

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

На правах рукописи

ЖИЛКИНА ВЕРА ЮРЬЕВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ
ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
доцент А.И. Марахова

Научный консультант:
доктор химических наук,
доцент Я.М. Станишевский

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Характеристика витаминных сборов	15
1.2. Требования НД к витаминным сборам №1 и №2	17
1.3. Характеристика отдельных компонентов сборов	19
1.3.1. Химический состав, фармакологические свойства и применение плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной	19
1.3.2. Биологическая активность изучаемого лекарственного растительного сырья ...	21
1.3.3. Характеристика НД на плоды шиповника, рябины и смородины черной	23
1.4. Методы анализа основных биологически активных веществ в витаминных сборах и их компонентах	25
1.4.1. Качественный анализ органических кислот	26
1.4.3. Методы количественного определения органических кислот	32
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 1	35
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	37
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ	37
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ И ВИТАМИННЫХ СБОРОВ №1 И №2	42
3.1. Морфолого-анатомическое изучение витаминного сбора №1	43
3.2. Морфолого-анатомическое изучение витаминного сбора №2	53
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 3	58
ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ	60
4.1. Определение числовых показателей витаминных сборов	60
4.2. Качественный анализ сборов витаминных и их компонентов	64
4.3. Качественный анализ витаминных сборов и их компонентов на содержание суммы свободных органических кислот и кислоты аскорбиновой методом ТСХ	65
4.4. Качественный анализ витаминных сборов и их компонентов на содержание органических кислот и кислоты аскорбиновой методом ВЭЖХ	68
4.5. Качественный анализ витаминных сборов и их компонентов на содержание флавоноидов методом ВЭЖХ	73
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 4	77
ГЛАВА 5. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ	79
5.1. Количественный анализ суммы свободных органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах	79
5.1.1 Установление содержания индивидуальных органических кислот методом ВЭЖХ	80
5.1.2 Установление содержания суммы органических кислот алкаиметрией с использованием индикаторов	83

5.1.3	Установление содержания суммы органических кислот потенциометрическим титрованием.....	86
5.1.4	Установление содержания суммы органических кислот кулонометрическим титрованием.....	90
5.2	Валидация методик потенциометрического титрования органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах	92
5.2.1	Валидация методики потенциометрического титрования органических кислот в плодах смородины черной.....	93
5.2.2	Валидация методики потенциометрического титрования органических кислот в витаминном сборе №1	98
5.2.3	Валидация методики потенциометрического титрования органических кислот в витаминном сборе №2.....	105
5.3	Количественный анализ кислоты аскорбиновой в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах	111
5.3.1	Установление содержания кислоты аскорбиновой окислительно–восстановительным титрованием	111
5.3.2	Установление содержания кислоты аскорбиновой йодатометрически	111
5.3.3	Установление содержания кислоты аскорбиновой методом прямой спектрофотометрии	112
5.3.4	Количественное определение кислоты аскорбиновой методом ВЭЖХ.....	115
5.4	Количественный анализ дубильных веществ в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах	115
5.5	Качественный и количественный анализ содержания флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах	117
5.5.1	Анализ флавоноидов методом ВЭЖХ	117
5.5.2	Анализ флавоноидов методом спектрофотометрии	120
5.5.3	Количественный анализ каротиноидов в плодах шиповника, рябины обыкновенной, смородины черной и в витаминных сборах №1 и №2	139
5.6	Количественное определение антоцианов в витаминных сборах и их компонентах	144
5.7	Количественное определение полисахаридов методом гравиметрии	149
	ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 5	151
	ГЛАВА 6. АНАЛИЗ НАСТОЕВ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ №1 И №2	153
6.1.	Органолептические характеристики. Коэффициент водопоглощения.....	153
6.2.	Качественный анализ водных извлечений	155
6.3.	Количественный анализ БАВ в водных извлечениях из витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов.....	155
6.3.1.	Установление содержания суммы свободных органических кислот титриметрией с использованием индикаторов	155
6.3.2.	Установление содержания суммы свободных органических кислот потенциометрическим титрованием.....	157
6.3.3.	Установление содержания суммы свободных органических кислот кулонометрическим титрованием.....	158

6.3.4. Установление содержания дубильных веществ	161
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 6	162
ГЛАВА 7. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАСТОЕК ИЗ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ	163
7.1. Получение настоек из витаминных сборов №1 и №2	163
7.2. Установление характеристик настоек из витаминных сборов №1 и №2 как лекарственной формы	164
7.3. Установление содержания БАВ в настояках из витаминных сборов №1 и №2 ...	165
7.3.1. Количественное определение суммы свободных органических кислот	165
7.3.2. Количественное определение кислоты аскорбиновой	169
7.3.3. Количественное определение дубильных веществ.....	170
7.3.4. Определение содержания флавоноидов.....	172
7.4. Определение токсичности, противомикробной и антимикотической активности настоев и настоек из витаминных сборов №1 и №2	174
ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 7	180
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	181
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	183
ЛИТЕРАТУРА	184
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	203
Акты внедрения результатов работы	203
Приложение 1. Акт внедрения в работу ООО Фирма «Здоровье» результатов диссертационного исследования	204
Приложение 2. Акт внедрения в учебный процесс кафедры фармации Медицинского университета «Реавиз» результатов диссертационного исследования	205
Приложение 3. Акт внедрения в учебный процесс кафедры биотехнологии и промышленной фармации ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет» результатов диссертационного исследования	206
Приложение 4. Акт внедрения в учебный процесс института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» результатов диссертационного исследования	207
Приложение 5. Направление проекта ФС «Смородины черной плоды» в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»	208
Приложение 6. Направление проекта ФС «Витаминный сбор №1» в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»	209
Приложение 7. Направление проекта ФС «Витаминный сбор №2» в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»	210
Приложение 8. Патенты по результатам диссертационного исследования.....	211
Приложение 9. Протокол лабораторных испытаний на токсичность настоя витаминного сбора №1.....	214
Приложение 10. Протокол лабораторных испытаний на токсичность настоя витаминного сбора №2.....	215

ВВЕДЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Доля выпускаемых лекарственных препаратов растительного происхождения ежегодно увеличивается. По данным компании BBC Research, в ближайшие годы ожидается рост мирового рынка лекарственных препаратов растительного происхождения на 6,6 % ежегодно [134, 159, 170]. Эта тенденция объясняется тем, что растительные средства отличаются комплексным воздействием на организм, а также меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с синтетическими аналогами.

В связи с учащением простудных и вирусных заболеваний, ухудшением экологии, важную роль в рационе человека играют витамины, которые могут использоваться как в комплексной терапии, так и для профилактики различных заболеваний. Несмотря на то, что в настоящее время практически все витамины получают синтетическим путем, витаминосодержащие лекарственные растения не утратили своей актуальности. В растительном сырье витамины находятся в комплексе с полисахаридами, сапонинами, флавоноидами, вследствие чего проявляют большую биодоступность. Кроме того, природные витамины реже вызывают аллергические реакции и симптомы передозировки.

В Государственный реестр включены витаминные сборы из лекарственного растительного сырья, среди которых особого внимания заслуживают витаминный сбор №1 и витаминный сбор №2. Составляющие компоненты витаминных сборов – плоды смородины черной, плоды рябины обыкновенной и плоды шиповника – богаты такими витаминами как аскорбиновая кислота, витамины К, В2, Р, каротиноиды, флавоноиды, органические кислоты.

Нормативная документация на витаминные сборы устарела и не соответствует современным подходам к составлению фармакопейных

стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения.

В то же время Стратегия медицинского обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 г. обозначает в качестве одного из главных приоритетов государственной политики разработку конкурентоспособных импортозамещающих отечественных ЛС, в том числе, растительного происхождения. Решить данную задачу можно лишь обеспечив надлежащие требования к стандартизации лекарственного растительного сырья.

В связи с вышесказанным, актуальным является углубленное изучение биологически активных веществ витаминных сборов и их компонентов, а также водных и водно-спиртовых извлечений, с целью усовершенствования нормативной документации (НД).

Степень разработанности темы исследования. Анализ литературы показал, что изучением отдельных компонентов сборов витаминных (плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной) занимались разные специалисты в области фармакогнозии. Исследованием химического состава и вопросами совершенствования методик количественного определения биологически активных веществ (БАВ) плодов рябины обыкновенной занимались: Е.В. Сергунова, Л.А. Остроумов, Н.В. Исайкина, и плодов черной смородины – В.А. Куркин, Д.С. Круглов, И.П. Анисимович, плодов шиповника – Е.В. Сергунова, А.И. Сливкин. Однако работ, посвященных систематическому анализу витаминных сборов, их компонентов, а также водных и водно-спиртовых извлечений, с целью совершенствования НД, не достаточно. В ГФ XI изд. были включены фармакопейные статьи на плоды шиповника и рябины обыкновенной, однако уровень требований к контролю качества не соответствует тенденции развития современного института фармакопеи. На плоды черной смородины НД устарела. Весьма мало научных исследований посвящено изучению возможности создания новых

лекарственных форм (ЛФ) на основе компонентов, входящих в состав витаминных сборов.

Цели и задачи исследования. Целью настоящего исследования является фармакогностическое изучение витаминных сборов №1, №2 и отдельных компонентов для совершенствования и разработки нормативной документации.

Задачи, решаемые для достижения поставленной цели:

1. Провести информационно-аналитические исследования по химическому составу компонентов витаминных сборов №1 и №2 и методов их качественного и количественного анализа.
2. Провести углубленное морфолого-анатомическое изучение сборов и индивидуальных компонентов.
3. Провести качественный анализ БАВ гидрофильной фракции витаминных сборов и их компонентов
4. Установить количественное содержание суммы органических кислот, кислоты аскорбиновой и дубильных веществ в витаминных сборах и компонентах различными физико-химическими методами.
5. Разработать методики и определить содержание антоцианов, флавоноидов и каротиноидов в витаминных сборах и компонентах.
6. Изучить качественный состав и установить количественное содержание БАВ водных (настои) и водно-спиртовых (настойки) извлечений витаминных сборов и их компонентов. Провести анализ извлечений на наличие антимикробной и антимикотической активности.
7. Предложить проекты НД на витаминные сборы №1 и №2 и плоды смородины черной для включения в Государственную Фармакопею РФ.

Научная новизна исследования. Впервые проведено комплексное фармакогностическое исследование витаминных сборов №1 и №2, их отдельных компонентов. Показана применимость принципов «сквозной стандартизации» в цепочке «ЛРС – сбор – настой – настойка».

Разработаны методики определения флавоноидов в витаминных сборах и изучены условия реакции комплексообразования. Проведена валидация разработанных методик.

Предложена методика спектральной идентификации для доказательства подлинности плодов шиповника и витаминного сбора №1 по присутствию трех максимумов поглощения (патент № 2662059 от 28.12.2017).

Усовершенствованы методики количественного анализа каротиноидов, антоцианов и органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах.

Уточнены морфолого-анатомические характеристики сборов и компонентов и впервые доказана перспектива применения лазерного сканирующего микроскопа.

Предложена новая лекарственная форма для изучаемых объектов – настойка. Установлены качественные и количественные характеристики компонентов гидрофильной фракции настоек.

Доказана антимикробная и антимикотическая активность настоек (патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

Теоретическая значимость исследования заключается в разработке подходов к применению принципов «сквозной стандартизации» для анализа сборов из лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе; доказательстве возможности применения титриметрических методов в анализе сборов витаминных и ЛФ на их основе; выявлении влияния рН на селективность протекания реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом; в обосновании возможности применения лазерного сканирующего микроскопа для изучения морфологии плодов с поверхности.

Практическая значимость исследования заключается в совершенствовании методик контроля качества сборов для нормативной документации на витаминные сборы №1 и №2 и разработке проекта фармакопейной статьи (ФС) «Смородины черной плоды». В проектах ФС

автором предложена стандартизация витаминных сборов №1 и №2 по показателю «сумма органических кислот» методом потенциометрического титрования и уточнены характеристики подлинности по показателям «Внешние признаки» и «Микроскопия».

Разработанные методики внедрены в работу ООО Фирма «Здоровье» (акт внедрения от 23 мая 2018).

Изучена возможность выпуска витаминных сборов в форме настоек и доказана их антимикробная и антимикотическая активности. Предложены методики для подтверждения подлинности и количественного анализа настоек по основным группам БАВ.

Методология и методы исследования. Примерами исследований по изучению сборов, которые составили теоретическую основу диссертации, являются труды отечественных специалистов в области фармакогнозии – И.А. Самылиной, А.А. Сорокиной, В.А. Куркина, Н.В. Бобковой, В.Н. Бубенчиковой, Т.Д. Рендюк, и зарубежных ученых (Bieza K., Lois R., Kumamoto M., Rocha L., Nakanishi T., Sofija M. Djordjevic), чьи исследования были посвящены совершенствованию методов стандартизации ЛРС, сборов и лекарственных препаратов (ЛП) на их основе.

При выполнении работы были применены методы сравнительного, документированного анализа, комплекс физико-химических методов, микробиологических испытаний, методы математического анализа и обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты углубленного изучения внешних признаков и микроскопического анализа витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов.
2. Результаты разработки и совершенствования методик качественного и количественного анализа БАВ витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов.

3. Результаты качественного и количественного анализа БАВ в настоях (водные извлечения) витаминных сборов №1 и №2 и установление их антимикробной и антимикотической активности.
4. Результаты качественного и количественного анализа БАВ настоек из витаминных сборов №1 и №2 и установление их антимикробной и антимикотической активности.
5. Результаты совершенствования нормативной документации на витаминные сборы №1 и №2 и разработки проекта ФС «Смородины черной плоды».

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных во время исследования результатов подтверждена воспроизводимостью результатов при многократной повторности экспериментов, сопоставлением полученных результатов с литературными данными и их статистической обработкой. Доказана валидность предложенных методик количественного анализа. Научные положения и выводы диссертации базируются на достаточном количестве анализов.

Апробация результатов исследования. Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: Научно-практической конференции к 70-летию Ботанического сада Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова «Лекарственные растения Ботанического сада», Москва, 2016 г.; IV Международной научно-практической конференции «Научно – технический прогресс: актуальные и перспективные направления будущего», Кемерово, 2016 г.; Научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности», Москва, 2016 г.; V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», Москва, 2017 г.; XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и

лекарство», Москва, 2017 г.; Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине», Сочи, 2017 г.

Апробация диссертации прошла на совместной Научной конференции Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН и кафедры фармацевтического естествознания Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

Внедрение результатов исследования. Разработаны и поданы в ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ России проекты НД для включения в Государственную фармакопею РФ: проект ФС «Витаминный сбор №1»; проект ФС «Витаминный сбор №2» и проект ФС «Смородины черной плоды», которые включают в себя новые методики установления подлинности и содержание действующих групп БАВ.

Результаты диссертационного исследования используются в учебных процессах кафедры Биотехнологии и промышленной фармации ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет» (акт внедрения от 22.02.2018), Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН (акт внедрения от 29.05.2018), а также кафедры фармации факультета непрерывного образования филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» (акт внедрения от 08.12.2017). Разработанные методики внедрены в работу ООО Фирма «Здоровье» (акт внедрения от 23 мая 2018). Также результаты исследования вошли в монографию «Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе» А.И. Мараховой, А.А. Сорокиной, В.Ю. Жилкиной.

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, диссертант непосредственно участвовал в планировании, выполнении эксперимента и в обработке данных. Лично автором выполнены экспериментально-аналитические исследования по разработке методик качественного и количественного

анализа, осуществлена статистическая обработка и валидация, проведено обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии и выполнении всех этапов исследования: от постановки задач и их реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 3, 4, 6 паспорта научной специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из которых 1 монография, 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки России, 2 статьи и 1 тезисы в журналах, представленных в международных базах данных Scopus и Web of Science. По результатам исследования получено 3 патента на изобретения (патент № 2662059 от 28.12.2017, патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 215 страницах машинописного текста, содержит 78 таблиц и 76 рисунков; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 5 глав экспериментальных исследований, общих выводов и приложения. Список литературы содержит 216 источников, из них 40 – на иностранном языке.

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

В первой главе рассмотрены химический состав, фармакологические свойства и применение витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов, также описаны способы приготовления и методы контроля качества водных

и спиртовых извлечений из ЛРС; современные методы качественного и количественного анализа БАВ в ЛРС, таких как свободные органические кислоты, кислота аскорбиновая, фенольные соединения (флавоноиды, антоцианы, дубильные вещества и др.) и каротиноиды.

Во второй главе приведена характеристика изучаемых объектов – ЛРС и растительных препаратов, дано краткое описание методов анализа, приборов и реактивов, применяемых в работе и статистической обработки результатов анализа.

В третьей главе представлены результаты морфолого-анатомического изучения плодов смородины черной, шиповника, рябины обыкновенной и витаминных сборов №1 и №2, уточнены внешние признаки плодов.

В четвертой главе представлены результаты изучения подлинности и доброкачественности витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов. Показано обоснование норм числовых показателей витаминных сборов и плодов смородины черной, шиповника, рябины обыкновенной. Представлены результаты идентификации свободных органических кислот и кислоты аскорбиновой методом ТСХ и результаты исследований по идентификации органических кислот и флавоноидов методом ВЭЖХ в изучаемых объектах, а также результаты подтверждения подлинности витаминного сбора №1 и плодов шиповника методом дифференциальной спектрофотометрии.

В пятой главе представлены результаты анализа витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов. Изложены результаты по содержанию компонентов гидрофильной фракции (органических кислот, кислоты аскорбиновой, дубильных веществ, флавоноидов, антоцианов и полисахаридов); результаты исследований по разработке методик потенциометрического титрования, кулонометрического титрования и ВЭЖХ для определения суммы свободных органических кислот; результаты исследований по разработке методик дифференциальной спектрофотометрии для определения содержания суммы флавоноидов.

Шестая глава включает результаты исследования настоев из витаминных сборов и их компонентов. Показано преимущество применения разработанной методики потенциометрического титрования как в анализе ЛРС, так и в анализе настоев.

В седьмой главе представлены результаты по изучению возможности выпуска готовой лекарственной формы (ЛФ) – настойки витаминных сборов. Обоснован выбор оптимальной концентрации экстрагента для максимального извлечения БАВ; приведены результаты исследований токсичности, противомикробной и антимикотической активности водных и спиртовых извлечений из витаминных сборов №1 и №2; показано преимущество данной ЛФ перед традиционной (настои) в проявлении более выраженной антимикробной и антимикотической активности, большему содержанию основных БАВ и продолжительности хранения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика витаминных сборов

Лекарственные сборы представляют собой смесь нескольких видов растительного сырья, цельного или измельченного, иногда с примесью других ингредиентов, например, солей или эфирных масел. В состав сбора могут входить разные морфологические группы сырья, от корней до семян, однако в большинстве случаев встречаются измельченные листья и стебли, цельные цветки и цветочные корзинки, цельные или измельченные плоды [33, 39-42, 166, 175]. Компоненты сбора предварительно сушат в соответствии с правилами заготовки каждой морфологической группы в отдельности, что обеспечивает сохранение биологически активных веществ (БАВ).

Лекарственные сборы реализуются через аптечную сеть, отпускаются без рецепта. В частности, витаминный сбор №1, витаминный сбор №2 и поливитаминный сбор. Номенклатура и состав зарегистрированных витаминных сборов представлен в таблицах 1.1 и 1.2. Сборы применяются в основном в форме настоев и отваров, которые затем используются для лечения и профилактики заболеваний, в качестве основной или вспомогательной терапии [29, 65]. Лекарственные средства на основе витаминных сборов применяются для обогащения ослабленного после болезни организма витаминами, минеральными соединениями и другими полезными биологически активными веществами, содержащимися в растениях, а также как профилактическое средство для повышения иммунитета. Пациент готовит настои и отвары самостоятельно, на дому, согласно инструкции на пачке. Водное извлечение при комнатной температуре хранится не более двух суток [30, 126].

В отличие от лекарственных веществ, созданных в результате химического синтеза, лекарственные растительные сборы содержат более усвояемые органические вещества, поэтому при их использовании у

пациентов гораздо реже отмечаются аллергические осложнения и побочные эффекты. Кроме органических веществ ЛР содержат различные макро- и микроэлементы, (например, кальция 4-10 г/кг, магния 1-3 г/кг, калия 7-12 г/кг – в шиповнике; магния 100-150 мг/кг, цинка 34-60 мг/кг – в рябине обыкновенной), жизненно необходимые организму человека, также они богаты витаминами С и Р и оказывают как лечебное, так и регулирующее и общеукрепляющее действие [69, 76, 117, 118, 119].

В Государственный Реестр и в Государственной Фармакопее РФ включено около 40 лекарственных сборов, разрешенных к медицинскому применению (табл.1.1) [43].

Таблица 1.1

Классификация зарегистрированных лекарственных сборов

По назначению и способу применения		По фармакологическому эффекту	
для приготовления настоев и отваров	Species ad infusa et decocta	грудные	Species pectorales
курительные сборы	Species fumales	отхаркивающие	Sp. expectorantes;
для ванн	Species pro balneis	слабительные	Sp. laxantes;
для влажных припарок	Species ad cataplasmata	желудочные	Sp. stomachicae;
		успокоительные	Sp. sedativae;
		желчегонные	Sp. cholagogae;
		мочегонные	Sp. diureticae;
		потогонные	Sp. diaphoreticae;
		ветрогонные	Sp. carminativae;
		витаминные	Sp. vitaminicae
		для возбуждения аппетита	Sp. amarae;
		противогеморроидальные	Species antihæmorrhoidales
		для ингаляций	Species pro inhalationibus

Витаминные сборы №1, №2 и поливитаминный сбор были разрешены к медицинскому применению в 80-х годах. К настоящему времени фармкомпания ООО «Фирма Здоровье» выпускает Витаминный сбор №2. Срок действия государственной регистрации препарата Витаминный сбор №1 закончился. Поливитаминный сбор (плоды рябины и листья крапивы, 50:50) оказался технологически сложен в производстве и хранении –

происходило расслоение компонентов сбора, что не обеспечивало однородности всей субстанции, следовательно, не соответствовало требованиям ОФС.1.4.1.0020.15 Сборы. Поэтому настоящее исследование посвящено витаминным сборам №1 и №2 (табл.1.2).

