также на основе существующей ОФС, подготовлен новый проект ОФС «Определение кадмия, свинца, мышьяка, ртути в лекарственном растительном сырье».

Изучение и выбор оптимальных условий для разработки спектрофотометрической методики количественного определения кремния в (в пересчете на SiO₂)

Не все элементы могут быть легко определены методами АЭС-ИСП и ЭТААС в силу присущих им химических свойств. К числу таких элементов относится кремний. Кремний необходим для нормального формирования костей, хрящей, соединительных тканей, волос, процессов оссификации. Ежедневная потребность человека в кремнии составляет 20-30 мг кремнезема. Люди с пониженным содержанием кремния страдают ломкостью костей, атеросклерозом, патологическими изменениями хрящевой ткани. Недостаток этого элемента можно возместить введением растворимых форм кремния. Среди фармакопейного ЛРС таким перспективным источником является трава хвоща полевого, концентрирующая этот элемент в значительных количествах (%-ные содержания) в усвояемой организмом форме. Однако контроль качества данного вида сырья по содержанию кремния не проводится. Поэтому целесообразным является стандартизация травы хвоща полевого не только по содержанию флавоноидов (как сейчас), но и по содержанию этого важнейшего микроэлемента.

Наиболее точные результаты определения Si могут быть получены при использовании спектрофотометрического метода. Но удовлетворительные спектрофотометрические методики определения этого элемента в кремнефильном ЛРС практически отсутствуют. В настоящей диссертационной работе выполнена разработка методики определения Si в ЛРС. Пробоподготовка заключалась в сплавлении растительного материала со смесью натрия карбоната безводного и обезвоженного натрия тетрабората в платиновых тиглях с последующим переводом полученного плава в раствор. Стандартные образцы (СО) готовились аналогично.

Таблица 3 – Результаты определения Al, Ba, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Sr, Zn, мг/г

Образец	Al	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Sr	Zn
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
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>Viola 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
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±0,01

Продолжение таблицы 3

Образец	Al	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Sr	Zn
Трава чистотела большого (<i>Chelidonium majoris herba</i>)	0,28±0,10	0,02±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>Tanacetum vulgare 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>Aerva lanata 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>Inula 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
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 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>Ledipalustris cornus</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 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 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 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 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 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

Продолжение таблицы 3

Образец	Al	Ba	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Sr	Zn
Трава боровой матки (<i>Orthilia secundaе 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
Трава зимолоубки (<i>Chimaphila 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>Bergenia crassifoliae folia fermentato (ферментированные)</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>Bergenia 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

В отличие от методик, описанных в литературе, разработанная методика отличается несколькими важными преимуществами. Первое преимущество заключается в том, что качестве исходного СО использовался ГСО 728-75 нефелиновой руды СНС-1 постоянного состава (содержание SiO_2 40,2 %), поскольку СО фармакопейного качества на кремний отсутствуют. Второе преимущество – определение кремния в фармакогностических объектах не в форме неустойчивых желтых молибдохремниевых гетерополикислот, а в форме устойчивой молибденовой сини, полученной восстановлением желтой гетерополикислоты раствором, содержащим метол и натрия сульфит. Последнее позволяет обеспечить устойчивый аналитический сигнал.

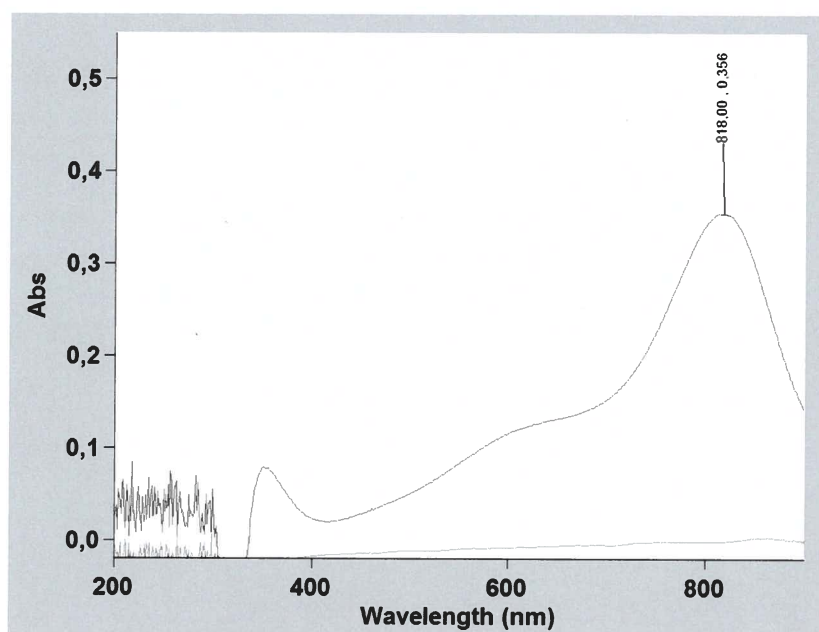


Рисунок 2 – Типичный УФ/ВИД-спектр испытуемого раствора

Состав синего комплекса (молибденовая синь) дискуссионен. Предполагается, что молибденовая синь – смесь продуктов, в которых соотношение $\text{Mo(V)}:\text{Mo(VI)}=1:2$ и/или $\text{Mo(V)}:\text{Mo(VI)}=1:1$. Максимум оптической плотности наблюдался при длине волны 815 ± 5 нм. Содержание SiO_2 определялось по калибровочной кривой. Характерный спектр испытуемого

раствора представлен на рисунке 2. Методика была валидирована

согласно современным требованиям: доказана специфичность, линейность методики подтверждена при содержании SiO_2 в анализируемом образце до 12 %, правильность доказана методом добавок путем расчета открываемости (100,2-105,1 %), коэффициент вариации при исследовании повторяемости составил 1,50 %. Относительная погрешность методики равна 1,59 %.

С использованием разработанной методики были проанализированы образцы травы хвоща полевого от нескольких производителей. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – 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
«HealthЗдоровье»	4,25±0,08
«Фитофарм»	3,78±0,11

На основании данных, представленных в таблице 4, можно установить норму для кремния (в пересчете на SiO_2) – не менее 3,0 %.

Исследование возможностей ионометрии для определения важных для фармакогнозии ионов

В настоящей работе исследована возможность применения ионометрии с использованием наиболее доступных и широко распространенных фоновых электролитов: 1 М KNO_3 , 0,5 М Na_2SO_4 для определения бромидов, нитратов, йодидов в ЛРС. В результате было показано, что ионометрия в сочетании с рекомендуемыми производителями ионселективных электродов растворами фоновых электролитов способна давать лишь полуколичественную оценку содержания бромидов и нитратов. Тем не менее, ионометрия в сочетании с 1 М раствором калия нитрата оказалась успешной для количественного определения йодидов – наиболее усваиваемой формы этого элемента в слоевищах ламинарии (для извлечения аналита из сырья использовалась горячая вода (90 °C)).

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 росла вязкость извлечения, что затрудняло установление равновесного мембранного потенциала и, как следствие, ухудшало правильность определения аналита; при увеличении объема экстрагента, а также разбавлении метрологические характеристики методики существенно ухудшались – ошибка определения значительно возрастала и могла превышать 10 %. Степень извлечения не оказывала существенного влияния на результаты анализа.

Так как бурые водоросли являются морскими фитоорганизмами, то при прибавлении воды к высушенному сырью происходило интенсивное поглощение последней растительными клетками, что влияло на конечный объем извлечения. Этот эффект необходимо учитывать при количественном определении йода в форме йодида в слоевищах ламинарии с помощью введения специального коэффициента, учитывающего водопоглощение. Определение йодидов проводилось по калибровочной кривой. Методика была валидирована по показателям: линейность (рI 5-1), правильность (открываемость – 95-105 %), повторяемость (коэффициент вариации – 6,67 %). Специфичность методики обеспечивалась высокой специфичностью йодидселективного электрода. Относительная погрешность разработанной методики составила 7,14 %, что обусловлено особенностями ионометрического метода.