Таблица 1.2

Номенклатура и состав зарегистрированных витаминных сборов [43]

Сборы витаминные	Состав	Выпускается / не выпускается	Форма выпуска
Витаминный сбор №1	плоды шиповника, плоды смородины черной (50% : 50%)	--	В пачках
Витаминный сбор №2	плоды шиповника, плоды рябины обыкновенной (50% : 50%)	+	В пачках
		--	В фильтр-пакетах
Поливитаминный сбор	листья крапивы, плоды рябины обыкновенной (30% : 70%)	--	В пачках

1.2. Требования НД к витаминным сборам №1 и №2

Качество витаминных сборов регламентируется нормативными документами (НД) – фармакопейная статья – ФС 42-2446-86 на витаминный сбор №1 и фармакопейная статья предприятия (ФСП) – ФСП 42-5075-07 на витаминный сбор №2, также в литературе есть статьи, направленные на разработку фармакопейных статей на компоненты витаминных сборов [54, 55, 132, 142, 160]. В существующих нормативных документах установлены показатели, определяемые во время приемки и стандартизации ЛРС (табл.1.3, 1.7).

При описании внешних признаков витаминных сборов №1 и №2 плоды смородины черной и рябины обыкновенной характеризуются как цельные плоды. Плоды шиповника в сборах используются в измельченном виде, как проходящие через сито диаметром 7 мм. Микроскопия сборов представлена анатомическими характеристиками отдельных компонентов. Хранят сборы в сухом, защищенном от света месте. Срок хранения для витаминного сбора №1 – 1 год и для витаминного сбора №2 – 2 года. Используют сборы для

приготовления водного извлечения, применяемого в качестве витаминного средства [19, 39, 65, 75, 95, 100, 125, 126, 131, 149].

В ФС на витаминный сбор №1 отсутствует характеристика порошка, потому что сбор выпускается фасованный в пачках, в фильтр-пакетах не выпускается. В ФСП на витаминный сбор №2 присутствует характеристика не только измельченного сырья, но и порошка, что предполагает выпуск данного сбора в фильтр-пакетах. Характеристики витаминных сборов по НД представлены в таблицах 1.3 и 1.7.

Таблица 1.3

Требования НД к витаминным сборам №1 и №2

Определяемые показатели. Норма по НД или определенное количество	Объект исследования	
	<i>Витаминный сбор №1</i>	<i>Витаминный сбор №2</i>
	<i>ФС 42-2446-86</i>	<i>ФСП 42-5075-07</i>
Внешний вид		
- измельченное сырье	+	+
- порошок	--	+
Микроскопия		
- измельченное сырье	+	+
- порошок	--	+
Качественные реакции		
- аскорбиновая кислота	+	+
- флавоноиды		+
Содержание кислоты аскорбиновой	не менее 0,2%	не менее 0,2%
Содержание суммы органических кислот	--	--
Влажность	не более 16%	не более 16%
Зола общая	не более 3%	не более 5%
Зола не растворимая в 10% HCl	--	не более 2%
Частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 7 мм	--	не более 10%
Частиц, проходящих сквозь сито размером 0,18 мм	--	не более 10%
Органической примеси	не более 0,5%	не более 0,7%
Минеральной примеси	не более 0,5%	не более 0,5%
Микробиологическая чистота	--	+
Упаковка		
- измельченное сырье	+	+
- порошок	--	+

При анализе НД на витаминные сборы можно сделать вывод, что не все разделы в настоящее время отражены в них полностью. Т.о. НД на сборы нуждаются в доработке, чтобы соответствовать требованиям ОФС «Сборы»

ГФ XIII изд. Поскольку витаминные сборы – это комплексные препараты, в которых фармакологический эффект обусловлен не только кислотой аскорбиновой, то рационально изучить содержание и других гидрофильных групп БАВ, таких как органические кислоты, флавоноиды, полисахариды и др. Кроме того необходимо рассмотреть возможность стандартизации сборов по содержанию БАВ водно- и спирторастворимых с целью включения в НД. Данный подход соответствует принципам «сквозной стандартизации», принятым в современной НД [148, 153].

1.3. Характеристика отдельных компонентов сборов

Сырьем для витаминных сборов №1 и №2 являются плоды шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной. Данный вид сырья должен отвечать современным требованиям НД, согласно ОФС «Плоды» ГФ XIII.

1.3.1. Химический состав, фармакологические свойства и применение плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной

Плоды шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной достаточно хорошо изучены, их химический состав включает различные виды БАВ: флавоноиды, липиды, органические кислоты, дубильные вещества, эфирные масла, углеводы, антоцианы, фенолкарбоновые кислоты, макро- и микроэлементы, аминокислоты [8, 13, 15, 180, 207]. В литературе представлены данные по содержанию различных БАВ в этих компонентах (табл.1.4).

Изучаемые плоды также являются источником микро- и макроэлементов, таких как K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Cr, Al, Sc, Ni, Sr, Pb, B, Se [85, 118, 119, 150].

Таблица 1.4

Химический состав плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной [22, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 38, 67, 70, 78, 84, 88, 107, 116, 117, 141, 167]

Группа БАВ	Содержание БАВ		
	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины
Органические кислоты			
аскорбиновая	2,0 – 5,5 %	40 - 200 мг%	570 мг%
сумма органических кислот (яблочная, лимонная, щавелевая, изовалериановая, сорбиновая, винная и др.)	3,0 %	4,0 %	5,4 %
Каротиноиды			
α-, β-каротин, ликопин, рубиксантин, криптоксантин и др.)	10 мг%	20 мг%	19 мг%
Фенольные соединения			
Флавоноиды (рутин, кверцетин, кемпферол, тилирозид, гиперозид и др.))	0,48 %	0,38 %	100 мг%
Антоцианы	0,07 %	0,16 %	0,72 %
Фенолкарбоновые кислоты	1,39 %	0,74 %	--
Дубильные вещества			
компоненты ДВ (галлокатехин, галловая к-та, эллаговая кислота)	4,5 %	7,8 %	1,4 %
Жирные кислоты			
линолевая, олеиновая, пальмитиновая, стеариновая	89,2 %	20 %	15 %
Витамины			
В17 (амигдалин), В1 (тиамин), В2 (рибофлавин), Е (токоферол), К1 (филлохинон)	81,2 мг%	71 мг%	228 мг%
Пектиновые вещества			
полисахариды, компоненты (галактуронозная к-та)	10 %	2,78 %	1,5 %
Углеводы			
моно- и дисахариды, полисахариды, L-сорбоза и др.	18 %	8 %	16 %

1.3.2. Биологическая активность изучаемого лекарственного растительного сырья

Биологическая активность изучаемых витаминных сборов обусловлена свойствами входящих в их состав компонентов. Поскольку любое лекарственное растительное сырье, содержит не одно вещество, а сумму веществ, то возможно проявление как основного фармакологического эффекта, так и сопутствующих (табл.1.5). Между различными БАВ возможно проявление синергизма или антагонизма. Например, флавоноиды усиливают капилляроукрепляющий эффект аскорбиновой кислоты [18, 19, 72, 175, 210].

Таблица 1.5

Проявление основных и сопутствующих фармакологических эффектов в плодах шиповника [175]

Фармакологический эффект	БАВ	Препараты
Капилляроукрепляющий и антиоксидантный	Кислота аскорбиновая	Настой, сироп
Регенерирующий	Каротиноиды	Каратолин
Регенерирующий	Витамины Е, F	Масло шиповника
Желчегонный	Флавоноиды	Холосас, настой
Иммуномодулирующий	Кислота аскорбиновая	Настой, сироп

Благодаря тому, что растительное сырье многокомпонентное и содержит целый ряд соединений, обладающих противомикробной и антимикотической активностью, то к препаратам на его основе не вырабатывается резистентность и отсутствует привыкание, а также количество побочных эффектов снижается до индивидуальной непереносимости [71, 133, 173].

Наличием органических кислот в изучаемых объектах обусловлены такие процессы как коррекция гипоксических состояний в виду их участия в энергетическом обмене (Маевский Е.И., 1973). Такой эффект возникает за счет окисления янтарной кислоты и образование энергии АТФ. Было установлено антикетогенное и антиацидотическое действие органических кислот [77].

Присутствие органических кислот (щавелевая, молочная, яблочная и др.) в ЛРС обуславливает возможность применения препаратов шиповника, смородины черной и рябины в качестве пребиотика, за счет стимулирования роста кишечной микрофлоры [51, 71].

Благодаря окислительно-восстановительной способности аскорбиновая кислота оказывает антиоксидантное воздействие, также снижает тканевую проницаемость. Участие витамина С в процессах ассимиляции и диссимиляции дает возможность регенерации кожи при различных повреждениях. В литературных данных показано, что кислота аскорбиновая оказывает противовоспалительное, диуретическое, а также бактерицидное действия, участвует в обмене аминокислот [48, 118].

Согласно литературным данным, содержащийся в плодах рябины амигдалин, оказывает радио- и рентгенозащитным эффект, защищает дыхательные ферменты от разрушения, а также участвует в восстановлении сульфгидрильных групп и защите жиров от перекисления [173].

В изучаемых плодах содержатся липофильные соединения, такие как каротиноиды, структурные компоненты которых оказывают противовоспалительный и противоопухолевый эффекты, являются основой зрительных пигментов. Препараты, содержащие каротиноиды, применяются для лечения авитаминозов содержащие значительное количество каротина и каротиноидов, оказывают рано- и язвозаживляющее, противовоспалительное действие [5, 38, 79, 121, 172, 205].

За счет содержания антоцианов препараты, содержащие извлечения из изучаемых плодов, обладают антиоксидантной активностью [177, 186], препараты на их основе применяются при лечении в афтольмологии [194, 195]. Согласно литературным данным, ряд проведенных исследований показали, что полифенолы смородины проявляют противораковую активность [199].

В плодах шиповника, рябины и смородины присутствуют флавоноиды (рутин, изокверцетрин, кемпферол, кверцетин и др.), оказывающие Р-

витаминный эффект. В комплексе с кислотой аскорбиновой усиливают действие друг друга при проявлении капилляроукрепляющего эффекта. Также они обладают иммуномодулирующим действием, оказывают желчегонный, кровоостанавливающий, противовоспалительный и антиоксидантный эффекты [16, 18, 89, 118, 210, 211, 212].

В изучаемых плодах немало важное значение имеет такая группа веществ как полисахариды. Было установлено иммуномодулирующие и противовоспалительное действие, также они выступают антикоагулянтами и детоксикантами [9, 17, 21, 28, 31, 48, 49, 66, 116, 129].

1.3.3. Характеристика НД на плоды шиповника, рябины и смородины черной

Качество отдельных компонентов сборов оценивается в настоящее время по следующим нормативным документам: плодов шиповника – по ФС 38 «Плоды шиповника» ГФ XI, плодов рябины обыкновенной – по ФС 39 «Плоды рябины» ГФ XI, плодов смородины черной – по ГОСТ 21450-75 «Плоды черной смородины». Анализ требований НД к плодам смородины черной, рябины и шиповника представлен таблицах 1.6, 1.7.

Анализ нормативной документации выявил, что плоды рябины и смородины черной не стандартизуются по действующим веществам [36, 41], а содержание суммы органических кислоты в плодах шиповника определяется титриметрическим методом, при котором индикация конечной точки титрования может вызвать затруднение [42]. ГОСТ на плоды смородины черной датируется 1975 г. и до сих пор остается без изменений [36, 75, 76].

Таблица 1.6

Требования НД к плодам шиповника, смородины черной и рябины

Определяемые показатели. Норма по НД	Объект исследования		
	<i>Плоды шиповника</i>	<i>Плоды рябины обыкновенной</i>	<i>Плоды смородины черной</i>
	ФС 38, ГФ XI	ФС 39, ГФ XI	ГОСТ 21450-75
Внешний вид			
- цельное сырье	+	+	+
- измельченное сырье	--	--	--
- порошок	--	--	--
Микроскопия			
- цельное	--	--	+
- измельченное сырье	+	--	--
- порошок	+	--	--
Качественные реакции	--	--	--
Содержание кислоты аскорбиновой	не менее 0,2%	--	--
Содержание суммы органических кислот	не менее 2,6%	--	--
Влажность	не более 15%	не более 18%	не более 18%
Зола общая	не более 3%	не более 5%	не более 5%
Зола не растворимая в 10% HCl	--	--	--
Других частей растения	не более 2%	не более 0,5%	не более 1%
Почерневших, пригоревших, поврежденных вредителями и болезнями плодов	не более 3%	не более 3%	не более 3%
Измельченных частиц плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм	не более 3%	--	--
Недозрелых плодов	не более 5%	не более 2%	не более 5%
Органической примеси	не более 0,5%	не более 0,5%	не более 1%
Минеральной примеси	не более 0,5%	не более 0,2%	не более 0,5%
Микробиологическая чистота	--	--	--
Упаковка			
- цельное	+	+	+
- порошок	--	--	--

Анализ НД на витаминные сборы и компоненты показал необходимость доработки ряда разделов ФС на плоды шиповника и плоды рябины, а также необходимость разработки ФС на плоды смородины черной (табл.1.7) [29, 36, 39, 40, 41, 42, 43].

Таблица 1.7

Сравнительный анализ методов качественного и количественного анализа витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов по НД

Объект исследования	БАВ	Методы анализа		НД
		Качественные реакции	Количественное определение	
Витаминный сбор №1	Аскорбиновая кислота	--	Индикаторное титрование	ФС 42-2446-86
Витаминный сбор №2	Аскорбиновая кислота	Цветные реакции	Индикаторное титрование	ФСП 42-5075-07
	Флавоноиды	Цветные реакции	--	
Плоды шиповника	Аскорбиновая кислота	--	Индикаторное титрование	ГФ XI
	Сумма органических кислот	--	Индикаторное титрование	ГФ XI
Плоды рябины обыкновенной	--	--	--	ГФ XI
	Сумма органических кислот	--	Индикаторное титрование	ФСП 42-0273-4943-04
	Каротиноиды	• ТСХ • Цветные реакции	--	
Плоды смородины черной	--	--	--	ГОСТ 2145-75

1.4. Методы анализа основных биологически активных веществ в витаминных сборах и их компонентах

Витаминные сборы используются для приготовления настоев, согласно ОФС «Настои и отвары» ГФ XIII изд.

Оценка качества настоев проводят в аптеках по показателям: анализ документации, правильность упаковки и оформления, органолептический контроль, отсутствие механических включений, отклонения в объеме [39, 40].

Согласно положениям, разработанным профессорами И.А. Самылиной и А.А. Сорокиной, НД на ЛРС должны включать несколько показателей качества по действующим веществам в зависимости от путей использования конечного сырья [97, 125, 128, 136, 137, 140, 151].

Т.о. если растительное сырье предназначено для приготовления водных извлечений, оно должно стандартизоваться по показателю, характеризующему содержание БАВ гидрофильной фракции. Такие методы будут способствовать улучшению контроля качества анализируемого ЛРС. В настоящее время подобный подход реализован в ФС ГФ XIII изд. Так, например, ранее контроль качества листьев мяты перечной и цветков ромашки аптечной проводился только по показателю «эфирное масло» (ГФ XI), в ФС ГФ XIII, контролю подвергаются уже 2 показателя: «эфирное масло» и «сумма флавоноидов» [39, 42].

1.4.1. Качественный анализ органических кислот

Основными группами БАВ для витаминных сборов являются органические кислоты, в том числе кислота аскорбиновая. Для идентификации органических кислот в ЛРС используются химические, физико-химические и хроматографические методы [2, 4, 73, 184]. К хроматографическим методам относятся: тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газожидкостная хроматография (ГЖХ).

Наиболее удобным и простым методом для определения органических кислот и кислоты аскорбиновой является тонкослойная хроматография (ТСХ). В современной НД рекомендуется использование пластинок Sorbfil, в качестве подвижной фазы применяют различные системы органических растворителей: этилацетат : ледяная уксусная кислота (80:20), н-бутиловый спирт : ледяная уксусная кислота : вода (4:1:2), этанол : уксусная кислота : вода (90:9:1) и др.[7, 14].

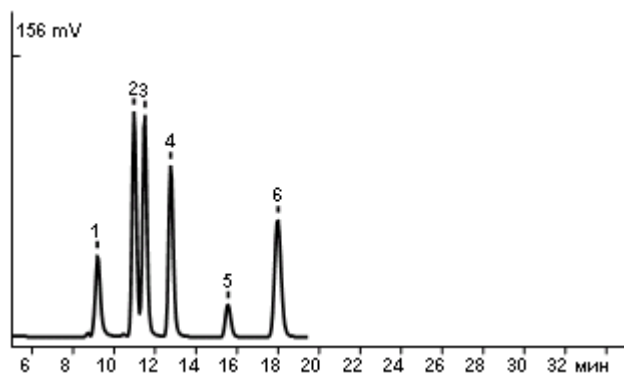
В качестве детектора, при применении первых двух фаз, используется раствор 2,6-дихлорфенолиндифенолята натрия, при использовании системы растворителей этанол : уксусная кислота : вода – 10% раствор фосфорномолибденовой кислоты в 96% этаноле. Идентификацию полученных пятен

абсорбции проводят в сравнении со стандартным образцом (СО) свидетеля – кислоты аскорбиновой [14, 46, 50, 142].

При хроматографировании смеси органических кислот необходимо регулирование pH растворителя, поскольку, как правило, пятна кислот разделяются неполностью и имеют форму комет. Такая форма пятен является результатом хроматографирования кислот с близкими значениями K_a . Проблемы такого рода возможно преодолеть предварительным изменением самих кислот (например, превращением их в гидроксаматы) или регуляцией pH растворителя. Для более четкого разделения при ТСХ кислот используют растворители повышенной кислотности или растворители, содержащие аммиак, например, этиловый спирт – аммиак, и pH-зависимые индикаторы для опрыскивания хроматограммы и индикации пятен (бромкрезоловый зеленый) [4, 142].

Метод ГЖХ обладает высокой селективностью, но требует применения высоких температур для перевода кислот в газопаровую фазу, что не подходит для термолабильной кислоты аскорбиновой. При использовании ГЖХ органические кислоты анализируются в виде метиловых эфиров. Для их получения эфирные экстракты упаривают и проводят метилирование сухого остатка раствором диазометана в смеси метанол – эфир (1:9). Растворы метиловых эфиров органических кислот упаривают досуха и растворяют в небольшом количестве изопропанола, который используют для введения в газовый хроматограф [165]. Идентификацию органических кислот проводят сравнением их относительных удерживаемых объемов с аналогичными объемами стандартных веществ. Для количественного определения кислот предварительно по стандарту строят калибровочный график [73]. Преимуществом этого метода является возможность использования малоочищенных экстрактов [1, 3, 142]. Также используют более перспективный вариант хроматографии метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии (GC/MS-MS) [198].

Фирма «Hewlett Packard» предложила методику определения органических кислот методом ВЭЖХ. Идентификацию проводят по времени удерживания индивидуальных соединений, а количественную оценку – определяя площади пиков [112, 158, 198]. На рисунке 1.1 приведен пример разделения стандартной смеси органических кислот. Подвижная фаза представлена 0.005н раствором серной кислоты, температура колонки 20°C, объем пробы 20 мкл.



Компоненты:

1. Щавелевая кислота
2. Лимонная кислота
3. Винная кислота
4. Яблочная кислота
5. Молочная кислота+
- Янтарная кислота
6. Уксусная кислота

Рис.1.1. Хроматограмма смеси органических кислот

1.4.2. Качественный анализ флавоноидов

Для идентификации флавоноидов значение имеют методы, обладающие такими преимуществами как быстрота и точность определения, обнаружение даже незначительных количеств и возможность выделения отдельных флавоноидов из растительного сырья. К таким методам относятся ВЭЖХ, хроматоспектрофотометрия, спектрофотометрия, фотоэлектроколориметрия, денситометрия с использованием хроматографии на бумаге и в тонком (закрепленном и незакрепленном) слое сорбента. Наибольший интерес представляют методики, основанные на принципах широкодоступных аналитических методов, таких как спектрофотометрия [80-82, 201, 203].

Методики спектрофотометрии флавоноидов основаны на реакциях образования комплексов с ионами алюминия или железа (III), ограниченно

пригодны для выполнения массовых анализов, так как лежащие в их основе фотометрические реакции являются кинетически замедленными [100, 145].

Спектрофотометрический метод основан на определении оптической плотности раствора анализируемых веществ при определенной длине волны [105, 191]. Для флавонов и флавонолов, в частности, для рутина характерны два максимума поглощения — коротковолновый (260 нм) и длинноволновый (362 нм), что может быть использовано не только с целью идентификации веществ, но в плане количественной оценки, особенно в условиях дифференциальной спектрофотометрии [80, 81, 98, 202, 204]. Однако у флавонолов с замещенной 3-гидроксильной группой (метилованной или гликозилированной) полоса I (328-357 нм) перекрывает область полосы I флавонов, а общая форма спектральных близка спектрам флавонов (табл.1.8).

Таблица 1.8

Полоса I в УФ-спектрах флавонов и флавонолов

Тип флавоноидов	Количество исследуемых соединений	Диапазон полосы I, нм
Флавоны	50	304-350
Флавонолы (замещенные по 3-гидроксилу)	36	328-357
Флавонолы (свободный 3-гидроксил)	27	352-385

Этот метод, предложенный изначально Христом и Мюллером (1960) для анализа растительных образцов, несколько раз подвергался модификации. В литературе достаточно примеров исследований хелатов с Al (III) для оценки общего содержания флавоноидов. Среди трудов современников можно выделить исследования Куркина В.А., Евдокимову О.В., Матющенко Н.В., Степанову Т.А., Марахову А.И. [52, 80, 100], определявших присутствие рутина и других флавоноидов в растительных образцах, Квека и коллег [192] (определение галангина в прополисе), команды Ордонеза и Хена [74] (кверцетин в растительных образцах). Более подробный список представлен в таблице 1.9 [10, 33, 41, 42, 44, 81, 83, 85, 166, 171, 175, 188, 191, 201, 202, 204, 208].

Таблица 1.9

Примеры исследований хелатирования Al (III) для оценки общего содержания флавоноидов

Образец, ссылка на источник	Р-р Al(III)	Среда	Время, мин	λ макс, нм	Определяемое соединение
Травы	10%	1 капля HCl	40	404	Рутин
Прополис	2%	Ледяная CH ₃ COOH	30	415	Галангин
Травы	2%	-	60	420	Кверцетин
Травы	1,5%	-	2	415	Кверцетин
Душица	2%	-	10	430	Рутин
Арония	10%	CH ₃ COOK	30	415	Кверцетин
Фрукты	2%	-	10	415	Катехин
Экстракт трав	10%	CH ₃ COOK	30	415	Рутин
Травы	0,1 М	CH ₃ COOK	20	410	Рутин
Чай	25г/л	CH ₃ COONa	15	430	Рутин
Мёд	10%	NaNO ₂ +NaOH	11	510	Кверцетин
Вино	1%	NaNO ₂ +NaOH	5	510	Катехин
Имбирь	10%	NaNO ₂ +NaOH	10	430	Кверцетин
Капуста	10%	NaNO ₂ +NaOH	6	510	Кверцетин
Травы	10%	NaNO ₂ +NaOH	5	510	Кверцетин

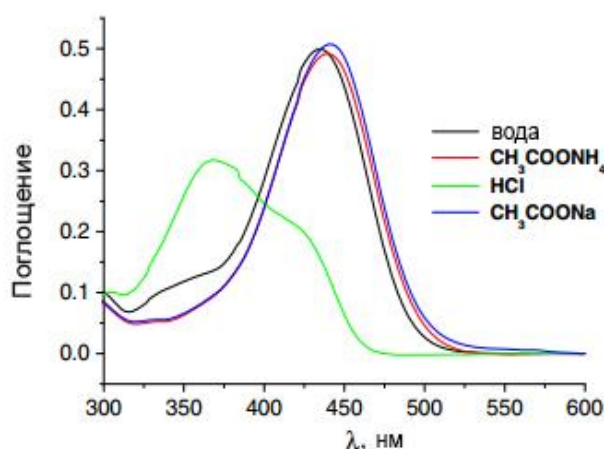


Рис. 1.2. Спектры поглощения кверцетина (100 мкМ) в присутствии AlCl₃ (2%, г/л) в различных реакционных средах

Анна Пекал и Кристина Пиржинска [202] проверили влияние реакционной среды, взяв в качестве модели спектр кверцетина, полученный в присутствии HCl, ацетатных солей (CH₃COONa и CH₃COONH₄) и без них. В каждом случае добавлялось одно и то же количество вещества. Как видно из рис.1.2, спектры комплекса кверцетина с алюминием в безводной среде в присутствии обеих ацетатных солей свидетельствуют о сильном пике

поглощения при 425-430 нм. Продукт состоит из двух молекул кверцетина, связанных с ионом алюминия. Дениел и Маммен [193] выявили $\lambda_{\text{макс}}$ для этого комплекса – 426 нм в присутствии CH_3COOK , в то время как без добавления ацетата максимальная длина волны составила 445 нм. Однако комплекс алюминий-кемпферол показал в ходе исследования аналогичный максимум (424 нм), как в присутствии, так и в отсутствие CH_3COOK . Исследования подтвердили, что добавление ацетата соли (в виде CH_3COONa или $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) не является необходимым условием, поскольку значения длины волны, рекомендованной для измерения оптической плотности первым способом, оказались эквивалентны. В кислых средах наблюдалось полное исчезновение поглощения кверцетиновым лигандом при 369 нм и количественно небольшое образование комплекса алюминий-кверцетин со стехиометрией 1:1 ($\lambda_{\text{макс}}$ 425 нм). Применимость реакции комплексообразования алюминий-флавоноид в соответствии была исследована и для других классов семейства флавоноидов. Максимальное поглощение флавонолами (кверцетином, морином, кемпферолом и рутином) наблюдалось при 415-425 нм, наименьшее значение поглощения наблюдалось для кемпферола [204].

В хроматоспектрофотометрическом методе сочетаются два подхода — хроматографическая очистка суммы или индивидуальных флавоноидов и последующее спектрофотометрическое определение целевых веществ. Хроматоспектрофотометрический метод может осуществляться в различных 34 модификациях, но в целом их можно разделить на 2 группы:

1-ая. Хроматографическое отделение флавоноидов от сопутствующих веществ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) или бумажной хроматографии (БХ) (например, определение рутина в ЛРС). Методики количественного определения рутина в траве гречихи посевной и бутонах софоры японской основаны на хроматоспектрофотометрии, причем в первом случае используется хроматография на бумаге, а во втором — ТСХ. В обоих случаях, используют прием отделения рутина от сопутствующих

флавоноидов, а затем измеряют оптическую плотность элюата. В методиках используют ГСО рутина. 2-ая. Хроматографическое отделение флавоноидов от сопутствующих веществ методом колоночной хроматографии (например, леспедеца копеечниковая) [5, 8, 14, 50, 82].

В основу разработанного метода количественного определения суммы флавоноидов в надземной части леспедецы положено выделение суммы флавоноидов и определение оптической плотности раствора в этиловом спирте при длинноволновом максимуме поглощения (353 нм) с последующим расчетом процентного содержания по удельному показателю поглощения чистого гомоориетина (лютеолин-6-С- β -D-глюкопиранозид) [20, 55, 104, 154].

1.4.3. Методы количественного определения органических кислот

Для количественного определения органических кислот, в том числе и кислоты аскорбиновой в основном применяется титрование, инструментальные и физико-химические методы.

В ФС 38 «Шиповника плоды» ГФ XI издания описана методика определения суммы органических кислот алкалиметрически — титрование извлечения натрия гидроксидом в присутствии смеси индикаторов фенолфталеина и метиленового синего, до появления лиловой окраски в пене [142]. Для количественного определения кислоты аскорбиновой в литературе описаны такие методы окислительно-восстановительного титрования как броматометрия, йодатометрия, титрование 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. В их основе лежит восстановление окислителя за счет эквивалентного окисления кислоты аскорбиновой [185, 213].

Однако перечисленные методы не лишены недостатков. Наиболее важным из них является то, что кислотность анализируемых водных извлечений различна, а окраска кислотно-основных индикаторов зависит от рН среды. Визуальная индикация конечной точки титрования в силу различной чувствительности глаза каждого человека и вследствие

собственной окраски извлечений затруднена. В таком случае применение индикатора становится возможным только после сильного разведения анализируемого извлечения, но при этом снижается и точность полученных результатов. В связи с этим, индикаторное титрование часто дает завышенные результаты, с высокой относительной ошибкой, так же требуется предварительная стандартизация титранта (табл.1.8) [144].

Для определения кислоты аскорбиновой в ЛРС используются фотоколориметрия и спектрофотометрия. Эти методики основаны на реакции взаимодействия аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия (метод Тильманса) или жёлтым фосфорномолибденовым гетерокомплексом [144, 185, 213]. При применении оптических методов могут возникать ошибки связанные с оптической активностью сопутствующих веществ, поэтому их использование не всегда приемлемо.

Наиболее перспективными являются такие физико-химические методы, как потенциометрия, кулонометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография [2, 6, 7, 188].

Возможность применения потенциометрического титрования изучалась в работах А.И. Мараховой, А.А. Сорокиной, Е.В. Сергуновой [95, 96, 99, 101, 143, 151, 152]. В данных работах показаны примеры успешного применения потенциометрического детектирования конечной точки титрования (к.т.т.) при количественном определении суммы органических кислот и дубильных веществ в ЛРС. В качестве объектов анализа использовали такие морфологические группы как травы, листья, плоды, корни, корневища, корни, а также настои и отвары, полученные из данного ЛРС.

Большой опыт применения кулонометрического титрования для анализа ЛРС представлен в работах С.Г. Абдуллиной, О.А. Лиры, Н.М. Агаповой, Г.К. Будникова, А.И. Мараховой и Е.В. Сергуновой [2, 3, 4, 6, 101]. В основном анализу подвергались такие морфологические группы как листья, кора, корневища, корни.

Несмотря на большой опыт применения данных методов в анализе ЛРС, морфологическая группа плоды, а также препараты на их основе в данных исследованиях представлена в недостаточном объеме. Т.к. вопросы стандартизации ЛРС и препаратов на его основе в России на данный момент актуальны, в связи с тенденцией увеличения доли растительных препаратов, то разработка методик потенциометрии и кулонометрии для количественного анализа ЛРС и препаратов на его основе остается перспективной.

Сравнительный анализ физико-химических методов для оценки количественного содержания БАВ представлен в таблице 1.10.

Таблица 1.10

Сравнительный анализ методов количественного определения БАВ

Титриметрический анализ	
<i>Достоинства</i>	<i>Недостатки</i>
• Простота оборудования	• Затруднение индикации к.т.т. вследствие окраски анализируемых объектов • Требуется предварительной стандартизации титранта • Переход окраски индикатора в определенном диапазоне pH • Требуется сильное разбавление анализируемого извлечения
Потенциометрия	
<i>Достоинства</i>	<i>Недостатки</i>
• Фиксируется скачек потенциала индикаторного электрода, что обеспечивает более точное детектирование к.т.т. • Возможность производить измерения в окрашенных растворах и растворах, содержащих осадок • Позволяет разделять компоненты смеси в одном анализируемом образце при существенном различии их электрохимических свойств • Не требуются стандарты • Простота калибровки	• Несколько длительный процесс, вследствие смещения точки титрования в сторону щелочной реакции для слабых органических кислот • В некоторых случаях неустойчивость потенциала или медленное его установление
Кулонометрия	
<i>Достоинства</i>	<i>Недостатки</i>
• Нет необходимости в приготовлении титранта, поскольку собственным стандартом служит постоянная Фарадея • титрант не дозируют и не стандартизуют, так	• Длительность процесса • Потребляемый ток может частично расходоваться на прохождение побочной реакции, в результате чего выход по току

как генерируется электрохимически непосредственно в присутствии анализируемого вещества • высокочувствительный метод, с помощью него можно определить до 10^{-9} г вещества в анализируемом извлечении	снижается и становится менее 100%
Спектрофотометрия	
<i>Достоинства</i>	<i>Недостатки</i>
• Способность работать в узкой области оптимального светопоглощения • Применим для анализа многокомпонентных систем • Позволяет работать не только с окрашенными веществами, но и с бесцветными, поглощающими в УФ и (ближней инфракрасной) БИК областях спектра • Позволяет проводить количественное определение веществ в широком интервал длин волн (185-1100 нм)	• Низкая селективность из-за наложения спектров поглощения веществ • Необходимо приготовление стандартного раствора или серии стандартных растворов
ВЭЖХ	
<i>Достоинства</i>	<i>Недостатки</i>
• Высокая скорость анализа • Разделяющая способность • Высокая чувствительность • Возможность многократного использования хроматографических колонок • Большой спектр веществ для анализа	• Длительность и сложность пробоподготовки • Требуется сложное оборудование и высококвалифицированный персонал • Необходимость подбора специальных условий и колонок для разделения растительных экстрактов
ГЖХ	
<i>Достоинства</i>	<i>Недостатки</i>
• Узкие проявительные полосы • Большие скорости потока, что ускоряет цикл анализа • Широкий выбор неподвижных фаз, что позволяет разделять смеси с близкими температурами кипения • Линейность изотерм адсорбции	• Верхний предел температуры хроматографической колонки определяется летучестью и стабильностью неподвижной фазы, практически трудно подобрать неподвижную фазу для низкокипящих газов • Требуется установка газовых баллонов и высококвалифицированный персонал

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 1

1. Химический состав плодов шиповника, рябины обыкновенной, смородины черной и витаминных сборах №1 и №2 представлен комплексом биологически активных веществ, обуславливающим

широкий спектр фармакологической активности: органические кислоты, флавоноиды, кислота аскорбиновая, каротиноиды и т.д.

2. Нормативная документация на витаминные сборы и отдельные компоненты устарела и не соответствует требованиям, предъявляемым современными стандартами.
3. Основные группы БАВ витаминных сборов №1 и №2 и отдельных компонентов представлены аскорбиновой кислотой и органическими кислотами, поэтому целесообразно проводить контроль качества по показателям «сумма органических кислот» и «кислота аскорбиновая».
4. Для идентификации кислоты аскорбиновой и суммы органических кислот используются такие методы как ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ.
5. Для определения содержания суммы органических кислот и кислоты аскорбиновой в ЛРС, в витаминных сборах и отдельных компонентах известны различные методики, такие как ВЭЖХ, ГЖХ, титриметрия, спектрофотометрия. В анализе ЛРС чаще всего применяются титриметрические методы, отличающиеся простотой выполнения, дешевизной, возможностью автоматизации процесса.
6. Преимущество в определении конечной точки титрования принадлежит физико-химическим методам (потенциометрия и кулонометрия) по сравнению с индикаторным титрованием.
7. Потенциометрия, кулонометрия и ВЭЖХ являются перспективными методами для точного определения органических кислот в ЛРС и в водных извлечениях, где их концентрация довольно низкая.
8. Официальными ЛФ витаминных сборов и их отдельных компонентов служат настои, применяемые как витаминные средства. Перспективным направлением является исследование возможности получения других ЛФ, пригодных для промышленного выпуска и изучения их фармакологической активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами следования служили промышленные образцы плодов шиповника и рябины обыкновенной, и образцы плодов смородины черной, заготовленные в Брянской и Московской областях, а также модельные образцы витаминных сборов №1 и №2, водные и водно-спиртовые извлечения из сборов и компонентов. Объекты исследования и их характеристики приведены в таблице 2.1. Используемое сырье отвечает требованиям действующей нормативной документации фирм-производителей АО «Красногорсклексредства» и ООО «Фирма «Здоровье».

Таблица 2.1

Объекты исследования и их характеристики

<i>Объекты исследования</i>	<i>Характеристика</i>	<i>Производитель / срок заготовки</i>	<i>Количество серий (образцов) / образцов, заготовленных в разные годы</i>	
Плоды шиповника	высушенные	промышленный образец – ООО «Фирма «Здоровье»	9	P N003750/01
				РУ № ЛСР-002623/09
				РУ №Р N001184/01
				№ партии 010117
Плоды рябины обыкновенной	высушенные	промышленный образец – ОАО «КРЛС»	8	P №ЛС-002720
				№ ЛСР-002521/07
Плоды смородины черной	высушенные	заготовленные в Брянской и Москов. обл., в 2014 и 2017 гг.	7	
Витаминный сбор №1	высушенные	модельный образец	8	
Витаминный сбор №2	высушенные	модельный образец / промышленный образец «КРЛС»	8	P № ЛСР-006437/08
Настои из витаминных сборов	Водное извлечение	получены по методике ГФ XIII ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары»	20	
Настои из компонентов витаминных сборов	Водное извлечение	получены по методике ГФ XIII ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары»	16	
Настойки из витаминных сборов	Спиртовое извлечение	получены методом перколяции, применяли	22	

		в качестве экстрагента этанол 70, 50, 40% концентрации	
Настойки из компонентов витаминных сборов	Спиртовое извлечение	получены методом перколяции, применяли в качестве экстрагента этанол 70, 50, 40% концентрации	17

Примечание: «КРЛС» - ОАО «Касногорсклексредства»

Сушку плодов черной смородины проводили в сушильном шкафу при температуре 60 – 80°C согласно инструкции по заготовке и сушке ЛРС. После окончания сушки сырье помещали в бумажные пакеты и хранили в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи ГФ XIII изд. «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» в сухом, чистом, хорошо вентилируемом помещении.

Определение влажности проводилось по методике, представленной в общей фармакопейной статье ГФ XIII ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья» в шкафу сушильно-стерилизационном ШСС-80п, УХЛ 4.2 (ТУ 64-1-909-80), Россия и на приборе «Анализатор влажности MF-50», AND, Япония.

Определение коэффициента водопоглощения проводили согласно методике, представленной в ГФ XIII ОФС.1.5.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья» в инфундирном аппарате с перфорированным дном.

Определение pH водных извлечений проводили с помощью pH-метра «Анион 4100» (ГФ XIII ОФС.1.2.1.0004.15 Ионметрия).

Качественное обнаружение проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в восходящем токе растворителей (ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» ГФ XIII) при температуре 20°C с применением пластинок Sorbfil в системах: этилацетат : ледяная уксусная кислота (80:20) (кислота аскорбиновая) и 95% этанол : аммиак концентрированный (16:4,5) (сумма органических кислот).

- a. Стеклянная хроматографическая камера фирмы «Merck», Германия.
- b. Пульверизатор для опрыскивания хроматографических пластинок, «Merck», Германия.
- c. Для идентификации кислоты аскорбиновой применяли детектор 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия, а для кислот — бромкрезоловый зеленый.

Количественное определение суммы органических кислот и кислоты аскорбиновой проводили титриметрическим методом с использованием индикаторов по методике, представленной в частной фармакопейной статье 38 «Плоды шиповника» ГФ XI изд., вып. 2 и по ОФС 42-0114-09 «Методы количественного определения витаминов».

Определение содержания свободных органических кислот методом потенциометрического титрования проводили по методике ОФС.1.2.1.19.0002.15 «Потенциометрическое титрование» ГФ XIII с помощью рН-метра «Анион 4100».

Определение содержания суммы органических кислот проводили методом кулонометрического титрования с помощью прибора «Эксперт-006» при силе тока 5 мА.

Определение содержания суммы органических кислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии согласно методике ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», представленной в ГФ XIII. Применяли хроматограф жидкостный Agilent 1100, оснащенный диодноматричным детектором, программно-аппаратным комплексом сбора и обработки результатов ChemStation.

Спектры поглощения извлечений сборов, плодов и препаратов на их основе снимали на спектрофотометре «Lambda-950» Perkin Elmer, США, для измерений применяли кюветы длиной 10 мм.

При определении антоцианов руководствовались методикой, представленной в фармакопейной статье ГФ XIII изд., ФС.2.5.0002.15 «Аронии черноплодной свежие плоды».

При определении дубильных веществ применяли методику перманганатометрического титрования, описанную в фармакопейной статье ОФС.1.5.3.0008.15 Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ГФ XIII изд. (метод I).

Реактивы, применяемые в качественном и количественном анализе, готовились по методикам, указанным в ГФ XIII изд., ОФС.1.3.0001.15: алюминия хлорида спиртовой раствор 2 %, фенолфталеина раствор 0,1%, метиленового синего спиртовой раствор 0,1%, раствор гидроксида натрия, раствора калия йодата, раствор калия ацетата, раствора 2,6-дихлорфенолиндифенолята натрия, раствор уксусной кислоты 30%. Все реактивы, используемые в анализе были квалификации не ниже «чистые для анализа» (ч.д.а.).

При разработке методик в качестве стандартных образцов (СО) применяли: рутин (CAS 153-18-4, $\geq 99,0\%$), лютеолин (CAS 497-70-3, $\geq 99,5\%$), кислоту L-аскорбиновую (CAS 50-81-7, $\geq 99,0\%$), кислоту сорбиновую (CAS 110-44-1, $\geq 99,0\%$), кислоту лимонную (CAS 5949-29-1, $\geq 99,5\%$), кислоту D,L-яблочную (CAS 6915-15-7, $\geq 99,0\%$), кислоту фумаровую (CAS 110-17-8, $\geq 99,0\%$), кислоту винную (CAS 87-69-4, $\geq 99,5\%$) - производство Sigma-Aldrich, США.

Плотность настоек определяли в соответствии с фармакопейной статьей ОФС.1.2.1.0014.15 «Плотность» ГФ XIII (метод 1).

Определение противомикробной и антимикотической активности витаминных сборов №1 и №2 определяли диско-диффузионным методом в агаре на твердых питательных средах. В качестве тест-культур использовали штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Валидацию разработанных методик анализа проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», также

Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Н.В. Юргель и др., 2007).

Статистическую обработку экспериментально полученных данных проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ РФ, с использованием критерия Стьюдента.

Микроскопию витаминных сборов проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», ГФ РФ, с помощью микроскопа NIKON ECLIPSE LV100N POL, а также 3D-лазерного сканирующего микроскопа OLYMPUS OLS 4100.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ И ВИТАМИННЫХ СБОРОВ №1 И №2

В качестве объектов исследования использовались образцы цельных плодов черной смородины, собранных (Брянской и Московской областях, 2014-2017 гг., высушенные воздушно-теневым способом) и серийные образцы цельных плодов рябины и плодов шиповника (АО «Красногорсклексредства», Р № ЛС-002720 и ООО «Фирма «Здоровье», Р № 003750/01), измельченные плоды шиповника, соответствующие ФС № 38 ГФ XI; порошок плодов черной смородины, полученный измельчением в ступке и просеиванием через сито с размером отверстий 2 мм; образцы сборов витаминных №1 (плоды шиповника и плоды смородины черной) и №2 (плоды шиповника и плоды рябины обыкновенной), приготовленных в лабораторных условиях.