С помощью разработанной методики найдено, что содержание йодидов в слоевищах ламинарии составляет $(0,42 \pm 0,03) \%$.

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.

Изучение и выбор оптимальных условий для разработки унифицированной спектрофотометрической методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров (на основе метода Дюбуа)

Изучение и выбор оптимальных условий определения восстанавливающей суммы сахаров в ЛРС после кислотного гидролиза проведено на примере слизесодержащего сырья – листьев мать-и-мачехи. В качестве стандарта использовали раствор глюкозы при определении сахаров, находящихся в растворах преимущественно в форме пираноз или раствор фруктозы – при определении сахаров, находящихся преимущественно в растворах в форме фураноз.

Предварительными экспериментами было продемонстрировано влияние концентрации фенола на аналитический сигнал определяемого компонента. Показано, 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 %. Для развития окрашивания к стандартному раствору и испытуемому раствору, полученному после

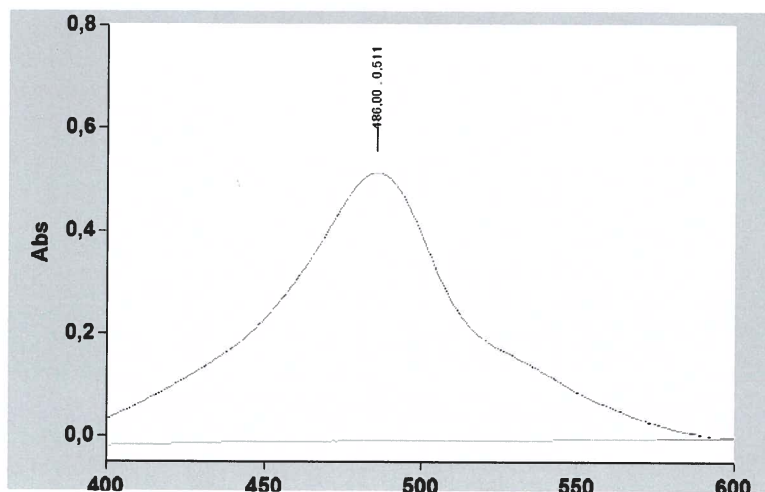


Рисунок 3 – Типичный УФ/ВИД-спектр испытуемого раствора

кислотного гидролиза, раствору сравнения последовательно прибавляли раствор фенола 5 % и концентрированную кислоту серную. Типичный спектр испытуемого раствора представлен на рисунке 3. Методика была валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность (табл. 5), повторяемость.

Показано, что методика является специфичной, поскольку максимумы поглощения, для испытуемого и стандартного растворов совпадали с точностью более 99 %. Для определения линейности методики была приготовлена серия растворов СО глюкозы в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл. Установлено, что 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 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 5.

Таблица 5 – Правильность определения суммы восстанавливающих сахаров в листьях мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilaginifolia*) ($A=0,217$ 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
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
Статистические характеристики				Результаты
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 ($\Delta X, P=0,95$)				3,86

* в скобках приведены данные для суммы свободных сахаров и полисахаридов, содержащихся в извлечении из листьев мать-и-мачехи, разбавленного в два раза

Результаты, представленные в таблице 5, свидетельствуют, что правильность находится в диапазоне от 95,0 до 105,0 %, коэффициент вариации составляет 4,89 %. Результаты по исследованию повторяемости также были удовлетворительными. Относительная погрешность – не более 5,0 %.

Установлено, что наиболее высокое извлечение восстанавливающих сахаров наблюдается при степени измельчения 1 мм для листьев подорожника большого, цветков липы, травы фиалки, корней алтея, корней лопуха, корней одуванчика лекарственного, корней и корневищ девясила высокого; исключение составляют листья мать-и-мачехи обыкновенной, для которой наиболее оптимальна степень измельчения – 5 мм, что обусловлено особенностями строения листьев данного растения. Семена льна посевного 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.

Наилучшее извлечение 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. Также наибольшая полнота перехода определяемых веществ в извлечение наблюдались при двукратной экстракции в течении 30 – 60 мин на каждой стадии. Проведенные исследования показали, что подобранные для каждого ЛРС условия являются оптимальными, а сама методика работоспособна для сырья различных морфологических групп: листьев, цветков, корней и корневищ, семян. В отличие от методик, приведенных в ГФ XIV, разработанная методика не требует использования высокоочищенных реактивов (антрон), взрывоопасных веществ (пикриновая кислота), длительного нагрева (ухудшение метрологических характеристик), трудоемкой подготовки нестойких окрашивающих реагентов (сокращение времени и повышение точности анализа).

Унифицированность разработанной методики подтверждена анализом различных видов ЛРС (табл. 6).

Таблица 6 – Содержание суммы восстанавливающих сахаров (X, %) в субстанциях растительного происхождения

Образец	СО	Влажность, %	X, %
Листья мать-и-мачехи обыкновенной (<i>Tussilaginifarfaraefolia</i>)	глюкоза	13	29,0±2,4
Листья подорожника большого (<i>Plantaginismajorisfolia</i>)	глюкоза	14	31,5±2,5
Цветки липы (<i>Tiliaeflores</i>)	глюкоза	13	47,8±5,1

Продолжение таблицы 6

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

Показано (табл. 6), что наибольшее количество восстанавливающих сахаров (в форме пентоз) содержится в корнях и корневищах девясила высокого (46,1%). Наибольшее содержание гексоз наблюдается в цветках липы (47,8 %).

Нормы, установленные в ГФ XIV для ЛРС (не менее 2,0 % для цветков липы, не менее 10,0 % для листьев мать-и-мачехи обыкновенной), могут быть рекомендованы и при определении аналитов с фенолом (по методу Дюбуа). Сопоставляя данные по содержанию суммы восстанавливающих сахаров в цветках липы, полученными в настоящей работе (47,8 %), с данными, имеющимися в литературе (31,2 %), можно заключить, что норма, которая приведена в ГФ XIV, нуждается в пересмотре – это будет темой дальнейших исследований.

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

Исследование процессов, происходящих при развитии окраски, выполнено на примере фруктозы (рис. 4) с помощью современных методов квантовой химии – теории функционала плотности B3LYP в базисе 6-311G(d,p) и PM3. Расчеты проводились в программе Gaussian 09. Визуализация результатов расчета осуществлялась с помощью программы GaussView 5.0.8.

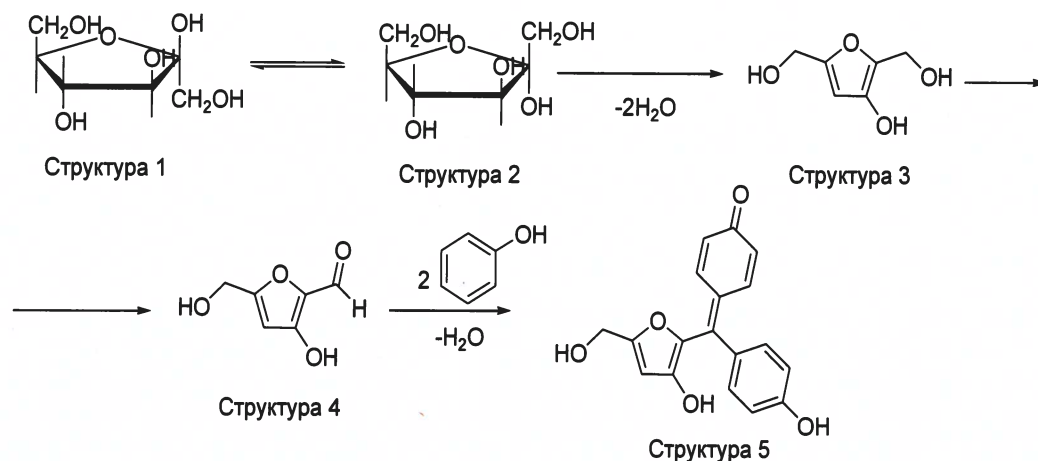


Рисунок 4 – Предполагаемая схема образования окрашенного аналита (5) из фруктозы

На первом этапе молекула фруктозы (1) эпитеризуется, давая (2). Такая взаимная ориентация водородов и гидроксильных групп делает возможным протекание реакции дегидратации (2) в среде концентрированной серной кислоты, что приводит к образованию соединения (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).

Действительно, разница в значениях стандартных энтальпий образования (Sum of electronic and thermal enthalpies) молекул 1, 2 не превышает по модулю 0,01 Eh, что указывает на относительную легкость перехода между (1) и (2). Наибольшей стабильностью обладает соединение (5), наименьшей стабильностью – спирт (3) и альдегид (4), который в кислых условиях легко реагирует с нуклеофильной частицей (фенолом) с образованием красителя (5).

При небольшом содержании воды (данная ситуация упрощенно моделировалась отсутствием молекул воды) равновесие смещено в сторону реагентов. Продуктов реакции не образовывалось.

Если содержание воды в смесях с серной кислотой увеличивается (это происходит в условиях метода Дюбуа; упрощенно смоделировано добавлением в расчетную схему одной молекулы воды), то равновесие смещается в сторону продуктов. В качестве промежуточного продукта образуется сульфозфир (рис. 5А), который неустоек и разлагается с образованием альдегида (рис. 5Б).

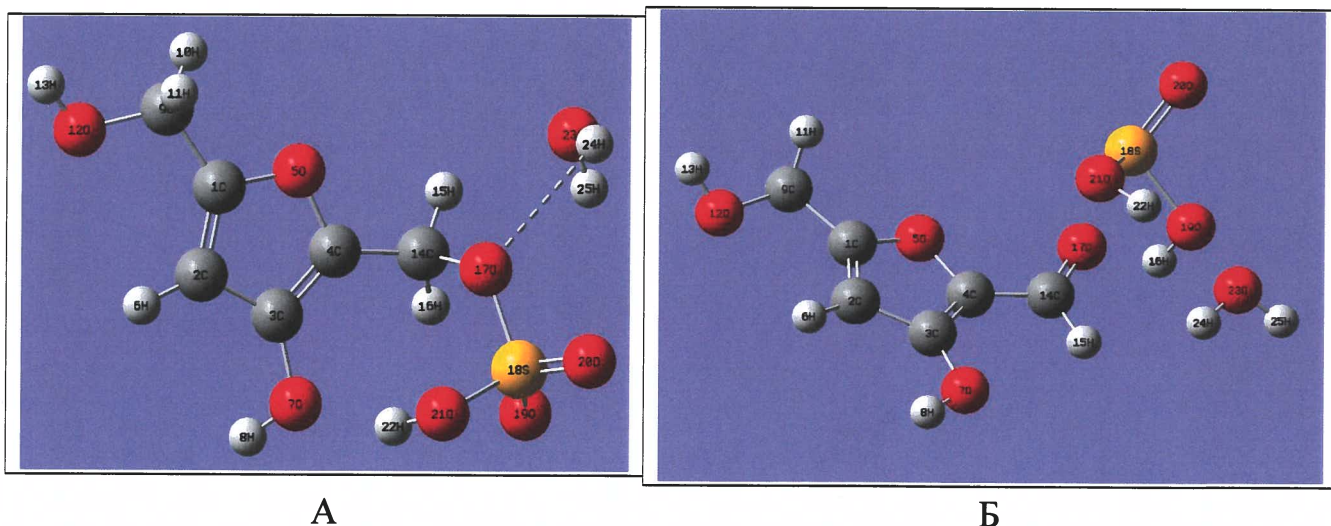
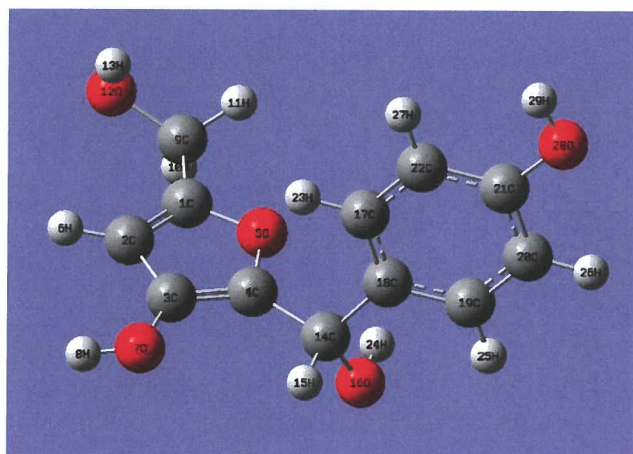


Рисунок 5 – Структуры сульфозфира (А) и системы содержащей сернистую кислоту воду и альдегид (Б) (визуализация осуществлена с помощью программы GaussView 5.0.8)

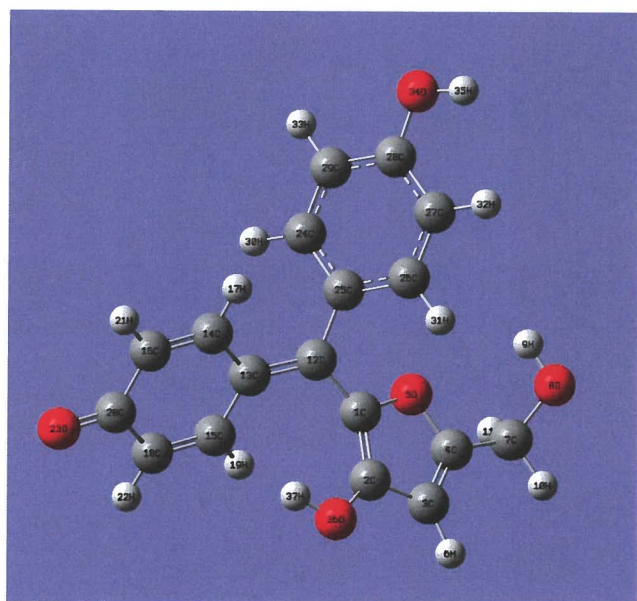
Образующаяся сернистая кислота окисляется в присутствии кислорода воздуха до молекул серной кислоты: $2\text{SO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{SO}_4$. Этот процесс протекает более интенсивно

при подводе теплоты, источником которой в фенол-сернокислом методе является реакция смешения среды (H_2SO_4) с водными растворами восстанавливающих сахаров и фенола, так как она экзотермична.

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, в результате образуется полупродукт, представленный на рисунке 6А. Полученный полупродукт в кислой среде протонируется по кислороду 16 О. Протонированный полупродукт в итоге элиминирует молекулу воды. Образующийся карбокатион реагирует с второй молекулой фенола (по углероду 14 С), давая краситель, который обуславливает формирование аналитического сигнала (Рисунок 6Б). В процессе образования конечного соединения красителя (согласно проведенному квантово-химическому моделированию) должно выделиться 3 молекулы воды. Квантово-химическим моделированием показана схожесть процессов образования окрашенного продукта при взаимодействии продукта 4 с молекулами фенола и образования окрашенного продукта в реакции Селиванова.