Описание морфологических и анатомо-диагностических признаков сырья и сборов осуществлялось в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0001.15 «Лекарственное растительное сырье (ЛРС) и фармацевтические субстанции растительного происхождения», ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в ЛРС и лекарственных растительных препаратах (ЛРП)», ОФС.1.5.1.0007.15 «Плоды», ОФС.1.4.1.0020.15 «Сборы», ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и ЛРП».

Внешние признаки ЛРС и сборов исследовались невооруженным глазом и с помощью 3D-лазерного сканирующего микроскопа OLYMPUS OLS 4100, при увеличении 5х, 10х и 20х.

Анатомо-диагностические признаки ЛРС и сборов были установлены с помощью микроскопа NIKON ECLIPSE LV100N POL в проходящем и поляризованном свете. Измерения выполнялись с помощью 5х, 10х, 20х, 100х окуляр-микрометра.

3.1. Морфолого-анатомическое изучение витаминного сбора №1

Внешние признаки. Сбор представляет собой смесь высушенных цельных плодов черной смородины и измельченных плодов шиповника.

При исследовании сбора невооруженным глазом видны:

– Плоды - ягоды, шаровидной формы, шаровидной формы черного или черно-фиолетового цвета с морщинистой блестящей поверхностью, диаметром 4-10 мм. На верхушке плода находится плохо отделяющийся высохший остаток околоцветника светло-коричневого цвета, 2 мм высота, 4 мм диаметр основания. У основания может оставаться фрагмент плодоножки. Сочный перикарпий содержит 30 семян. Семена имеют яйцевидную форму, заостренные на верхушке, уплощенные с боков, матовые, с морщинистой поверхностью, размером 2,6 мм в длину, 1,2 мм в ширину, 0,9 в толщину. При смачивании водой характер поверхности семян становится слизистым.

При исследовании фрагмента сухого плода с поверхности при помощи сканирующего микроскопа при 10-кратном увеличении наблюдается блестящая волнисто-морщинистая поверхность перикарпия с заметным мелко-ячеистым строением экзокарпия. Эфиромасличные железки наблюдаются в виде желтоватых сморщенных мешочков размером 0,2 мм, выступающих над поверхностью экзокарпия.

Поверхность семени при 5-кратном увеличении сканирующего микроскопа – матовая, покрыта гребневидными морщинами (рис.3.2). (*Плоды черной смородины*)

– Кусочки гипантия - твердые, хрупкие, с одной стороны блестящие, реже матовые, более или менее морщинистые; с другой - покрытые жесткими щетинистыми волосками; цвет от оранжево-красного до буровато-красного красно-коричневого и красновато-черного цвета; продолговатые плодики-орешки светло-желтого цвета, слегка сдавленные с боков со слабо выраженными гранями.

При исследовании фрагментов орешков при помощи сканирующего микроскопа на поверхности наблюдается обилие простых волосков с гладкой

поверхностью, заостренной верхушкой и блестящей полостью; волоски расположены на желтоватом ячеистом эпидермисе преимущественно на верхушке и у основания плода-орешка. Наружная поверхность гипантия блестящая, мелко ячеистая с углублениями и впадинами; внутренняя – матовая мелкоморщинистая, опушенная беловатыми прямыми волосками (рис.3.1). (*Плоды шиповника*)

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения кисловатый.

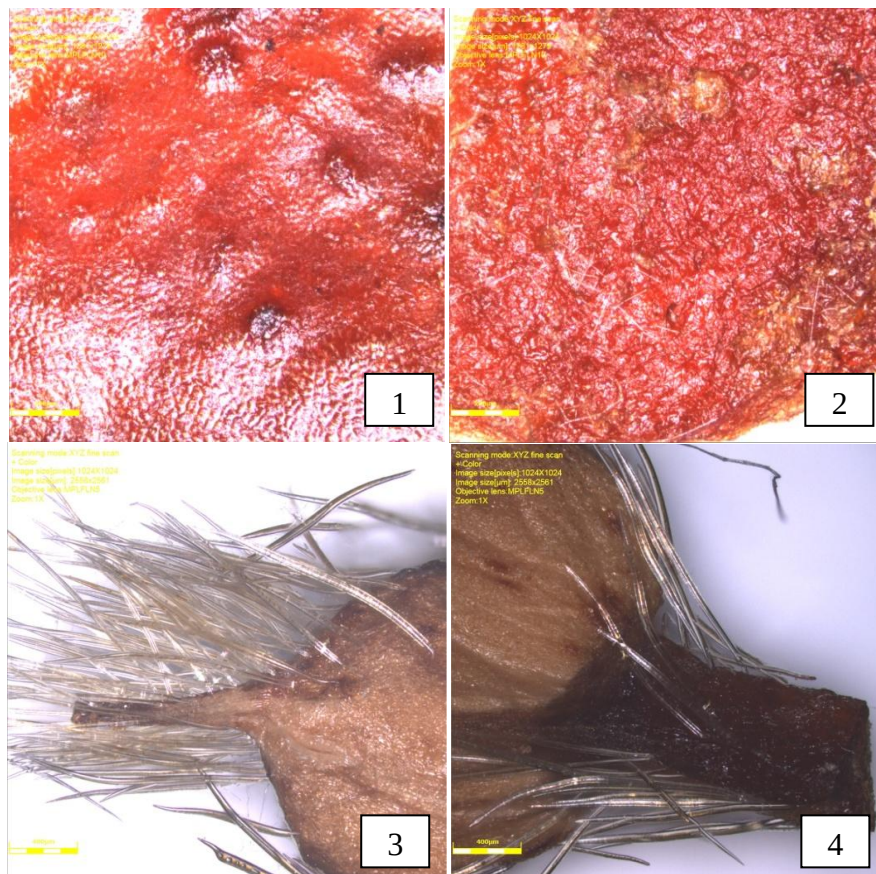


Рис.3.1. Шиповника плоды. Внешние признаки:

1-наружная поверхность гипантия (10х); 2-внутренняя поверхность гипантия (10х);
3,4-плодик-орешек (5х)

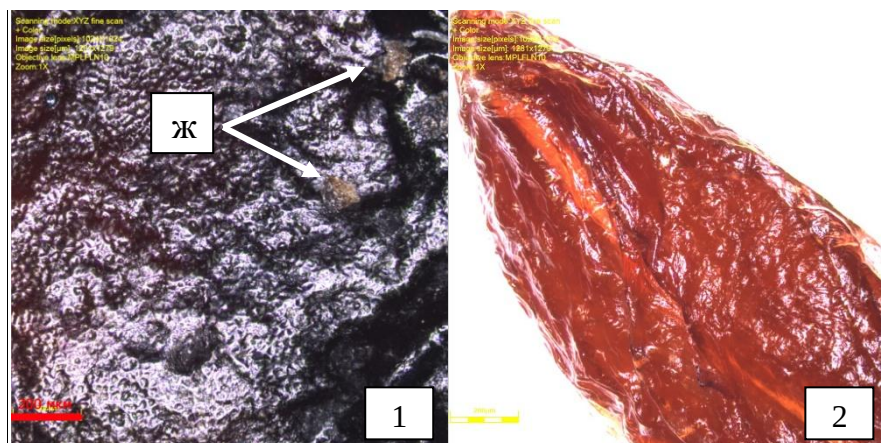


Рис.3.2. Смородины черной плоды. Внешние признаки:
1-экзокарпий с поверхности (10х) (ж -эфиромасличная железа); 2-семя (10х)

Микроскопия. Для микроскопического исследования использовали следующие микропрепараты:

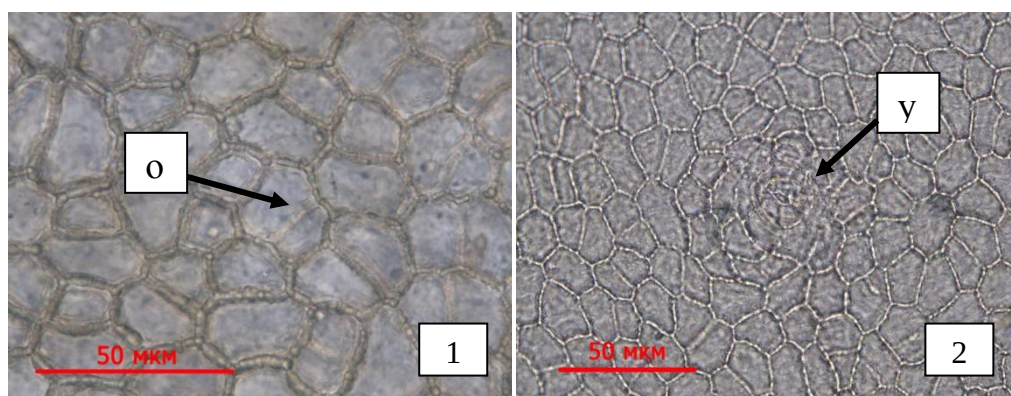
1) *препарат экзокарпия плодов черной смородины с поверхности* (с размягченных плодов, выдержанных 1 сутки в воде, затем 5 суток в смеси этанол – глицерин (1:1), пинцетом снимали экзокарпий);

2) *давленный препарат перикарпия (околоплодника) черной смородины и фрагментов гипантия плодов шиповника* (согласно ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и ЛРП», раздел «Плоды и семена»)

3) *поперечный срез семени черной смородины* (согласно ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и ЛРП», раздел «Плоды и семена»)

– При рассмотрении препарата экзокарпия с поверхности видны многоугольные клетки эпидермиса шириной от 17-21 мкм и длинной от 25 до 40 мкм с прямыми неравномерно утолщенными стенками, выраженной «четковидной» утолщенностью (рис.3.3) [23, 25, 54]. Иногда встречаются клетки «окончатого» строения (когда группа из двух эпидермальных клеток имеет по периметру стенки намного толще, чем стенки между ними) (рис.3.3) [23, 54, 138]. Устьица встречаются редко, они округлые и слегка удлиненные, шириной около 20 мкм, длинной около 30 мкм, окружены розеткой из 6-8 (чаще 7) эпидермальных клеток. Такой устьичный комплекс, несмотря на

встречающиеся в литературе [54] данные, скорее относятся не к аномоцитному, а актиноцитному типу (рис.3.3). На эпидермисе, особенно ближе к верхушке плода встречаются простые одноклеточные волоски с шероховатой кутикулой, длиной от 30 до 300 мкм, часто дугообразно согнутые. Встречаемость [45] устьиц на эпидермисе 0-7 на 1мм^2 . На эпидермисе, особенно ближе к верхушке плода встречаются простые одноклеточные волоски с шероховатой кутикулой, длиной от 30 до 300 мкм, часто дугообразно согнутые (рис.3.3). Встречаемость волосков составляет 0-70 на 1мм^2 . Эпидермальные клетки вокруг волосков располагаются радиально, такие же розетки клеток эпидермиса можно наблюдать вокруг мест прикрепления отвалившихся волосков. Важным диагностическим признаком эпидермиса плодов черной смородины являются эфиромасличные железки. Они – круглые, крупные (диаметром 170-210 мкм), щитковидные (пельтатные) со слабо дифференцированными полигональными выделительными клетками. Железки имеют желтовато-золотистый цвет за счет содержащегося в них эфирного масла (рис.3.3). В местах отпавших железок наблюдаются группы толстостенных, как правило, пигментированных эпидермальных клеток, вокруг которых располагаются радиально ориентированные тонкостенные клетки эпидермиса. Встречаемость железок составляет 0-7 на 1мм^2 .



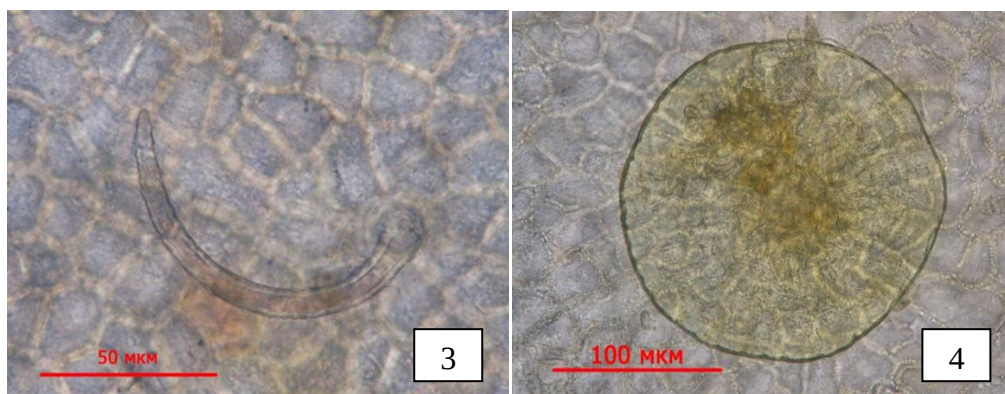


Рис. 3.3. Смородины черной плоды. Экзокарпий:
1-эпидермис с «четковидной» утолщенностью (о-«окончатое» строение) (500х); 2-
актиноцитный устьичный комплекс (у- устьице) (500х); 3-волосок (1000х); 4-
эфиромасличная железка (1000х)

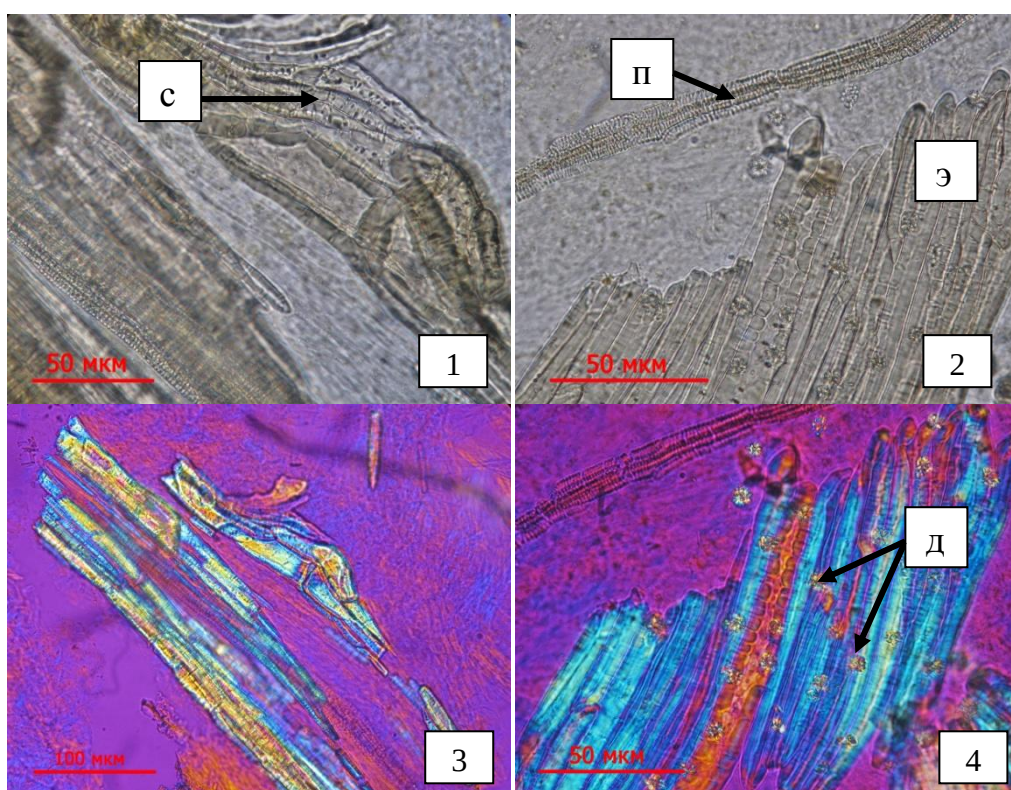


Рис. 3.4. Смородины черной плоды. Мезокарпий:
1,2 – стереом в проходящем свете (с- склереиды, п- сосудисто-проводящие элементы, э-
«паркетобразный» эндокарп) (1000х); 3,4 – стереом в поляризованном свете (д – друзы
оксалата кальция) (500х)

В давленом препарате околоплодника видны разновеликие тонкостенные паренхимные клетки мезокарпия, некоторые из них содержат желтовато-коричневое содержимое. Наблюдаются участки сосудисто-проводящих элементов, состоящих из узких (толщиной 8-12 мк) спиральных трахеид, собранных в разные по толщине группы. Некоторые, как правило,

наиболее крупные пучки имеют механическую обкладку из веретеновидных волокон и удлинённых склереид неправильной формы с сильно утолщенными пористыми стенками (рис.3.4). В поляризованном свете данный стереом визуализируется ярким голубовато-желтым свечением (рис.3.4). Диагностическую значимость для плодов черной смородины имеет «паркетобразный» эндокарп [24], который можно наблюдать в препарате околоплодника. Он представляет собой совокупность удлинённых тупоконечных толстостенных склеренхимных клеток с толстыми одревесневшими пористыми стенками длиной около 125-210 мкм, толщиной до 12-30 мкм, собранных в группы, которые в свою очередь, разнонаправленно ориентированы. В поляризованном свете клетки эндокарпа имеют голубое и красно-кирпичное свечение (рис.3.4). Стереом эндокарпа сопровождается примыкающими к нему мелкими тонкостенными паренхимными клетками с друзами оксалата кальция диаметром около 8 мкм, которые хорошо визуализируются в поляризованном свете (рис.3.4).

На поперечно-радиальном срезе семени четко различаются семенная кожура и эндосперм (рис.3.5). Семенная кожура, согласно литературным данным [54], имеет сложное многослойное строение. Она включает эпидермис, подстилающие его хлорофиллоносные клетки паренхимы, кристаллоносный слой, слой уплотнённых коричневатых клеток. Основная часть семени представлена эндоспермом, отделённым от семенной кожуры бесструктурным гиалиновым слоем перисперма (рис.3.5).

В препаратах семени, выполненных по традиционным фармакопейным методикам, диагностическое значение будут иметь не все перечисленные анатомические образования. Хорошо различимыми и поэтому диагностически значимыми являются: эпидермис семенной кожуры, состоящий из очень крупных слизистых палисадных клеток, высотой более 100 мкм светло-коричневого цвета, часто отслаивающийся; кристаллоносный слой семенной кожуры, темно-коричневого цвета, состоящий из так называемых U-образных клеток (с сильно утолщенными внутренней и

боковыми стенками), каждая из которых содержит призматический кристалл оксалата кальция размером около 10 мкм; гиалиновый слой перисперма, отделяющий семенную кожуру от эндосперма, хорошо визуализируется в поляризованном свете желтым или голубым свечением; эндосперм, состоящий из полигональных толстостенных клеток с включениями капель жирного масла и алевроновых зерен (рис.3.5). (*Плоды черной смородины*)

– При исследовании гипантия с поверхности виден наружный эпидермис [24, 42], состоящий из многоугольных клеток с неравномерно утолщенными стенками, благодаря чему эпидермис имеет «окончатое» строение. Устьичный аппарат аномоцитного типа встречаются крайне редко; обрывки паренхимы, состоящие из округлых или овальных тонкостенных клеток с друзами диаметром 5-30 мкм или кристаллами оксалата кальция длиной 5-20 мкм, а также хромопластами, содержащими красно-оранжевый пигмент. Внутренний эпидермис гипантия [24, 42] состоит из тонкостенных «паркетобразно» расположенных полигональных удлиненных и изодиаметричных клеток и опушен крупными толстостенными одноклеточными волосками, с полостью внутри и длиной до 2 мм. Вокруг мест прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку. В поляризованном свете волоски и кристаллические образования визуализируются белым свечением, механические элементы (узкие веретенообразные склереиды вдоль проводящих пучков) – голубым и желтоватым (рис.3.6). (*Плоды шиповника*)