А



Б

Рисунок 6 – Структура полупродукта и красителя, обуславливающего аналитический сигнал

Проведенные исследования по осаждающей способности спирта этилового, апротонного растворителя (ацетона) и ацетона с добавкой коагулянта (муравьиной кислоты) при определении полисахаридов гравиметрическим методом показали, что лучшей осадительной способностью

обладает ацетон в сочетании с коагулянтом. Моносахара при этом высаждаться не будут. Получение осадка белого цвета можно считать качественной реакцией для подтверждения подлинности полисахаридов. Перед осаждением аналитов, предложено очищать извлечение пропусканием через картридж «Диапак Амин» и последующей обработкой окисью алюминия. Для отделения осадка от маточного раствора предложено использовать центрифугирование. Выбраны следующие условия: время центрифугирования – 10 мин, скорость центрифугирования – 4000 об/мин. На основании этого был предложен унифицированный осадитель (ацетон с добавкой муравьиной кислоты), который обладает лучшей летучестью по сравнению с спиртом этиловым 95 % в условиях высушивания осадков перед взвешиванием при температуре 80 °С. Также продемонстрировано, что ИК-спектроскопию можно ограниченно использовать для подтверждения подлинности полисахаридов (только после осаждения и высушивания осадка аналита).

На примере функционально замещенного сахара животного происхождения (соли глюкозамина) продемонстрирована перспективность использования метода ВЭЖХ/МС для количественного определения аминозамещенных сахаров, поскольку последний не поглощает в УФ/ВИД-области. Так, была разработана и валидирована ВЭЖХ/МС-методика определения глюкозамина в геле 8,0 %. Относительная погрешность методики – 1,71 %.

Исследована схема масс-фрагментации с использованием квантово-химического моделирования. В условиях регистрации спектра катион натрия быстро обменивается с протоном, источником которого является добавка муравьиной кислоты, в результате наблюдается выброс молекулы воды, приводящий к образованию весьма термодинамически устойчивого дочернего иона с $m/z=162$ Да $[M-H_2O+H]^+$, обладающий довольно заметной интенсивностью в масс-спектре. Проведенные квантово-химические расчеты показали, что в условиях ионизации типа «электроспрэй» из двух возможных вариантов масс-фрагментации вероятнее всего реализуется схема, при которой положительный заряд локализован на аминогруппе (рис. 7).

Изучение и выбор оптимальных условий для разработки унифицированных ВЭЖХ-методик количественного определения арбутина и суммы антоцианов

Для определения арбутина было предложено использование двух типов детекторов – ультрафиолетового и масс-спектрометрического.

В масс-спектре арбутина наблюдались следующие интенсивные сигналы: $m/z=543$ Да (соответствует депротонированному димеру арбутина), $m/z=271$ Да – депротонированная молекула арбутина (родительский ион), $m/z=165$ и 161 Да – дочерние ионы, образующийся в

результате распада родительского иона, которые представляли собой производное углеводной части молекулы арбутина; $m/z=108$ Да – дочерний ион – производное гидрохинона.

На этой основе можно предложить следующую схему масс-фрагментации (рис. 8).

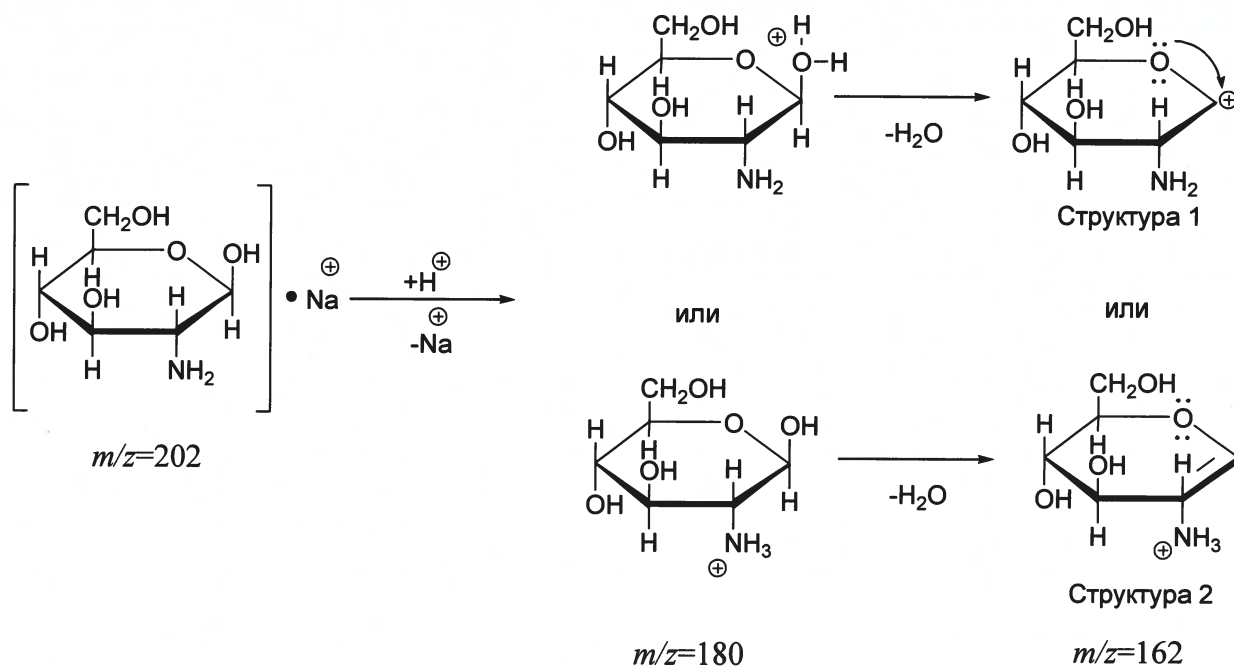


Рисунок 7 – Схема фрагментации молекулы глюкозамина

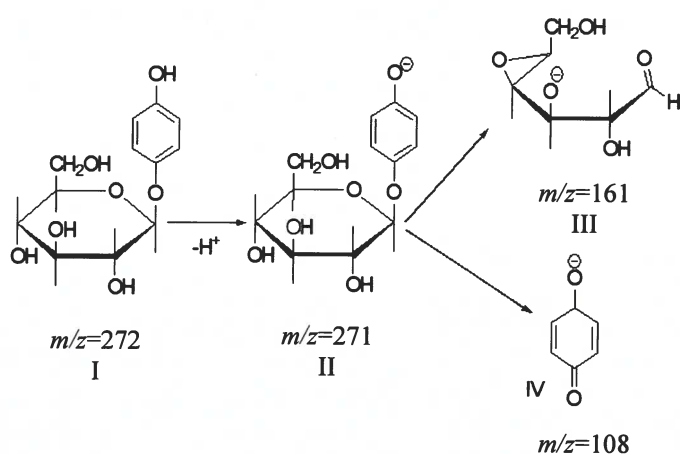


Рисунок 8 – Схема масс-фрагментации арбутина

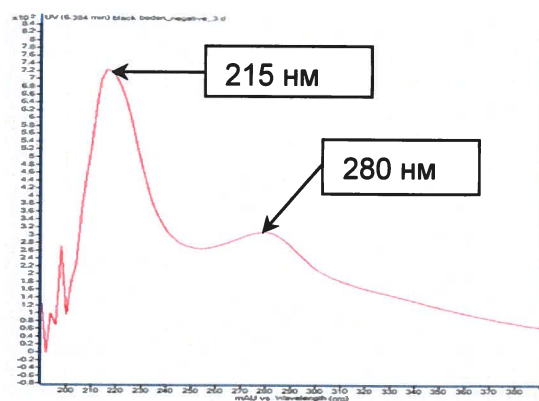


Рисунок 9 – УФ/ВИД-спектр арбутина

Квантово-химические расчеты показали, 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 Ен. Стабильность

частицы II очевидно обеспечивается сильным положительным мезомерным эффектом со стороны отрицательно заряженного атома кислорода фенольного заместителя.

Тем не менее было показано, что наиболее перспективным и доступным для целей контроля качества и стандартизации является ультрафиолетовый детектор, поскольку он позволяет обеспечить значительно более высокую чувствительность определения по сравнению с масс-спектрометрическим, работающим в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Разработка ВЭЖХ/УФ-методики также осуществлялась на примере листьев толокнянки обыкновенной. В качестве аналитической была выбрана длина волны 280 нм (рис. 9), 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.

В процессе исследования были выбраны условия извлечения арбутина из листьев брусники обыкновенной и корневищ бадана толстолистного.

Подобранные оптимальные условия извлечения арбутина из субстанций растительного происхождения обобщены в таблице 7.

Таблица 7 – Условия извлечения арбутина из фармакопейных видов ЛРС

Образец	Степень измельчения, мм	Масса навески, г	Экстрагент	Соотношение сырье:экстрагент	Т, °С	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

Из данных таблицы 7, видно, что наиболее сильно на извлечение аналитов влияет состав экстрагента. Если для листьев толокнянки и корневищ бадана он одинаковый (спирт 40 %), то наилучшая экстракция арбутина из листьев брусники наблюдается при использовании в качестве экстрагента воды. Данный экспериментальный факт может быть объяснен существенными различиями в морфологическом строении органов растений различных видов.

На рисунке 10 в качестве примера приведена хроматограмма извлечения из листьев толокнянки, зарегистрированная с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм. Время удерживания пика арбутина около 6 мин. Хроматограммы извлечений из листьев брусники, корневищ бадана толстолистного выглядят аналогично.

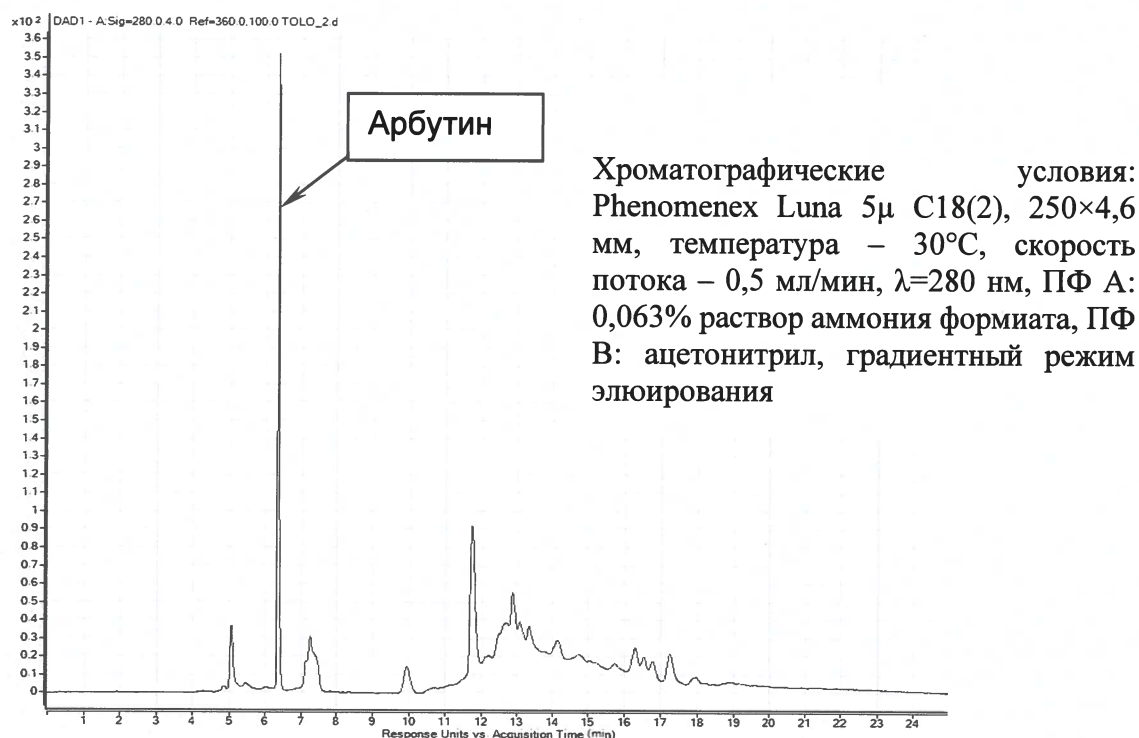


Рисунок 10 – Хроматограмма извлечения из листьев толокнянки обыкновенной

Кроме того, были проанализированы перспективные нефармакопейные виды ЛРС, также содержащие арбутин. Результаты анализа травы боровой матки и травы зимолубки подтверждают унифицированность выбранных хроматографических условий определения (найденное содержание арбутина – менее 1,0 % для обоих видов сырья). Методика была валидирована согласно современным требованиям: доказана специфичность, линейность методики подтверждена при содержании арбутина до 200 мкг/мл в испытуемом растворе, правильность доказана методом добавок путем расчета открываемости (95,0-105,0 %), коэффициент вариации при исследовании повторяемости составил 0,55 %.

Относительная погрешность ВЭЖХ/УФ-методики составляет 1,44 %. Нормы, представленные в ГФ XIV для листьев толокнянки и брусники, можно рекомендовать и при определении арбутина методом ВЭЖХ/УФ.

Согласно ГФ XIV корневища бадана толстолистного стандартизируют по содержанию дубильных веществ (в пересчете на таннин), в то же время имеются сведения о содержании в данном ЛРС арбутина, который также вносит вклад в фармакологическую активность сырья. В связи с чем, было проведено исследование нескольких серий образцов сырья, предоставленного сотрудниками ФГБНУ ВИЛАР. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Определение арбутина в корневищах бадана толстолистного (*Bergeniae crassifoliae rhizomata*) методом ВЭЖХ/УФ в образцах ФГБНУ 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 8, для корневищ бадана толстолистного можно установить норму для арбутина – не менее 3,0 %.

В результате проведенных исследований был предложен проект ОФС «Определение арбутина в субстанциях растительного происхождения методом ВЭЖХ», а также изменение к ФС «Бадана толстолистного корневища».

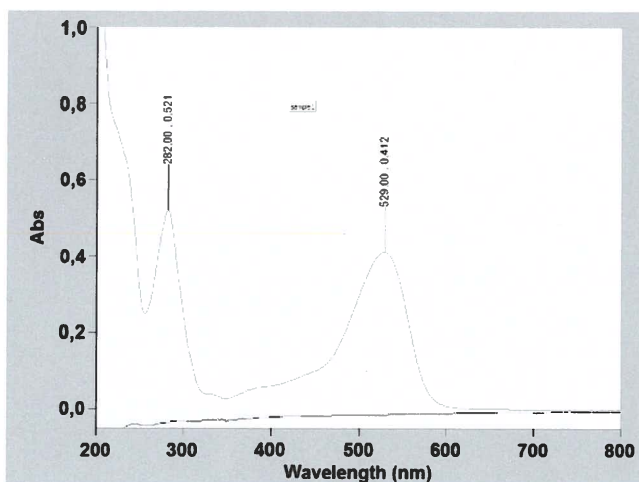


Рисунок 11 – УФ/ВИД-спектр цианидин-3-глюкозида (в метаноле)

Разработка методики количественного определения антоцианов проведена на примере плодов черники – сырья, отличающегося наиболее сложным антоциановым профилем. УФ-спектр цианидин-3-глюкозида в растворе представлен на рисунке 11. Из рисунка 11 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, исключающих кислые среды и нагрев, например, можно использовать ультразвуковую обработку, которая и была использована в дальнейшей работе. Влияние таких факторов как измельченность сырья, содержание этанола в экстрагенте, соотношение сырье-экстрагент, время и кратность экстракции на извлечение антоцианов из плодов черники обыкновенной представлены в таблице 9. Выбранные оптимальные хроматографические условия приведены ниже.