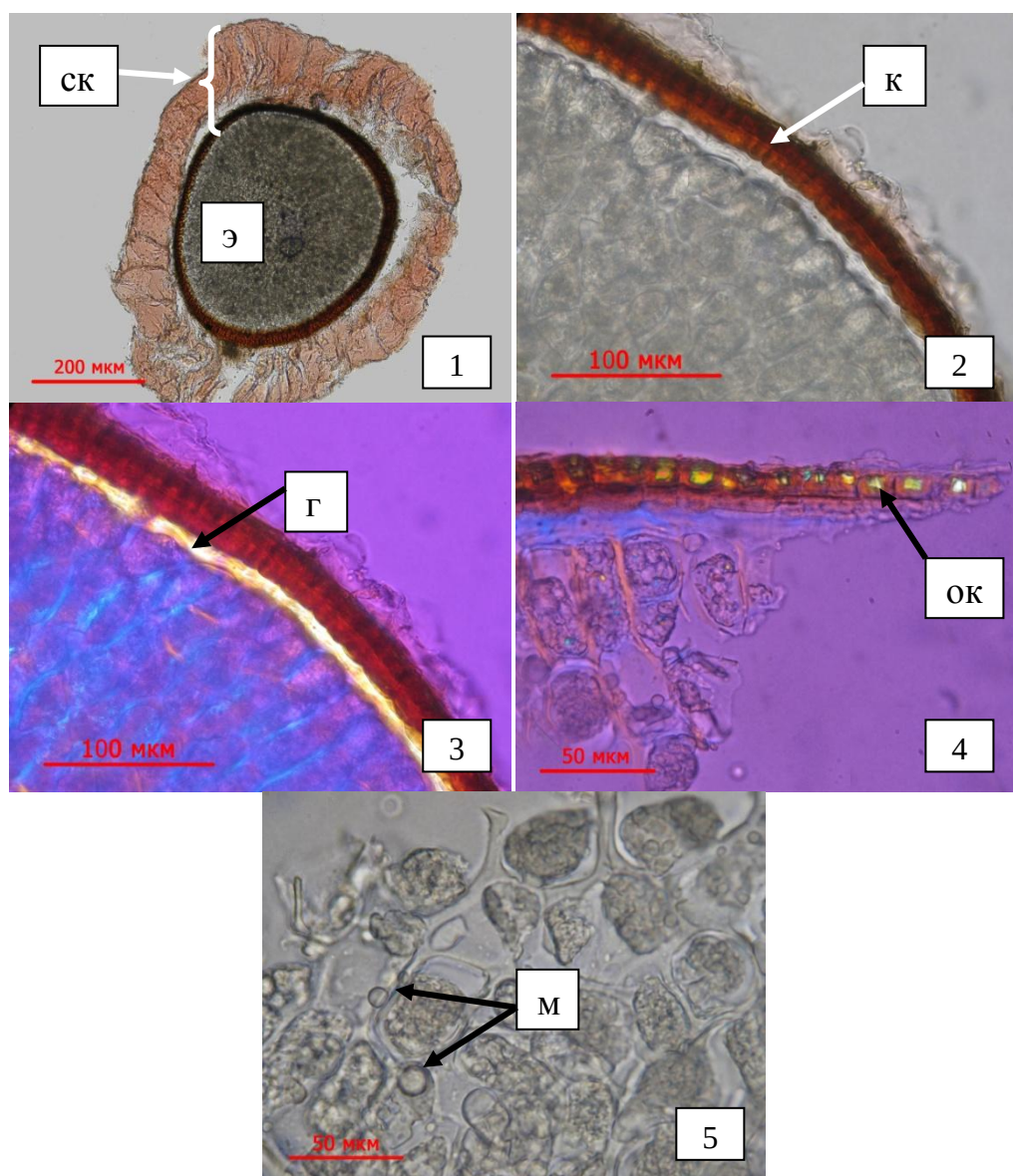
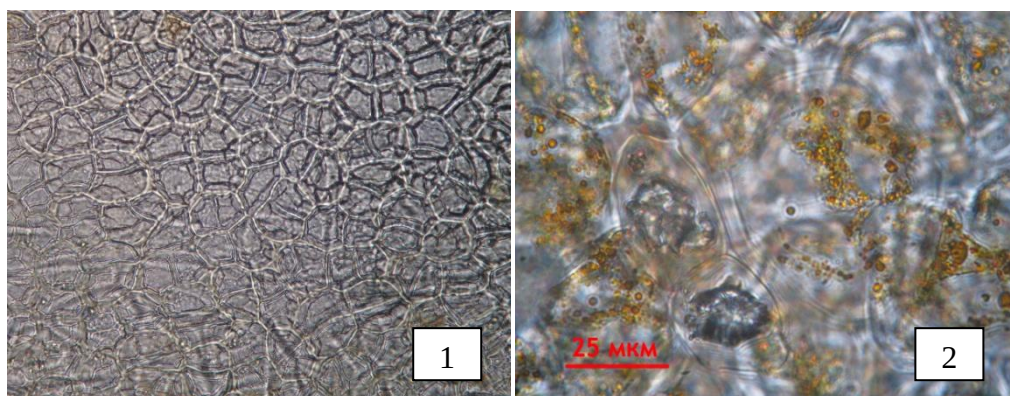


Рис.3.5. Смородины черной плоды. Поперечно-радиальный срез семени:
 1,2,5 – в проходящем свете (ск- семенная кожура (100х), э- эндосперм (100х), к –
 кристаллоносный слой (500х), м- жирное масло (1000х)); 3,4 – в поляризованном свете (г-
 гиалиновый слой (500х); ок- кубические кристаллы оксалата кальция (1000х))



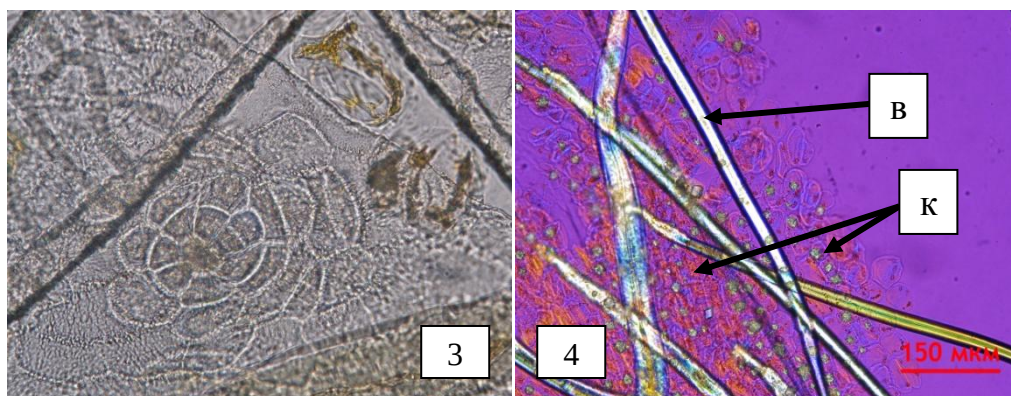


Рис.3.6. Шиповника плоды:

1–наружный эпидермис гипантия (500х), 2-клетки паренхимы с друзами и хромопластами (1000х), 3-место прикрепления волоска (200х), 4- механические элементы в поляризованном свете (в-волоски, к- кристаллы оксалата кальция) (100х)

Микроскопия порошка. Для приготовления препаратов использовалась фармакопейная методика ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и ЛРП», раздел «Плоды и семена, порошок»). Однако более качественные микропрепараты были получены согласно методике [23, 24]:

Около 0,1 г порошка помещали в химический стакан на 50 мл, приливали 5-10 мл 2,5 % раствора NaOH и кипятили в течение 30-60 секунд, после чего порошок дробно промывали 100-150 мл дистиллированной воды методом декантации при условии практически полного осаждения частиц сырья. Последний раз воду осторожно сливали, лопаточкой или скальпелем порошок переносили в каплю включающей жидкости (раствор глицерина (1:1) или раствор хлоралгидрата), накрывали покровным стеклом, слегка надавливали на него обратной стороной препаровальной иглы для равномерного распределения жидкости под стеклом и рассматривали под микроскопом.

В поле зрения микроскопа видны: фрагменты экзокарпия с характерным строением эпидермиса, устьицами, волосками и железками (см. цельное сырье); участки мезокарпия с клетками паренхимы, механическими и проводящими элементами, друзами оксалата кальция (см. цельное сырье); обрывки семенной кожуры (клетки слизистого слоя – крупные, светло-

коричневые, клетки кристаллоного слоя - многоугольные, желтоватые, размером от 12 до 17 мкм, внутри которых наблюдаются призматические кристаллы оксалата кальция, визуализирующиеся в поляризованном свете желтым и голубым свечением); клетки эндосперма с включениями капель жирного масла и алевроновых зерен (рис.3.7). (*Плоды смородины черной*)

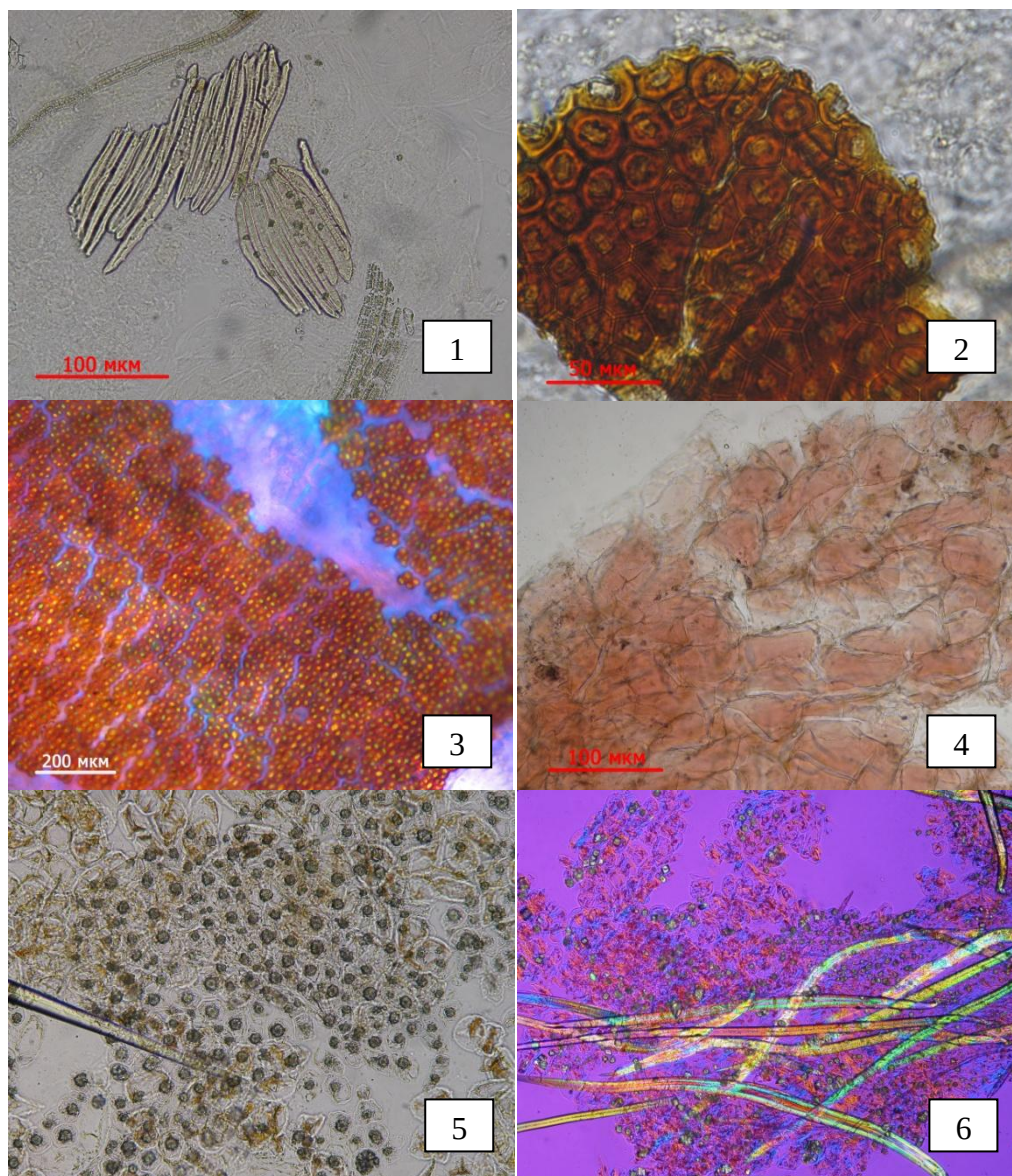


Рис. 3.7. Элементы порошка витаминного сбора №1:

1 – механические и проводящие элементы (спиральные сосуды, эндокарп, кристаллы оксалата кальция) (200х); 2 – обрывки семенной кожуры (1000х); 3 – кристаллоносный слой (50х); 4 – клетки слизистого слоя (200х); 5- друзы оксалата кальция (200х); 6-волоски и друзы оксалата кальция в поляризованном свете (50х)

3.2. Морфолого-анатомическое изучение витаминного сбора №2

Внешние признаки. Сбор представляет собой смесь высушенных цельных плодов рябины обыкновенной и измельченных плодов шиповника.

При исследовании сбора невооруженным глазом видны:

– Плоды яблокообразные красноватого, желтовато-оранжевого или буровато-красного цвета, без плодоножек, 2-5-гнездные, округлые или овально-округлые, в поперечнике до 9 мм, блестящие, сильно морщинистые, на верхушке с остающейся чашечкой из пяти малозаметных смыкающихся зубчиков. Мякоть плода рыхлая, мясистая, сверху покрыта кожицей [139]. В мякоти плода находятся семенные гнезда, имеющие твердые стенки, сросшиеся с мякотью.

В семенных гнездах плода (которых может быть от 2 до 5) находятся семена (2-5). Они продолговатые, слегка серповидно-изогнутые, с острыми концами и гладкой твердой красновато-коричневой кожурой.

При исследовании поверхности плодов при помощи сканирующего микроскопа наблюдается гладкая блестящая оранжевая поверхность экзокарпия с неглубокими впадинами и заметным делением на полигональные клетки; на верхушке у чашечки – войлочное опушение длинными белыми волосками (рис.3.8). **(Плоды рябины обыкновенной)**

– кусочки гипантия - твердые, хрупкие, с одной стороны блестящие, реже матовые, более или менее морщинистые; с другой - покрытые жесткими щетинистыми волосками; цвет от оранжево-красного до буровато-красного красно-коричневого и красновато-черного цвета; продолговатые плодики-орешки светло-желтого цвета, слегка сдавленные с боков со слабо выраженными гранями.

При исследовании фрагментов орешков при помощи сканирующего микроскопа на поверхности наблюдается обилие простых волосков с гладкой поверхностью, заостренной верхушкой и блестящей полостью; волоски расположены на желтоватом ячеистом эпидермисе преимущественно на верхушке и у основания плода-орешка. Наружная поверхность гипантия

блестящая, мелко ячеистая с углублениями и впадинами; внутренняя – матовая мелкоморщинистая, опушенная беловатыми прямыми волосками (рис.3.1). (*Плоды шиповника*)

Запах слабый, специфический. Вкус водного извлечения кисловато-горьковатый.

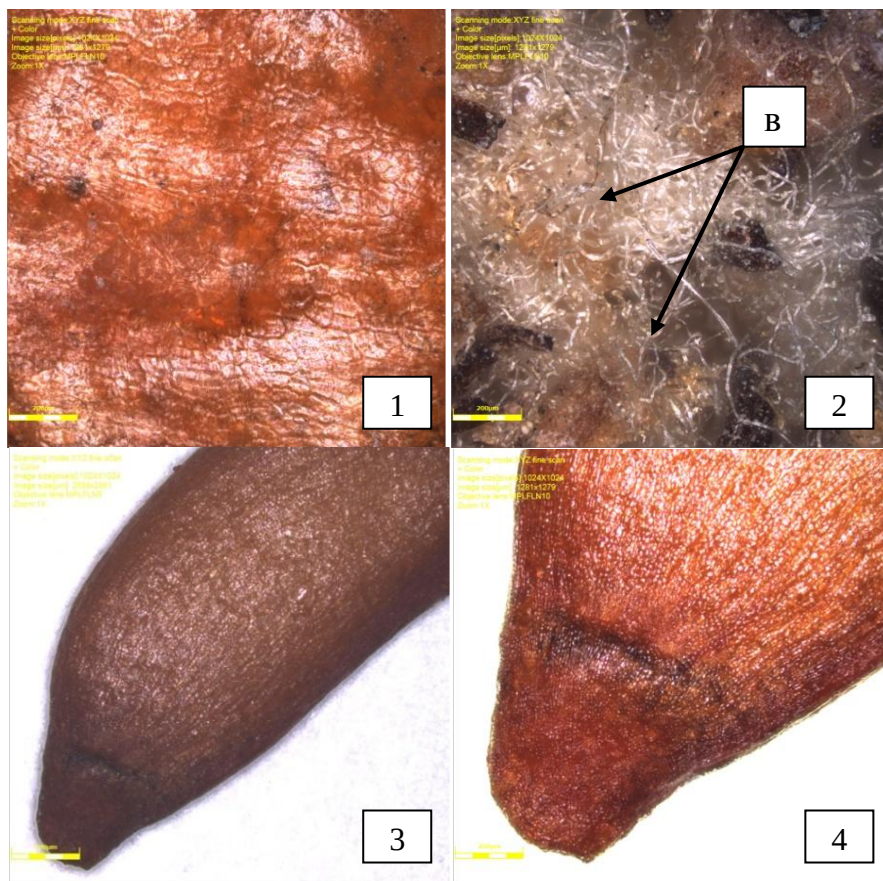


Рис. 3.8. Рябины плоды. Внешние признаки:

1-наружная поверхность экзокарпия (10х), 2-опушенная чашечка (10х) (в -волоски); 3,4-семя (5х и 10х)

Микроскопия. Для микроскопического исследования использовали следующие микропрепараты:

- 1) *препарат экзокарпия плодов рябины с поверхности* (с размягченных плодов (кипячением в воде в течение 5 минут), пинцетом снимали экзокарпий);
- 2) *давленный препарат перикарпия рябины и фрагментов гипантия плодов шиповника* (согласно ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и ЛРП», раздел «Плоды и семена»)

3) *давленный препарат семени рябины* (согласно ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и ЛРП», раздел «Плоды и семена»)

– При исследовании микропрепаратов экзокарпа с поверхности видны: прямостенные эпидермальные клетки с неравномерно утолщенными боковыми стенками характерного «окончатого» строения; в клетках экзокарпа включения каротиноидов [24, 25] в виде капель оранжевого цвета; устьичный комплекс аномоцитного типа (встречаются крайне редко); простые одноклеточные толстостенные извилистые волоски (рис.3.9).

При исследовании микропрепаратов мезокарпа видны: тонкостенные, округлые, часто деформированные клетки паренхимы с хромопластами оранжевого цвета; каменистые клетки разнообразной формы – отдельные или группами, округлые, удлинённые, веретеновидные с различной толщиной стенок и многочисленными порами; оксалат кальция в виде многочисленных мелких кубических кристаллов (4-5 мкм), призматических кристаллов и друз (20-30 мкм); фрагменты проводящих пучков, часто сопровождаемых узкими веретеновидными склереидами (рис.3.10).

Эндокарп представляет собой пласты плотно прилегающих к друг другу прямоугольных и полигональных удлинённых паркетобразно расположенных клеток.

Семенная кожура покрыта эпидермисом, состоящим из ослизняющихся тонкостенных полигональных тангентально удлинённых клеток. Под эпидермисом расположены широкополостные тупоконечные пористые волокна светло-коричневого цвета. В поляризованном свете на фоне основных тканей контрастно визуализируется стереом (механические элементы) и кристаллические образования в виде беловатого, голубого и желтого свечения. (*Плоды рябины обыкновенной*)

– При исследовании гипантия с поверхности виден наружный эпидермис [42], состоящий из многоугольных клеток с неравномерно

утолщенными стенками, благодаря чему эпидермис имеет «окончатое» строение [24, 139]. Устьичный комплекс аномоцитного типа встречаются крайне редко; обрывки паренхимы, состоящие из округлых или овальных тонкостенных клеток с друзами диаметром 5-30 мкм или кристаллами оксалата кальция длиной 5-20 мкм, а также хромопласты, содержащие каротиноиды красно-оранжевого цвета. Внутренний эпидермис гипантия состоит из тонкостенных «паркетобразно» [139] расположенных полигональных удлинённых и изодиаметричных клеток и опушен крупными толстостенными одноклеточными волосками, заостренными с обоих концов и полостью внутри длиной до 2мм. Вокруг мест прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку. В поляризованном свете волоски и кристаллические образования визуализируются белым свечением, механические элементы (узкие веретенообразные склереиды вдоль проводящих пучков) – голубым и желтоватым (рис.3.6). (*Плоды шиповника*)

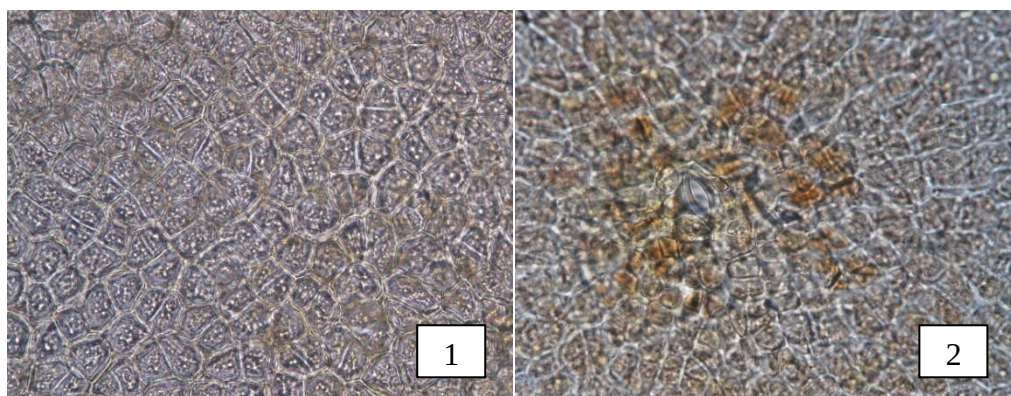
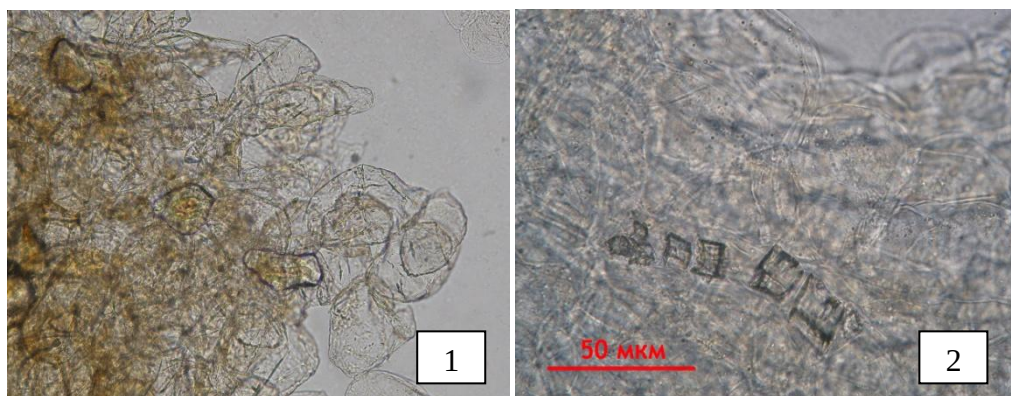


Рис. 3.9. Рябины обыкновенной плоды. Экзокарпий с поверхности:
1-эпидермальные клетки «окончатого» строения с включением каротиноидов (200х); 2-
устьичный комплекс (200х)



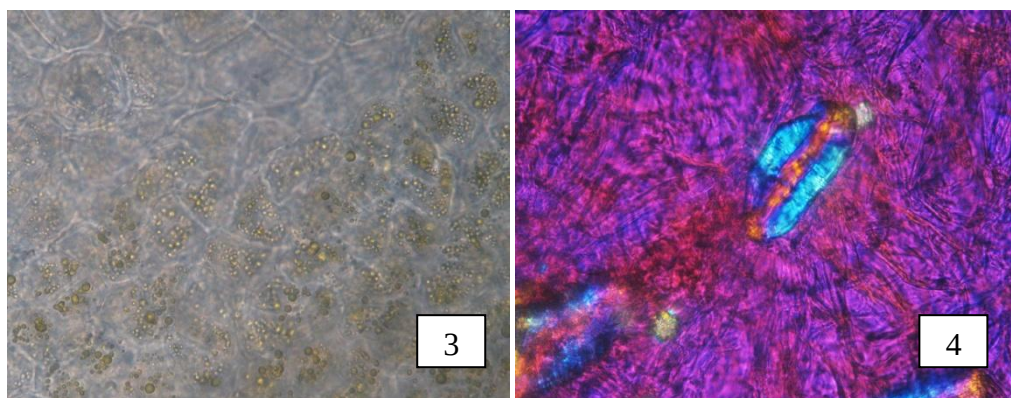


Рис. 3.10. Рябины обыкновенной плоды. Мезокарп плодов:
1-каменистые клетки (500х) 2-призматические кристаллы (500х);
3- клетки паренхимы с хромопластами (500х); 4-каменистые клетки в поляризованном свете (1000х)

Микроскопия порошка. При рассмотрении микропрепарата порошка сбора в поле зрения микроскопа видны [24]:

– фрагменты гипантия как с поверхности, так и в поперечном сечении, ткани плодов-орешков: эпидермис, сходный по строению с внутренним эпидермисом гипантия, с подстилающими его пластами, плотно прилегающих друг к другу удлинённых толстостенных пористых клеток, а также группы или отдельные каменистые клетки (рис.3.11) (*Плоды шиповника*);

– фрагменты экзокарпа и мезокарпа, частицы эндокарпа, обрывки семенной кожуры и тканей зародыша. Эндокарп представляет собой пласты плотно прилегающих к друг другу прямоугольных и полигональных удлинённых «паркетобразно» расположенных клеток; семенная кожура покрыта эпидермисом, состоящим из ослизняющихся тонкостенных полигональных тангентально удлинённых клеток. Под эпидермисом расположены широкополостные тупоконечные пористые волокна светло-коричневого цвета. В порошке также встречаются фрагменты проводящих пучков, часто сопровождаемых узкими веретеновидными склереидами; длинные одноклеточные толстостенные извилистые волоски и ткани зародыша семени, выделяющие крупные капли жирного масла (рис.3.11) (*Рябины обыкновенной плоды*).