Таблица 9 – Условия извлечения антоцианов из фармакопейных видов ЛРС при ультразвуковой обработке смеси

Образец	Степень измельчения, мм	Экстрагент	Соотношение сырье:экстрагент	Время экстракции, мин	Кратность экстракции
Плоды черники обыкновенной (<i>Vaccinii myrtilli fructus</i>)	0,5	40% спирт	1:40	60	3
Сухие плоды аронии черноплодной (<i>Aroniae melanocarpae sicco fructus</i>)	0,5	40% спирт	1:80	30	2
Цветки Василька синего (<i>Centaureae cyani flores</i>)	1,0	вода	1:40	120	2

Хроматографические условия: колонка – Zorbax SB-Phenyl C18, 5 μ , 250 \times 4,6 мм, температура – 40 °С, скорость потока элюента – 1 мл/мин, λ =530 нм, ПФ А: 10 % раствор муравьиной кислоты, ПФ В: муравьиная кислота:вода:ацетонитрил (10:40:50), градиентный режим элюирования. Примеры хроматограмм приведены на рисунках 12-13.

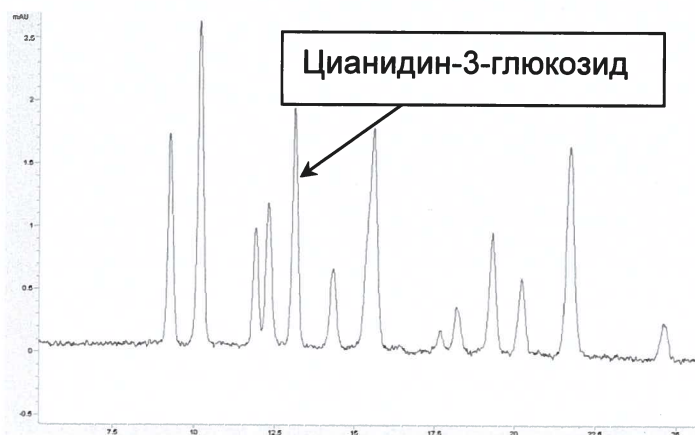


Рисунок 12 – Хроматограмма извлечения из плодов черники обыкновенной ($\lambda=530$ нм, наблюдаемые пики относятся к антоцианам и антоцианидинам)

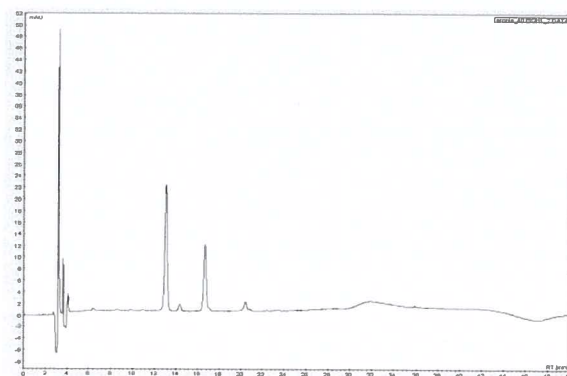


Рисунок 13 – Хроматограмма извлечения из сухих плодов аронии черноплодной ($\lambda=530$ нм, наблюдаемые пики относятся к антоцианам и антоцианидинам)

Проведенные исследования позволили разработать унифицированную методику определения суммы антоцианов в ЛРС (в пересчете на цианидин-3-глюкозид). Методика была валидирована согласно современным требованиям: доказана специфичность, линейность методики подтверждена при содержании цианидин-3-глюкозида до 40 мкг/мл в испытуемом растворе, правильность доказана методом добавок путем расчета открываемости (95,0-105,0 %), коэффициент вариации при исследовании повторяемости составил 2,95 %.

При определении антоцианов было показано, что предлагаемые условия хроматографического определения хорошо сочетаются как с классической пробоподготовкой, предлагаемой ГФ XIV, так и с предлагаемой в настоящей работе «мягкой» ультразвуковой пробоподготовкой в отсутствие кислот и нагрева. Проведенные исследования позволили выдвинуть предположение, что антоцианы в плодах черники обыкновенной и василька синего находятся в свободной, а в сухих плодах аронии черноплодной – в связанной формах. Относительная ошибка анализа составила 3,05 % при определении суммы антоцианов.

Обобщенный алгоритм разработки унифицированных методик анализа на основе инструментальных методов анализа

На основании проведенных исследований представлены принципиальные схемы анализа и приведен общий алгоритм разработки унифицированных методик с использованием современных инструментальных методов (рис. 14 – 17).

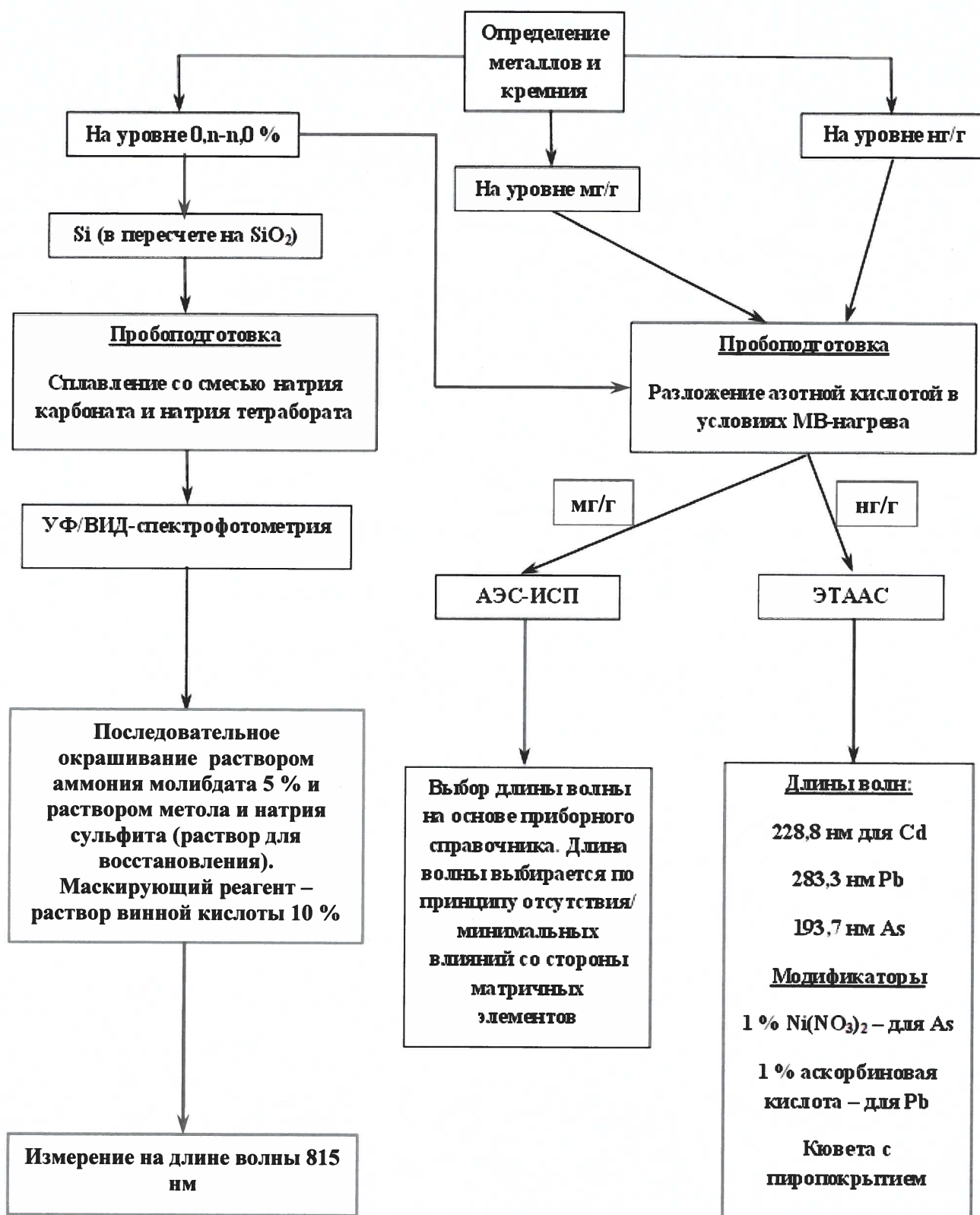


Рисунок 14 – Принципиальная схема определения металлов и кремния в ЛРС с использованием современных инструментальных методов

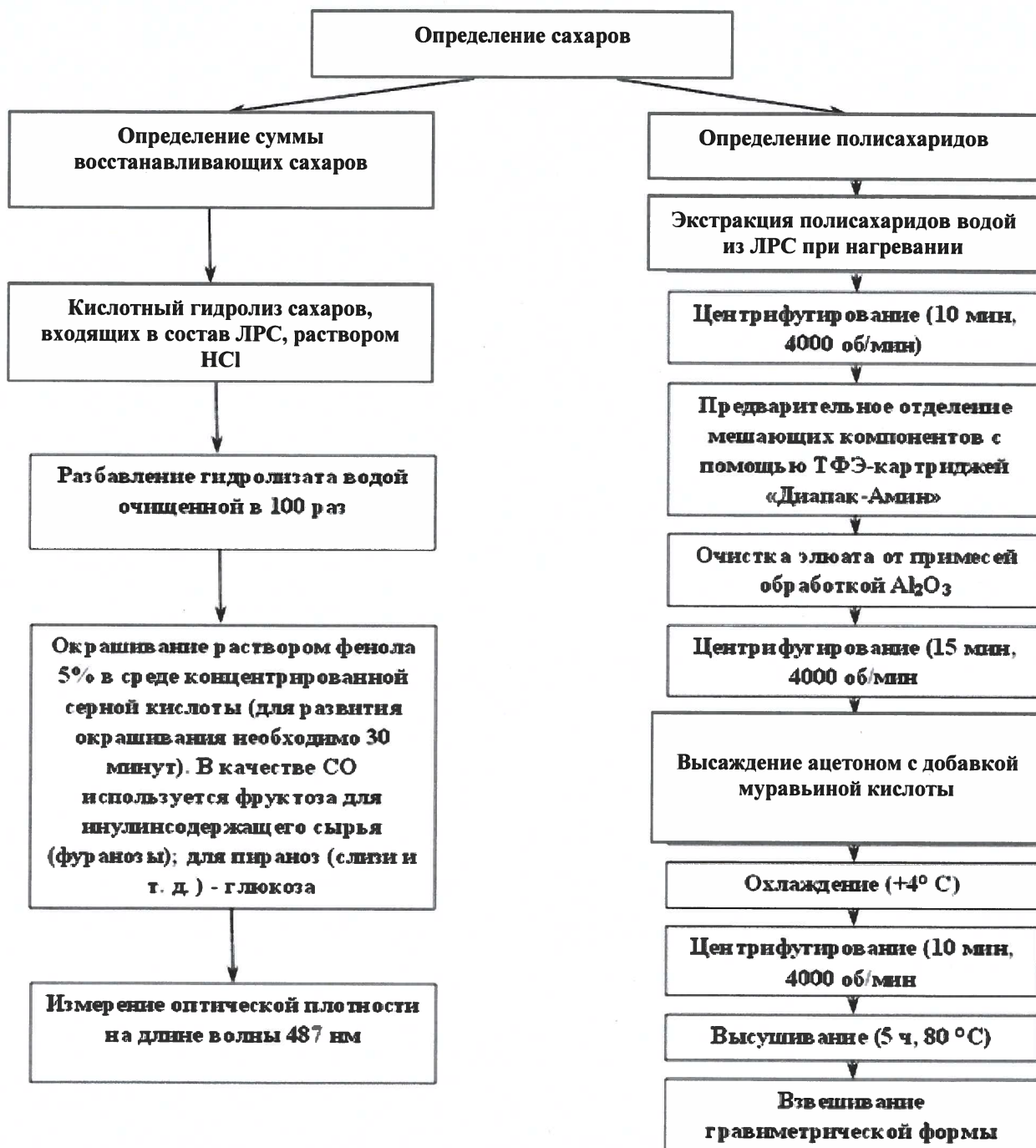


Рисунок 15 – Принципиальная схема определения сахаров

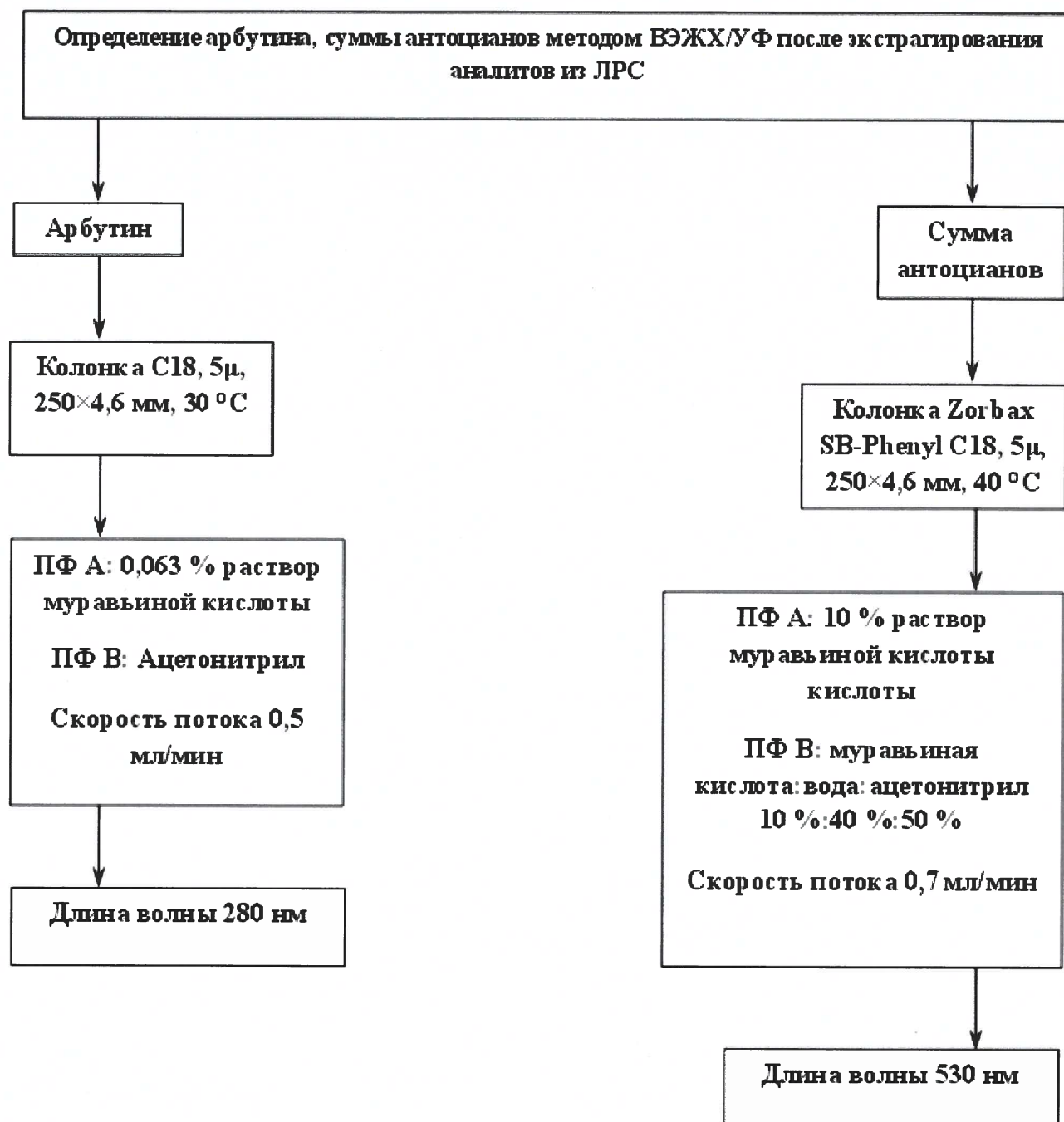


Рисунок 16 – Принципиальная схема определения арбутина, суммы антоцианов методом ВЭЖХ/УФ