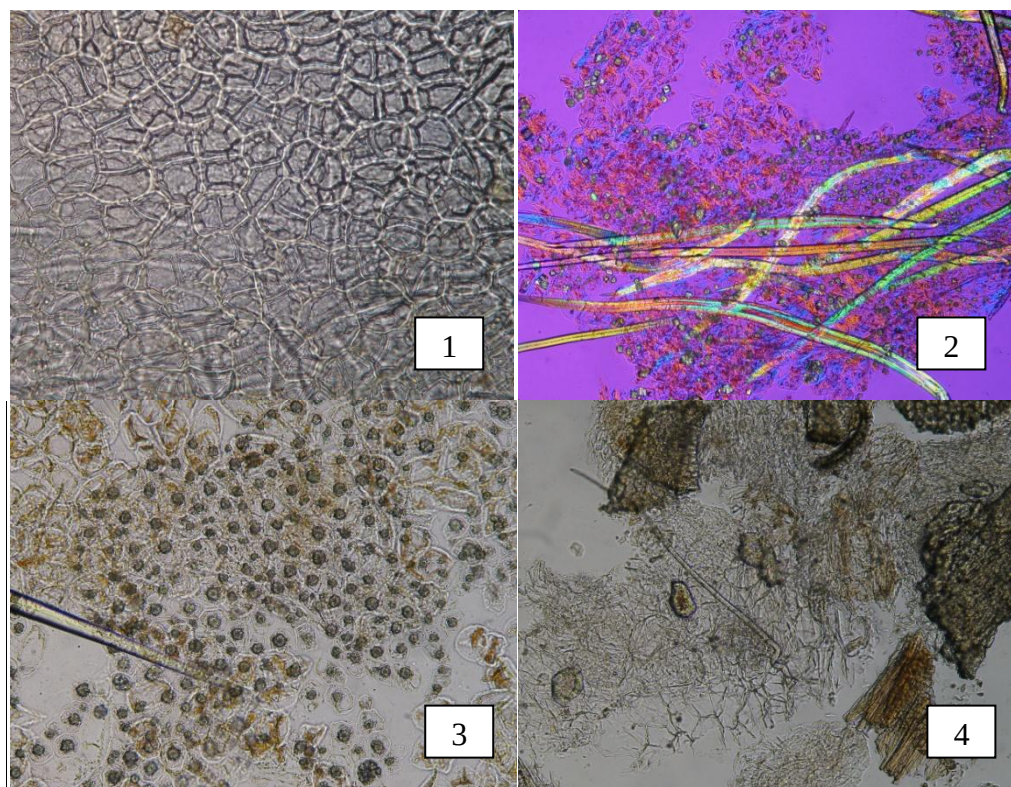


Рис. 3.11. Элементы порошка витаминного сбора №2:
1–наружный «окончатый» эпидермис гипантия (500х), 2-волоски и друзы оксалата кальция в поляризованном свете (50х), 3- друзы оксалата кальция (200х); 4-эндокарп, семенная кожура, каменистые клетки (50х)

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 3

1. Проведено углубленное морфолого-анатомическое изучение витаминных сборов №1 и №2 и индивидуальных компонентов.
2. Нами впервые изучено морфологическое строение витаминных сборов и компонентов с помощью 3D-лазерного сканирующего микроскопа. При помощи сканирующего микроскопа дополнительно установлен рельеф поверхности фрагмента перикарпия сухого плода смородины, наблюдаются эфиромасличные железки, выступающие над поверхностью экзокарпия, рельеф поверхности семени, фрагментов плодиков-орешков шиповника, где наблюдается обилие простых волосков с гладкой поверхностью, заостренной верхушкой и блестящей полостью, рельеф поверхности гипантия.

3. Показана возможность применения 3D-лазерного сканирующего микроскопа для изучения внешних признаков витаминных сборов и компонентов.
4. Установлены диагностические признаки анатомического строения витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов в проходящем и поляризованном свете. Впервые нами установлено, что устьичный комплекс, в плодах смородины черной, имеет актиноцитный тип строения.
5. Нами впервые показана возможность диагностики лигнифицированных элементов с применением поляризованного света. В поляризованном свете волоски и кристаллические образования визуализируются белым свечением, механические элементы (узкие веретенообразные склереиды вдоль проводящих пучков) – голубым и желтоватым.
6. Применение 3D-лазерной сканирующей микроскопии и поляризованного света расширяют возможности анатомо-диагностического изучения ЛРС.

Результаты исследований (Главы 3) по изучению поверхности плодов с помощью применения 3D-лазерной сканирующей микроскопии и результаты диагностики лигнифицированных элементов с применением поляризованного света вошли в проекты фармакопейных статей «Смородины черной плоды», «Витаминный сбор №1» и «Витаминный сбор №2».

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

4.1. Определение числовых показателей витаминных сборов

Лекарственное растительное сырье в период заготовки должно отвечать всем требованиям, установленным НД. Для обеспечения качества ЛРС необходимо установить его соответствие таким показателям как подлинность и доброкачественность. Для анализа витаминных сбора №1 и №2 мы готовили модельные образцы, состоящие из промышленных образцов. Однако, для составления витаминного сбора №1 использовали плоды смородины черной, заготовленные в Брянской и Московской областях. Таким образом, было решено провести анализ витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов на соответствие таким показателям доброкачественности, как влажность, зола общая, зола, нерастворимая в 10% хлороводородной кислоте, микробиологическая чистота и содержание радионуклидов.

Определение влажности плодов шиповника, плодов рябины, плодов смородины, поливитаминных сборов №1 и №2

Влажность – один из важнейших показателей доброкачественности лекарственного растительного сырья, влияющий как на состояние сырья, так и на содержание действующих веществ. Летучие вещества представлены преимущественно компонентами эфирных масел, а также некоторыми другими соединениями, которые при температуре определения (100-105°C) переходят в газообразное состояние и улетучиваются из ЛРС.

Определение влажности проводилось по методике, представленной в общей фармакопейной статье ГФ XIII ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья» в шкафу сушильно-стерилизационном ШСС-80п, УХЛ 4.2 (ТУ 64-1-909-80), Россия. Полученные в ходе эксперимента результаты определения влажности представлены в

таблице 4.1. Так же определение влажности проводилось с помощью прибора «Анализатор влажности MF-50», AND, Япония. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Влажность плодов и поливитаминных сборов №1 и №2

n=5; p=0,95

Объект исследования	Влажность (по ГФ XI), %	Влажность (на MF-50), %	Норма по НД, %
Плоды шиповника	3,38 ± 0,05	3,40 ± 0,05	Не более 15
Плоды рябины	3,73 ± 0,05	3,75 ± 0,05	Не более 18
Плоды смородины	5,09 ± 0,05	5,10 ± 0,05	Не более 18
Витаминный сбор №1	2,88 ± 0,05	2,90 ± 0,05	Не более 16
Витаминный сбор №2	3,12 ± 0,05	3,15 ± 0,05	Не более 16

Следовательно, ЛРС, взятое на анализ, соответствует требованиям, указанным в частных фармакопейных статьях ГФ XI, ГФ XIII изданий, а также ФСП по показателю «влажность».

Зола общая и зола, нерастворимая в 10% хлороводородной кислоте

Определение золы общей проводили согласно методике, представленной в ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая» ГФ XIII изд. Результаты исследований представлены в таблице 4.3.

Зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте, представляет собой остаток после обработки хлористоводородной кислотой золы общей и состоит преимущественно из кремнезёма.

Определение золы общей проводили согласно методике, представленной в ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» ГФ XIII изд. Результаты исследований представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2

Содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в витаминных сборах №1 и 2 и их компонентах

n=5; p=0,95

Объект исследования	Зола общая			Зола, нерастворимая в 10% хлороводородной кислоте		
	X, %	Норма по НД, %		X, %	Норма по НД, %	
Плоды шиповника	4,60±0,06	не более 3 / не более 7	ГФ XI / ЕФ VII	0,43±0,01	--	ГФ XI
Плоды рябины	3,04±0,05	не более 5	ГФ XI, ФСП	0,24±0,01	не более 2	ФСП
Плоды смородины черной	2,66±0,06	не более 3	ГОСТ 21450-75	0,26±0,01	--	ГОСТ 21450-75
Витаминный сбор №1	3,82±0,05	не более 3	ФСП	0,55±0,01	--	ФСП
Витаминный сбор №2	3,51±0,05	не более 5	ФСП	0,50±0,01	не более 2	ФСП

Содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% хлороводородной кислоте в витаминных сборах №1, №2 и их компонентах, в основном, соответствует показателям, установленным нормативной документацией на анализируемое сырье и сборы (табл.4.3). Исключение составляют плоды шиповника, и витаминный сбор №1. Завышенное в этих объектах содержание золы общей объясняется повышенным содержанием микроэлементов в плодах шиповника. Данная проблема изучалась и ОАО «Фирма «Здоровье».

В настоящее время промышленные образцы некоторых видов ЛРС содержат большее количество золы общей, чем отмечалось ранее. Так, например, для плодов шиповника, этот показатель, как по нашим данным, так и по данным фирмы-производителя, выше 3%, установленных в ГФ XI изд., 1989 г. Этот факт может быть связан с тем, что ЛРС в наши дни в большем количестве поступает по импорту из стран СНГ, где климат и условия несколько отличаются от средней полосы России. Возможно, это и является причиной накопления большего количества минеральных веществ растениями. Кроме того, в зарубежных фармакопеях (США, Европы,

Белоруссии) показатель «содержание золы общей» также имеет более высокое значение (6 и 7% соответственно).

Микробиология и радионуклиды

ЛРС и препараты, полученные на их основе (настои, отвары, настойки, таблетки и т.д.) часто подвергается микробной контаминации. В НД нормируется определенное количество микроорганизмов при отсутствии тех видов, которые могут нанести вред здоровью человека.

Определение микробиологической чистоты проводили согласно методике, представленной в ОФС. ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» ГФ XIII изд. Результаты представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3

Микробиологическая чистота в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах

n=5; p=0,95

Объект исследования	Микробиологическая чистота					
	Общее число аэробных микроорганизмов	Норма по НД	Общее число дрожжевых и плесневых грибов	Норма по НД	Escherichia coli	Норма по НД
Плоды шиповника	соответствует НД	не более 10^7 КОЕ в 1 г	соответствует НД	не более 10^5 КОЕ в 1 г	соответствует НД	не более 10^2 КОЕ в 1 г
Плоды рябины	соответствует НД		соответствует НД		соответствует НД	
Плоды смородины черной	соответствует НД		соответствует НД		соответствует НД	
Витаминный сбор №1	соответствует НД		соответствует НД		соответствует НД	
Витаминный сбор №2	соответствует НД		соответствует НД		соответствует НД	

Радиоактивность — свойство некоторых радионуклидов подвергаться радиоактивному распаду. Контролю на радиационную безопасность подвержены все ЛРС и препараты на его основе.

Определение радионуклидов проводили согласно методике, представленной в ОФС.1.5.3.0001.15 Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных

растительных препаратов ГФ XIII изд. Результаты представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4

Радионуклиды в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах

n=5; p=0,95

Объект исследования	Радионуклиды, допустимая активность Бк/кг			
	Cs	Норма по НД	Sr	Норма по НД
Плоды шиповника	соответствует НД	не более 400	соответствует НД	не более 200
Плоды рябины	соответствует НД		соответствует НД	
Плоды смородины черной	соответствует НД		соответствует НД	
Витаминный сбор №1	соответствует НД		соответствует НД	
Витаминный сбор №2	соответствует НД		соответствует НД	

4.2. Качественный анализ сборов витаминных и их компонентов

В нормативных документах (НД) предприятия (№ 42-0426382103 и № 42-2446-86), не изменявшихся с 2004 г., стандартизация сборов предложена по содержанию кислоты аскорбиновой. В ГФ XI издания для плодов шиповника, применяемых для получения препарата «Холосас», предусмотрен показатель «сумма сводных органических кислот» в пересчете на яблочную кислоту. Для плодов шиповника, выпускаемых в пачках, нормируется содержание кислоты аскорбиновой. В связи с тем, что органические кислоты являются второй группой БАВ, то был проведен их качественный анализ в извлечениях из сборов, их компонентов и их настоях.

Качественное обнаружение органических кислот и кислоты аскорбиновой в анализируемом ЛРС и в настоях проводилось методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) [57, 58, 59, 96] в восходящем токе растворителей и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [37].

Анализу подвергались водные извлечения из анализируемого сырья, полученные согласно методике, описанной в ФС ГФ XI (38. Плоды шиповника), и настои, полученные по методике ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары», ГФ XIII. Полученные водные извлечения фильтровали.

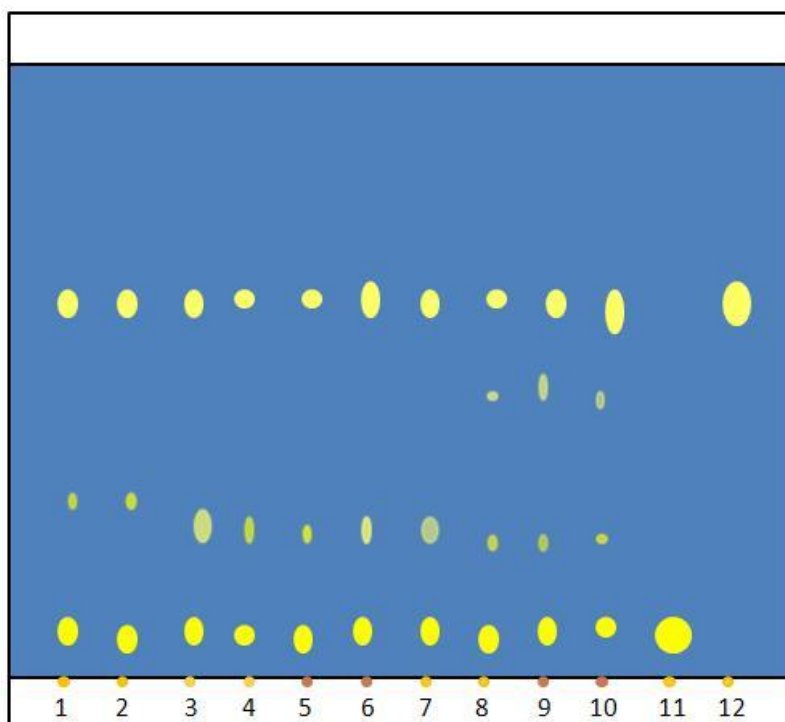
4.3. Качественный анализ витаминных сборов и их компонентов на содержание суммы свободных органических кислот и кислоты аскорбиновой методом ТСХ

Изучение состава органических кислот методом ТСХ

Извлечения из анализируемых объектов и настои получали согласно методикам, описанным в фармакопейных статьях «Плоды шиповника» ГФ XI и ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары ГФ XIII.

Хроматографирование осуществляли на пластинках «Sorbfil», в системе растворителей этанол 25% - аммиак концентрированный (16:4,5). Условия разделения хроматограммы: температура - 22°C, время насыщения камеры – 30-40 мин. Время хроматографирования определялось временем прохождения подвижной фазы от линии старта до линии финиша (10 см) [96].

Для обнаружения яблочной и лимонной кислот хроматограмму обрабатывали рН-зависимым детектором — бромкрезоловым зеленым. Поскольку среда щелочная, детектируемые кислоты, проявлялись в виде желтых пятен на синем фоне. Схема хроматограммы представлена на рисунке 4.1.



- 1-Водное извлечение плодов шиповника
- 2-Настой шиповника
- 3- Водное извлечение плодов рябины
- 4-Настой рябины
- 5-Водное извлечение плодов смородины
- 6-Настой смородины
- 7-Водное извлечение сбора №2
- 8-Настой сбора №2
- 9-Водное извлечение сбора №1
- 10-Настой сбора №1
- 11-ГСО лимонной кислоты $R_f=0.1$
- 12-ГСО яблочной кислоты $R_f=0.66$

Рис.4.1. Схема хроматограммы органических кислот

Установлено, что при данных условиях хроматографирования ГСО лимонной кислоты проявляется в виде пятна с $R_f=0,1$; яблочной кислоты с $R_f=0,66$. Были обнаружены пятна, проявившиеся при разделении извлечений, на уровне зон адсорбции ГСО кислоты яблочной и кислоты лимонной. Т.о. можно сделать вывод, что водные извлечения и настои из витаминных сборов №1 и №2, плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной содержат лимонную и яблочную кислоты. Также на хроматограмме были обнаружены другие пятна адсорбции ($R_f=0,5$; $R_f=0,26$), предположительно соответствующим зонам абсорбционной соединений класса органических кислот.

Идентификация кислоты аскорбиновой методом ТСХ

Извлечения из анализируемых объектов готовили холодным настаиванием (ГФ XI изд.). Следовали методике, представленной в частной фармакопейной статье 38 «Плоды шиповника» ГФ XI изд. Из грубо измельченной аналитической пробы плодов брали навеску массой 20 г,

помещали в фарфоровую ступку, где тщательно растирали со стеклянным порошком (около 5 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивали 10 минут. Хроматографирование осуществляли на пластинках «Sorbfil», в системе растворителей этилацетат – ледяная уксусная кислота (80:20). Условия разделения хроматограммы: температура - 22°C, время насыщения камеры – 30-40 мин. Время хроматографирования определялось временем прохождения подвижной фазы от линии старта до линии финиша (10 см) [57].

Для обнаружения кислоты аскорбиновой хроматограмму обрабатывали 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Зона адсорбции кислоты аскорбиновой проявлялась в виде белых пятен на розовом фоне.

Схема хроматограммы представлена на рисунке 4.2.

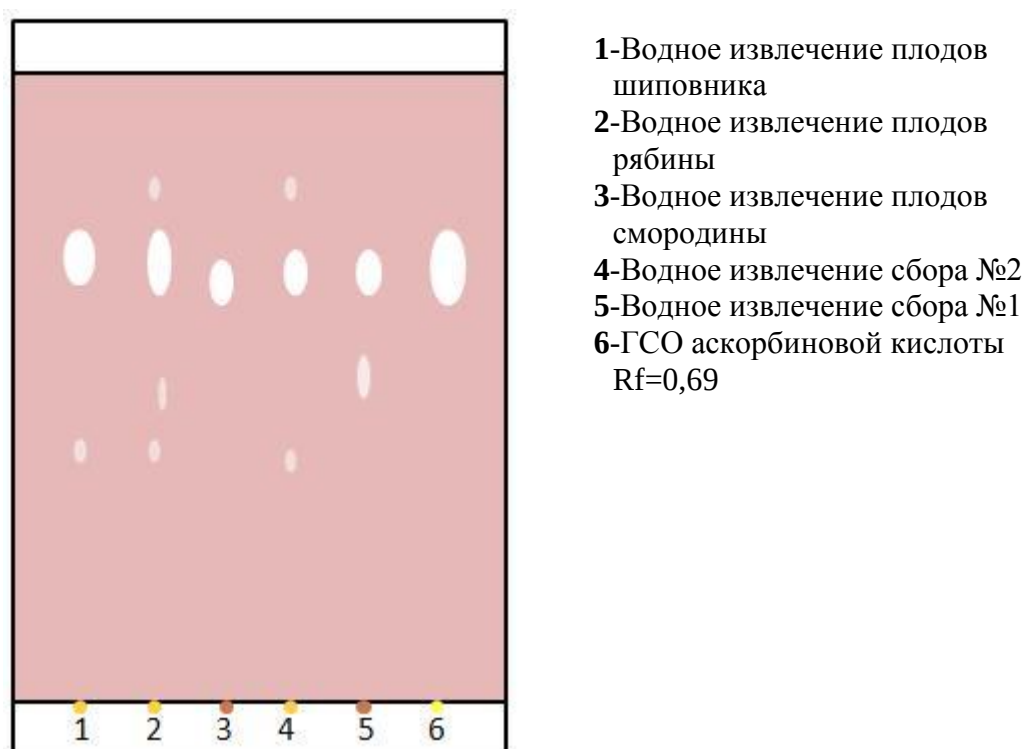


Рис.4.2. Схема хроматограммы обнаружения кислоты аскорбиновой.

В ходе качественного анализа было достоверно установлено присутствие кислоты аскорбиновой и органических кислот в анализируемом лекарственном растительном сырье и водных извлечениях, полученных из него.

4.4. Качественный анализ витаминных сборов и их компонентов на содержание органических кислот и кислоты аскорбиновой методом ВЭЖХ

Метод ВЭЖХ применяли для подробного изучения отдельных компонентов органических кислот и кислоты аскорбиновой. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100, оснащенный диодноматричным детектором, программно-аппаратным комплексом сбора и обработки результатов ChemStation.

В качестве стандартов использовали стандартные образцы (СО) органических кислот (яблочной, лимонной, сорбиновой, фумаровой, винной, аскорбиновой).

Проводили хроматографический анализ в соответствии с ГОСТ 32771-2014 «Продукция соковая. Определение органических кислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Пробоподготовку образца осуществляли по следующей методике.

Точную навеску измельченного сырья (5 г) помещали в коническую колбу объемом 100 мл, последовательно экстрагировали водой очищенной объемами 20, 15, 15 мл на УЗ-бане при температуре 60°C каждый раз в течение 30 мин. Полученные порции экстракта количественно переносили в мерную колбу объемом 50 мл, в случае необходимости доводили объем до метки. 2 мл экстракта помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 4500 об/мин. Надосадочную жидкость (полученный очищенный водный экстракт) помещали в вials для хроматографирования.

Условия хроматографического разделения.

В качестве неподвижной фазы применяли колонку хроматографическую Atlantis C18 (WATERS) для обращенно-фазовой ВЭЖХ, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, с размером частиц 5 мкм, заполненную силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом.

В качестве подвижной фазы – фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л (рН = $2,4 \pm 0,2$). Для элюирования был выбран режим изократический. Скорость потока подачи элюента – 1,0 мл/мин. Температура колонки – 25°C. Длина волны диодноматричного детектора для органических кислот 210 нм, для кислоты аскорбиновой – 254 нм. Объем вводимой пробы (экстракта) – 10 мкл.

Полученные хроматографические профили анализируемых витаминных сборов №1 и 2 и их компонентов представлены на рисунках 4.3-4.12. Времена удерживания органических кислот представлены в таблице 4.5.

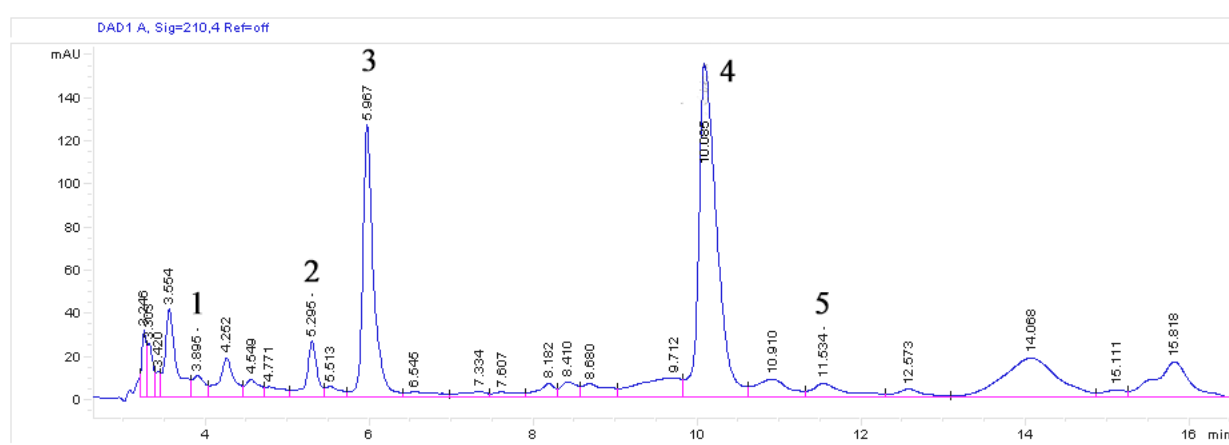


Рис.4.3. ВЭЖХ органических кислот в витаминном сборе №1:

1-винная, 2-яблочная, 3-аскорбиновая, 4-лимонная, 5-фумаровая

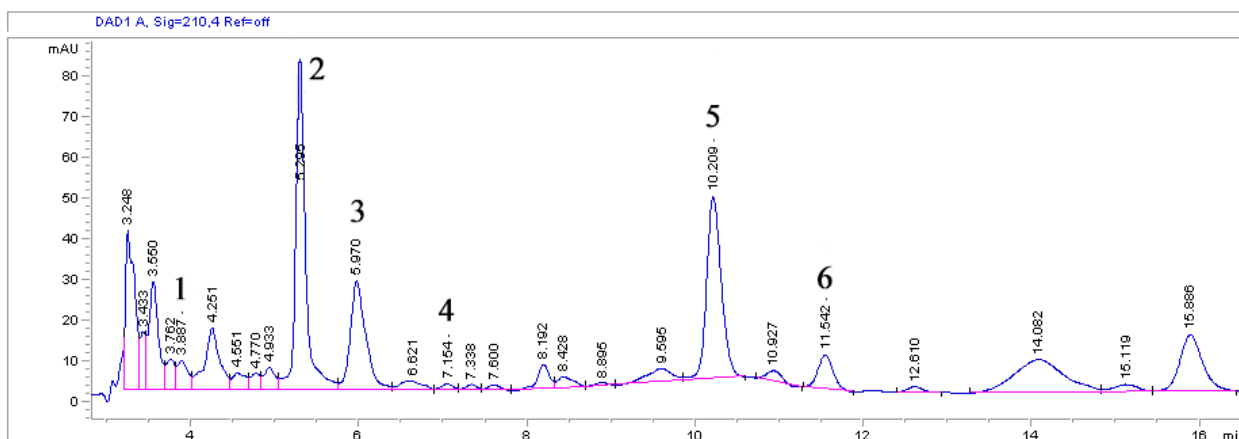


Рис.4.4. ВЭЖХ органических кислот в витаминном сборе №2:

1-винная, 2-яблочная, 3-аскорбиновая, 4-сорбиновая, 5-лимонная, 6-фумаровая

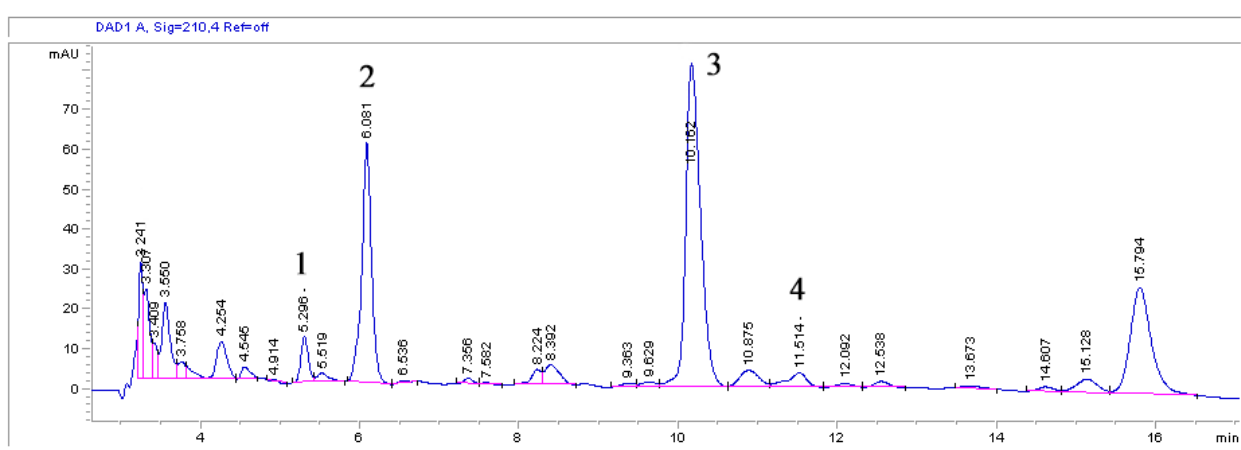


Рис.4.5. ВЭЖХ органических кислот в плодах шиповника:

1-яблочная, 2-аскорбиновая, 3-лимонная, 4-фумаровая

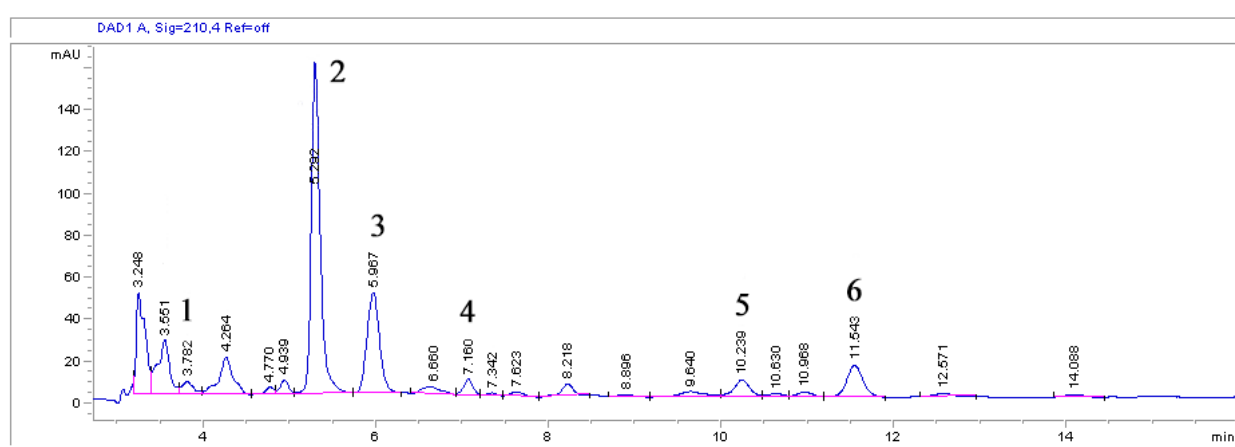


Рис.4.6. ВЭЖХ органических кислот в плодах рябины обыкновенной:

1-винная, 2-яблочная, 3-аскорбиновая, 4-сорбиновая, 5-лимонная, 6-фумаровая

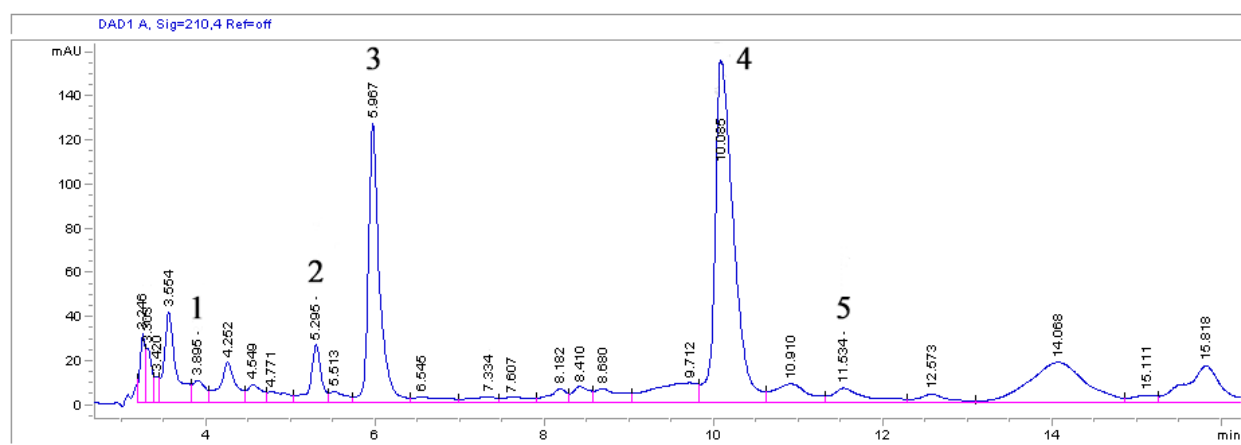


Рис.4.7. ВЭЖХ органических кислот в плодах смородины черной:

1-винная, 2-яблочная, 3-аскорбиновая, 4-лимонная, 5-фумаровая

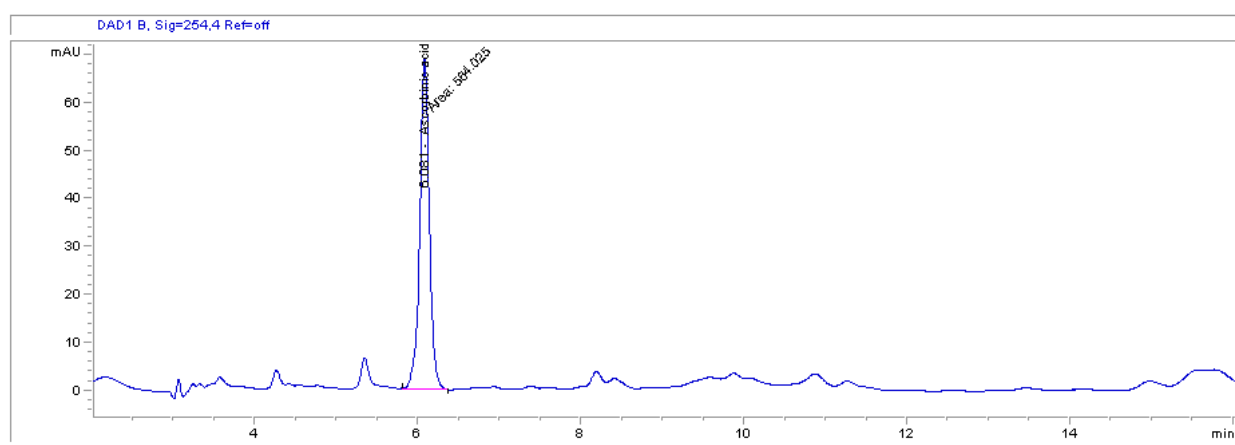


Рис.4.8. ВЭЖХ профиль кислоты аскорбиновой в витаминном сборе №1

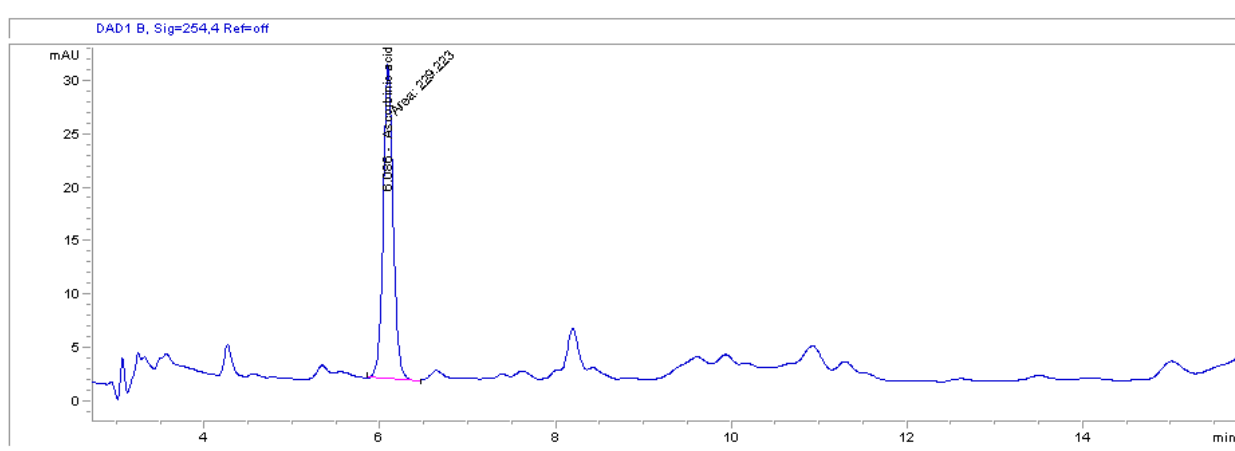


Рис.4.9. ВЭЖХ профиль кислоты аскорбиновой в витаминном сборе №2

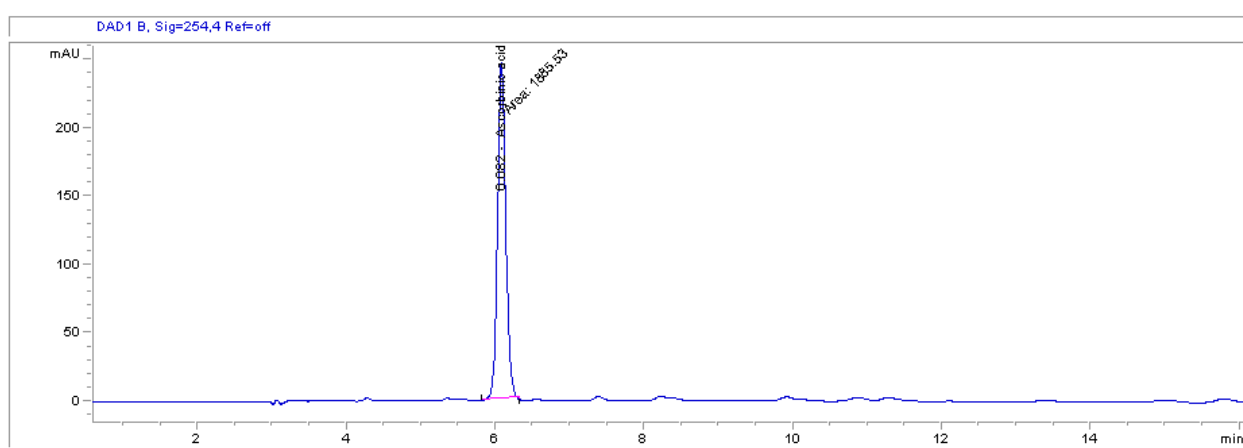


Рис.4.10. ВЭЖХ профиль кислоты аскорбиновой в плодах шиповника

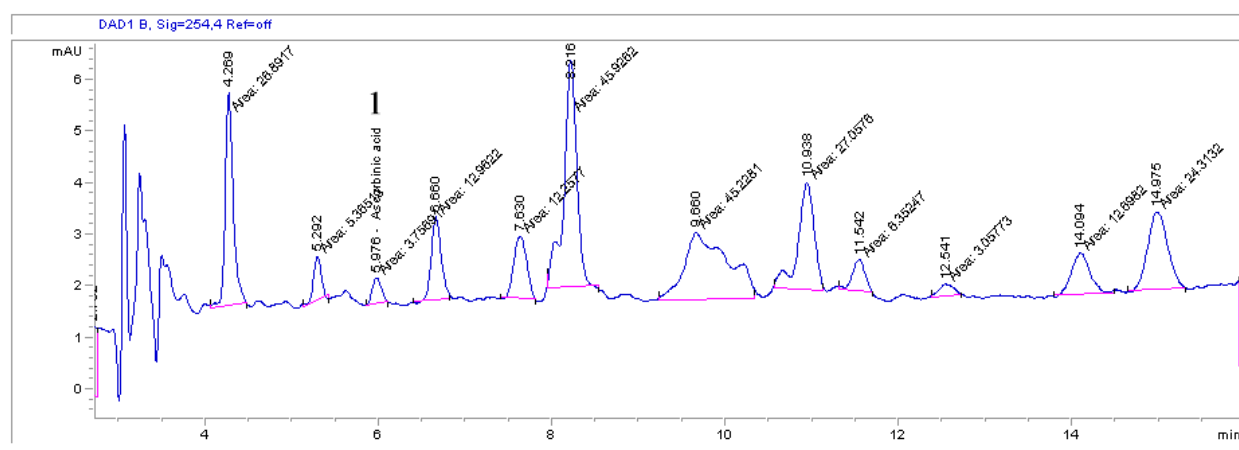


Рис.4.11. ВЭЖХ профиль кислоты аскорбиновой (1) в плодах рябины обыкновенной

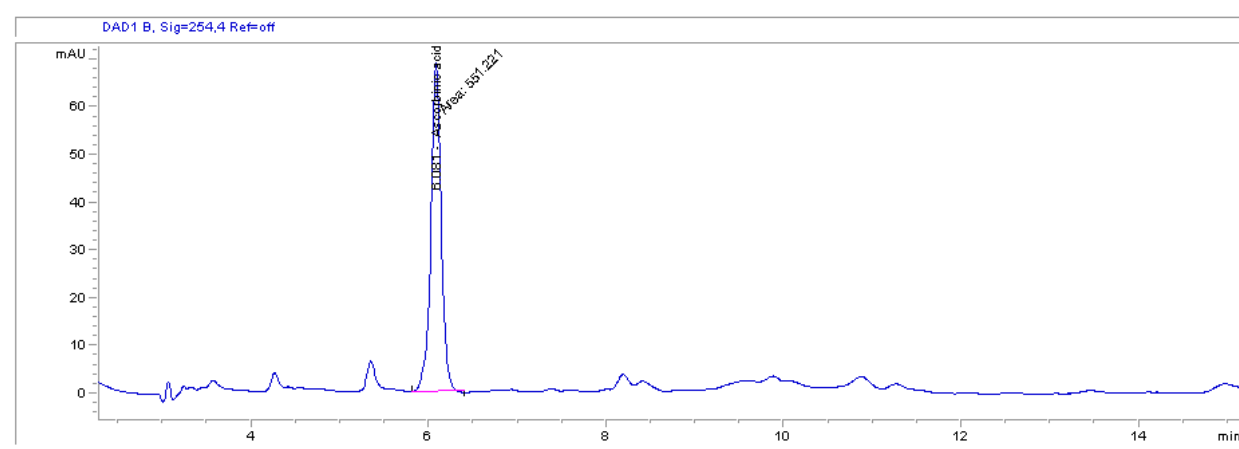


Рис.4.12. ВЭЖХ профиль кислоты аскорбиновой в плодах смородины черной

Таблица 4.5

Хроматографические параметры органических кислот витаминных сборов №1 и №2 и компонентов

Объект исследования	Обнаруженные органические кислоты и их времена удерживания, мин					
	винная	яблочная	лимонная	фумаровая	сорбиновая	аскорбиновая
Витаминный сбор №1	3,89	5,29	10,09	11,53	--	6,08
Витаминный сбор №2	3,89	5,29	10,21	11,54	7,15	6,08
Плоды шиповника	--	5,29	10,16	11,51	--	6,08
Плоды рябины обыкновенной	3,78	5,29	10,24	11,54	7,16	5,98
Плоды смородины черной	3,89	5,29	10,09	11,53	--	6,08

4.5. Качественный анализ витаминных сборов и их компонентов на содержание флавоноидов методом ВЭЖХ

Изучения флавоноидного состава в витаминных сборах №1, №2 и компонентах проводили на системе ультраэффективной жидкостной хроматографии “Ultimate 3000”, оснащенной дегазатором, трехканальным насосом, термостатом колонок, термостатируемым автосамплером, диодно-матричным детектором и тройным квардупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo TSQ Endura.