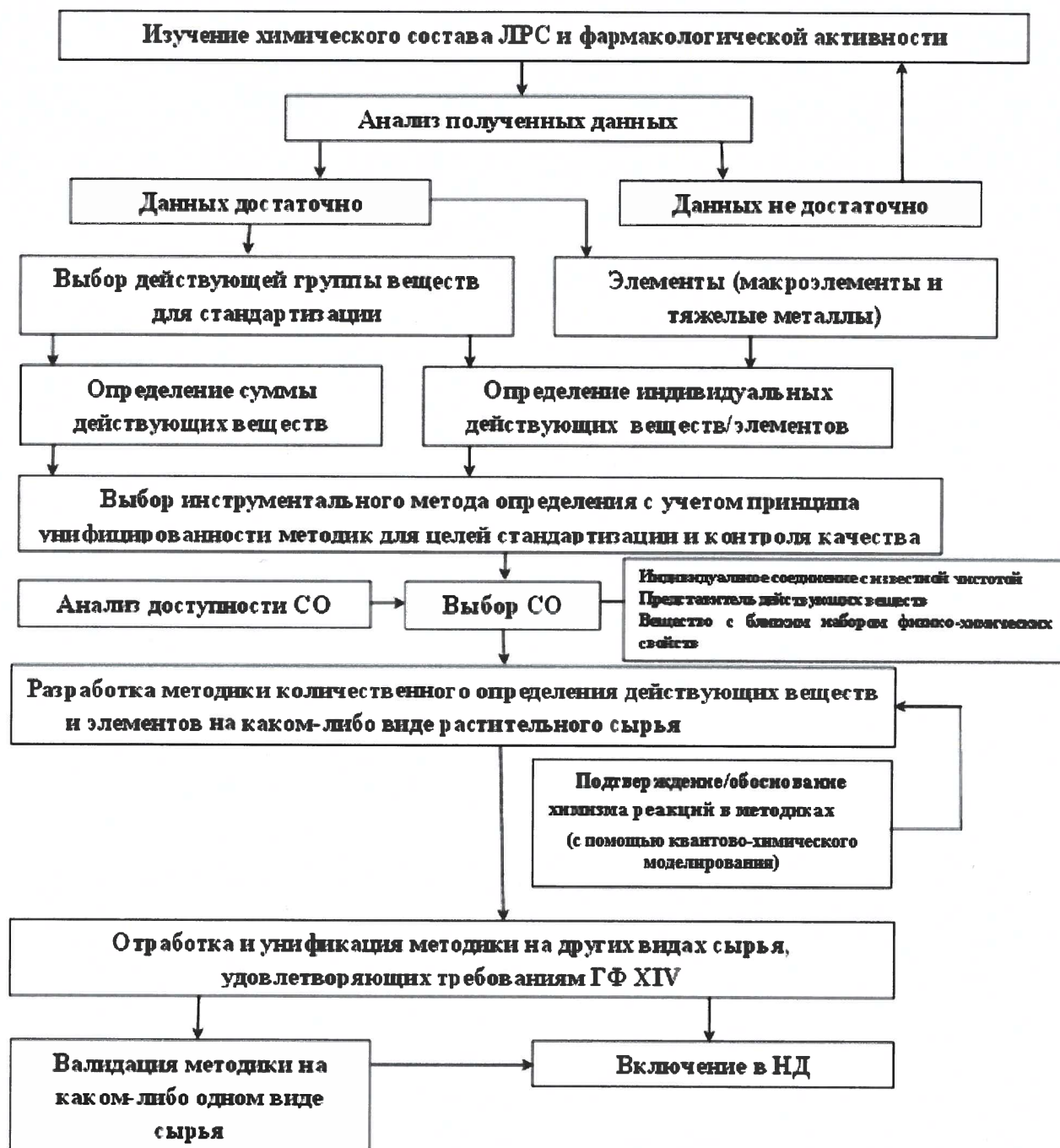


Рисунок 17 – Последовательность действий при разработке унифицированных методик анализа для целей стандартизации и контроля качества ЛРС

Для принципиальной оценки химических факторов, влияющих на формирование аналитического сигнала, с помощью квантово-химических расчетов можно рекомендовать следующее: сначала построить модели реагентов и продуктов реакции и оценить их термодинамическую стабильность, далее посредством квантово-химического моделирования

рассмотреть возможные пути протекания реакции (основываясь на постулатах классической теоретической химии и данных эксперимента). При недостатке машинных ресурсов возможно использование полуэмпирических методов расчета (РМЗ); при достаточности машинных ресурсов – неэмпирические методы расчета с расширенным базисным набором (метод функционала плотности, теория возмущений, метод связанных кластеров и т. д.).

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 ЛРС является спектрофотометрия в силу коммерческой доступности, а также необходимости 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 мелиссы 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. Подобранный 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 методом ВЭЖХ» 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. Рекомендательный в настоящей работе принцип унификации очевидно распространяется и на другие типы субстанций растительного происхождения и содержащихся в них действующие вещества.

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 ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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. [ВАК]
2. **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. [Chemical Abstracts, ВАК]
3. **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. [Chemical Abstracts, ВАК]
4. **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. [Scopus, ВАК]
5. **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. [ВАК]
6. **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. [Chemical Abstracts, ВАК]
7. **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. [ВАК]
8. **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. [ВАК]
9. **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. [Scopus, ВАК]
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. [Chemical Abstracts, ВАК]

11. **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. [Chemical Abstracts, ВАК]

12. **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. – № 5. – P. 1124-1131. [Scopus]

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. [Scopus, ВАК]

14. **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. – № 3. – P. 277-283. [Scopus]

15. **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. – № 4. – P. 929-937. [Scopus]

16. **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. [Chemical Abstracts, ВАК]

17. **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. – № 6. – P. 196-205. [Scopus]

18. **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. – № 6. – P. 206-212. [Scopus]

19. **Nikulin A.V.** Methodical basis for analysis of monosaccharides profile of the polysaccharide complex in the mixture herbal product (Pectorales species № 2) / V.V. Chevadaev, 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. – № 6. – P. 213-220. [Scopus]

20. **Nikulin A.V.** Development of a technique for determining cadmium, lead, arsenic with the ETAAS method in medicinal plant raw materials / **A.V. Nikulin**, O.G. Potanina, M. Alyussef, V.G. Vasil'ev, R.A. Abramovich, O.O. Novikov, N.N. Boyko, A.V. Khromov, E.A. Platonov // **Farmacia**. – 2021. – Vol. 69. – № 3. – P. 566-575. [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

ФГБНУ 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

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МВИ – микроволновое излучение

МВ-нагрев – нагрев в условиях микроволнового излучения

МВ-печь – микроволновая печь

МВ-условия – условия микроволнового нагрева

ППХС – проверка пригодности хроматографической системы

ПС – переходное состояние

СО – стандартный образец

УФ/ВИД-спектр – спектр в ультрафиолетовом и видимом областях спектра

УФ/ВИД-спектрофотометрия – спектрофотометрия в ультрафиолетовом и видимом областях спектра

ЦКП (НОЦ) РУДН – Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр)
ФГАОУ ВО «РУДН»

ЭТААС – атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией

V3LYP/6-311G(d,p) – функционал электронной плотности (базис расчета 6-311G(d,p))

PM3 – полуэмперический квантово-химический метод PM3