Пробоподготовку образца осуществляли по следующей методике.

Точную навеску измельченного образца массой около 5,0 г помещали в колбу на 100 мл, добавляли 75 мл 70% этанола, пробу интенсивно встряхивали и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. Экстракт охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки 70% этанолом. 2 мл экстракта помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 4500 об/мин. Надосадочную жидкость (полученный очищенный этанольный экстракт) помещали в вials для хроматографирования.

Условия хроматографического разделения.

Условия ВЭЖХ: неподвижная фаза – колонка ProteCol C18 H125 250×4.6 мм ID 5 μ m 120Å, подвижная фаза А – 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде, В – 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле; расход элюэнта 0.5 мл/мин; градиентное элюирование 0-10 мин 15-30% В, 10-20 мин 30-45% В, 20-30 мин 45-60% В, 30-35 мин 60-70% В, 35-38 мин 70% В, 38-40 мин 70-15% В, 40-50 мин 15% В; температура колонки 25 °С, температура автосамплера 20 °С, диодно-матричное детектирование при $\lambda=370$ нм, $\lambda=350$ нм, $\lambda=338$ нм $\lambda=290$ нм; спектры снимали в диапазоне от 190 до 700 нм.

Условия МС: ионизация нагреваемым электроспреем в режиме регистрации отрицательных ионов HESI/MS- в диапазоне m/z от 150 до 1000

Да, скорость сканирования 1000 Да/с, разрешение квадруполь Q1 0.7; рабочие параметры источника ионизации: напряжение на капилляре 2500 В, поток газа-осушителя (азот) 50 произвольных единиц (Arbitrary units), поток вспомогательного газа 15 произвольных единиц, поток продувочного газа 2 произвольные единицы, температура трубки переноса ионов 350 °С, температура испарителя 400 °С.

В качестве примера на рисунках 5.13 – 5.14 представлены полученные флавоноидные профили анализируемых витаминных сборов №1 и 2. Времена удерживания флавоноидов представлены в таблице 4.6.

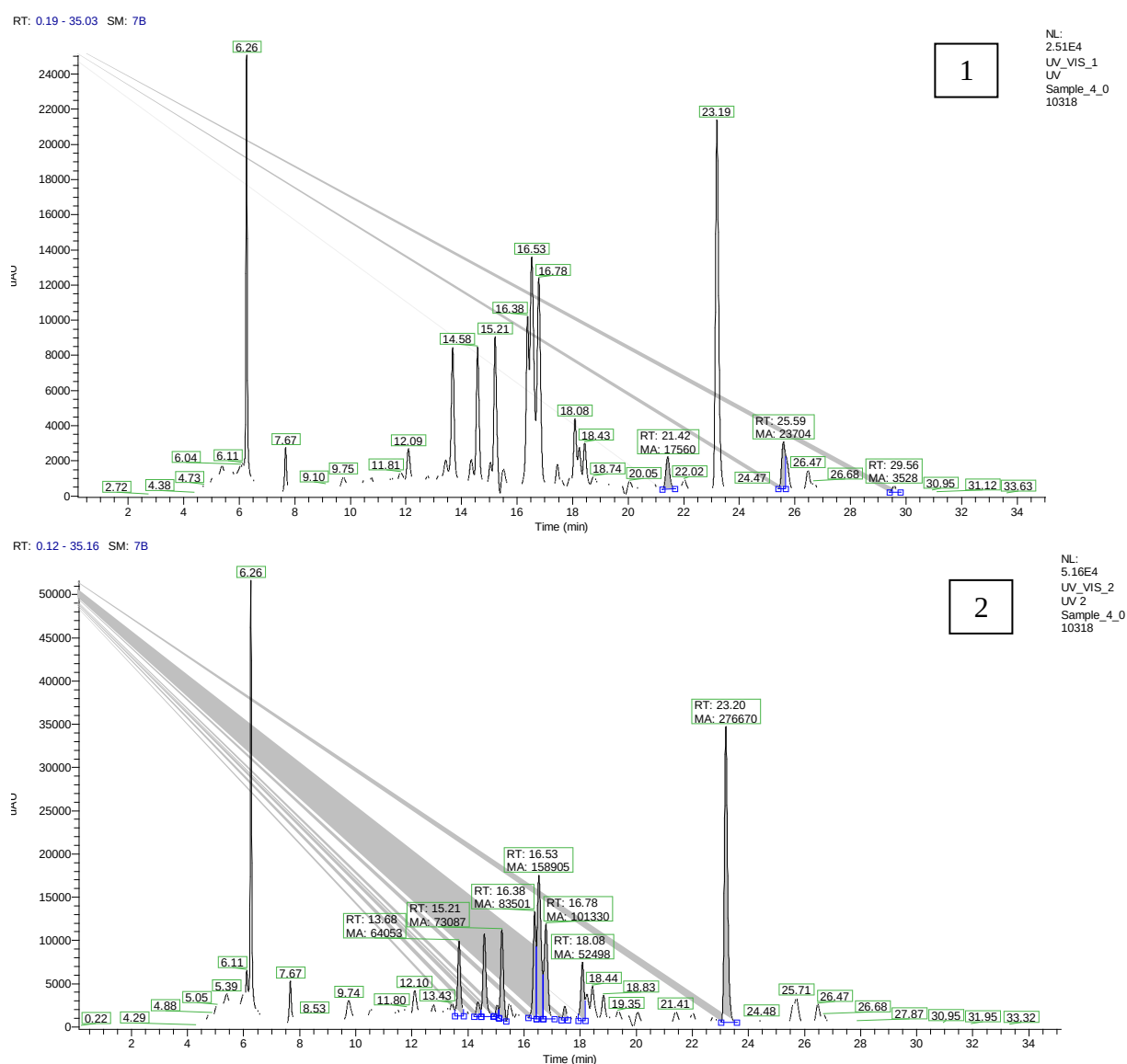
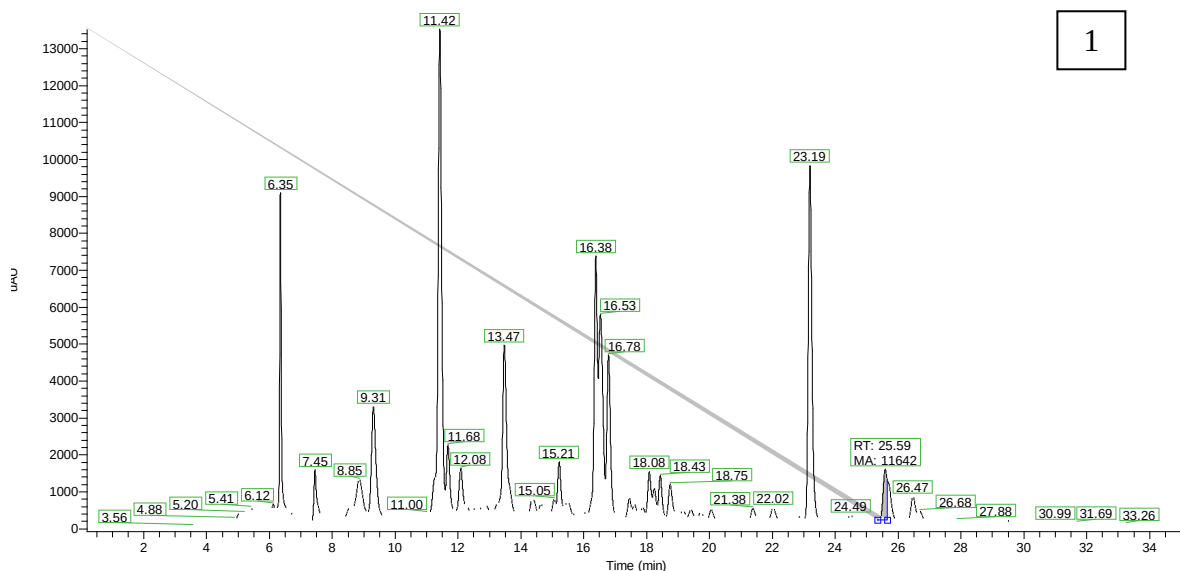


Рис.4.13. Флавоноидный профиль витаминного сбора №1

- 1-Хроматограмма извлечения из витаминного сбора №1 при $\lambda=370$ нм (флавонолы);
- 2- Хроматограмма извлечения из витаминного сбора №1 при $\lambda=350$ нм (флавонолгликозиды)

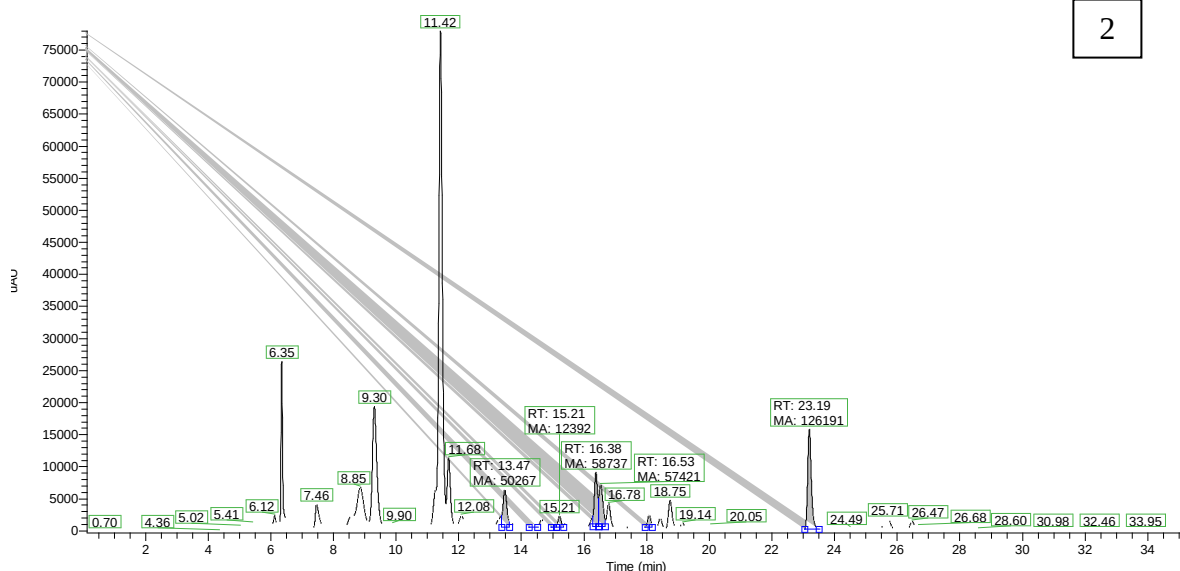
RT: 0.19 - 35.16 SM: 7B



NL:
1.35E4
UV_VIS_1
UV
Sample_5_0
10318

1

RT: 0.12 - 35.22 SM: 7B



NL:
7.80E4
UV_VIS_2
UV2
Sample_5_0
10318

2

Рис.4.14. Флавоноидный профиль витаминного сбора №2

1-Хроматограмма извлечения из витаминного сбора №2 при $\lambda=370$ нм (кверцетин);

2-Хроматограмма извлечения из витаминного сбора №2 при $\lambda=350$ нм
(флавонолгликозиды)

Мирицетин-3-галактозид имеет четкий пик в случае анализа плодов смородины черной, но, при этом, в витаминном сборе №1 определяется только в сумме с кверцетин-пентозидом. Это может быть вызвано присутствием соединений, мешающих разделению (табл. 4.6).

Таблица 4.6

Хроматографические параметры гликозидов флавоноидов витаминных сборов №1 и №2 и компонентов

Объект исслед. Флавоноид	Время удерживания обнаруженных флавоноидов, мин				
	<i>Витаминный сбор №1</i>	<i>Витаминный сбор №2</i>	<i>Плоды шиповника</i>	<i>Плоды смородины черной</i>	<i>Плоды рябины обыкновенной</i>
Астрагалин	18,1	18,1	18,1	18,1	--
Гиперозид	16,3	16,3	16,3	16,3	16,3
Изокверцитрин	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
Кверцетин	25,6	25,6	25,6	25,6	25,6
Кверцетин-3-софороид	--	13,4	--	--	13,4
Кверцетин-пентозид	--	14,3	14,3	--	--
Кверцетин-пентозид	15,0	15,0	15,0	--	--
Кверцетин-пентозид + Мирицетин-3-галактозид	14,4	--	--	--	--
Мирицетин	21,4	--	--	21,4	--
Мирицетин-3-галактозид	--	--	--	14,4	--
Мирицетин-3-глюкозид	14,6	--	--	14,6	--
Мирицетин-3-рутинозид	13,7	--	--	13,7	--
Кемпферол	29,6	--	--	29,6	--
Кемпферол-3-галактозид	17,4	--	--	17,4	--
Кемпферол-3-рутинозид	16,7	--	--	16,7	--
Рутин	15,2	15,2	15,2	15,2	15,2
Тилирозид	23,2	23,2	23,2	--	--

В результате анализа было установлено, что во всех плодах детектируются рутин, гиперозид, кверцетин, изокверцитрин, маркером для плодов рябины обыкновенной и витаминного сбора №2 является гликозид кверцетин-3-софороид, для плодов черной смородины и витаминного сбора №1 – кемпферол и его гликозиды, для плодов шиповника - кверцетин-пентозид и тилирозид.

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 4

1. Установлены, числовые показатели витаминных сборов: зола общая, зола, нерастворимая в 10% хлороводородной кислоте.
2. Определены показатели влажность, микробиологическая чистота и радионуклиды. Установлено, что по данным показателям витаминные сборы и их компоненты являются доброкачественными.
3. Витаминный сбор №2 плоды смородины черной и рябины соответствуют показателям качества, установленным НД. В плодах шиповника и в витаминном сборе №1 показатель «зола общая» завышен.
4. Методом ТСХ подтверждено присутствие в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах яблочной кислоты ($R_f=0,66$), лимонной кислоты ($R_f=0,1$) и кислоты аскорбиновой ($R_f=0,69$). Детектируемые кислоты проявляются в виде желтых пятен абсорбции на синем фоне, зона кислоты аскарбиновой проявляется в виде белых пятен на розовом фоне.
5. Методом ВЭЖХ были установлены в качестве маркеров индивидуальные соединения органических кислот и флавоноидов.
6. На основании результатов ВЭЖХ-анализа на органические кислоты было установлено, что для плодов рябины и витаминного сбора №2 маркером органических кислот является сорбиновая кислота. Было установлено преобладание определенных компонентов на основании чего более рациональным является определение суммы органических кислот в плодах шиповника, плодах смородины черной и витаминном сборе № 1 в пересчете на лимонную кислоту, в плодах рябины обыкновенной и сборе витаминном №2 – в пересчете на яблочную кислоту.
7. Среди флавонолов и флавонологликозидов доминирующими во всех анализируемых объектах являются рутин, гиперозид, кверцетин, изокверцитрин. В плодах рябины обыкновенной и витаминном сборе №2 содержится гликозид кверцетин-3-софорозид, в плодах черной

смородины и витаминном сборе №1 – кемпферол и его гликозиды, для плодов шиповника характерны кверцетин-пентозид и тилирозид.

Результаты исследований (Главы 4) по идентификации органических кислот и кислоты аскорбиновой методами ТСХ и ВЭЖХ анализа вошли в проекты фармакопейных статей «Смородины черной плоды», «Витаминный сбор №1» и «Витаминный сбор №2».

ГЛАВА 5. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

Плоды шиповника, рябины обыкновенной и черной смородины, а также получаемые из них витаминные сборы №1 и №2 содержат комплекс биологически активных веществ [15, 22, 180, 207]. В основном данные группы представлены гидрофильной фракцией: органические кислоты, дубильные вещества, водорастворимые витамины, полифенольные соединения, фенолкарбоновые кислоты и полисахариды.

5.1. Количественный анализ суммы свободных органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах

В изучаемых объектах органические кислоты представлены такими кислотами как лимонная, яблочная, щавелевая, изовалериановая, молочная и др. Эти БАВ способствуют повышению иммунитета, действуя по типу пребиотиков, за счет стимулирования роста нормальной кишечной микрофлоры [196, 206].

В ГФ XI издания для плодов шиповника, предусмотрен показатель «сумма сводных органических кислот» в пересчете на яблочную кислоту, т.к. сырье применяется для получения препарата «Холосас», оказывающего желчегонный действие.

Кислая реакция среды водных извлечений, получаемых из витаминных сборов и их компонентов, обусловленная наличием органических кислот, существенна при применении водных извлечений пациентами с заболеваниями органов пищеварения, поэтому их количественное содержание в сырье и в водных извлечениях является важным показателем.

Для установление содержания суммы свободных органических кислот в литературе и НД описаны применяют такие методы как индикаторное и потенциометрическое титрование [213]. При установлении конечной точки

титрования (к.т.т.) потенциометрическое и индикаторное детектирование имеют свои недостатки [62, 64, 96]. Индикаторное титрование требует предварительной стандартизации титранта, что существенно увеличивает время анализа, а визуальная индикация конечной точки титрования затруднена вследствие собственной окраски извлечений. Для снижения интенсивности цвета водного извлечения методика НД предлагает добавлять 200-300 мл воды к 10 мл извлечения, однако данный прием приводит к увеличению ошибки анализа. Потенциометрическое титрование несколько длительно, вследствие смещения точки эквивалентности для слабых органических кислот в сторону щелочной реакции, что требует продолжения титрования до pH 10-12 (за исключением использования автоматического титратора). В связи с этим была изучена возможность применения кулонометрического титрования гидроксид-ионами с потенциометрической индикацией конечной точки титрования [57, 59, 96].

5.1.1 Установление содержания индивидуальных органических кислот методом ВЭЖХ

Хроматографический анализ проводили в соответствии с ГОСТ 32771-2014 «Продукция соковая. Определение органических кислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Пробоподготовку образца осуществляли по следующей методике.

Точную навеску измельченного сырья (5,0 г) помещали в коническую колбу объемом 100 мл, последовательно экстрагировали водой очищенной объемами 20, 15, 15 мл на УЗ-бане при температуре 60°C каждый раз в течение 30 мин. Полученные порции экстракта количественно переносили в мерную колбу объемом 50 мл, в случае необходимости доводили объем до метки. 2 мл экстракта помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 4500 об/мин.

Надосадочную жидкость (полученный очищенный водный экстракт) помещали в вials для хроматографирования.

Условия хроматографического разделения.

В качестве неподвижной фазы применяли колонку хроматографическую Atlantis C18 (WATERS) для обращенно-фазовой ВЭЖХ, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, с размером частиц 5 мкм, заполненную силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом. В качестве подвижной фазы – фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л (pH = 2,4±0,2). Для элюирования был выбран режим изократический. Скорость потока подачи элюента – 1,0 мл/мин. Температура колонки – 25°C. Длина волны диодноматричного детектора для органических кислот 210 нм, для кислоты аскорбиновой – 254 нм. Объем вводимой пробы (экстракта) – 10 мкл.

Для построения калибровочной кривой готовили градуировочные растворы органических кислот: 0,5 мг/мл – растворяли в воде очищенной соответствующие навески стандартных образцов органических кислот (лимонной, яблочной, сорбиновой, винной, фумаровой, аскорбиновой – Sigma-Aldrich, чистота ≥ 98,0%), затем полученные растворы разбавляли до концентрации 0,1 и 0,05 мг/мл. По полученным данным была построена калибровочная кривая и составлено уравнение для расчета содержания органических кислот и кислоты аскорбиновой. Расчет содержания органических кислот и кислоты аскорбиновой осуществляли на основе площади пика органической кислоты в анализируемом образце экстракта и по уравнению кривой.

Содержание индивидуальных органических кислот в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где S – площадь пика органической кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь пика органической кислоты на хроматограмме раствора СО;
 P – содержание основного вещества в СО органической кислоты, % ;
 m_0 – навеска СО органической кислоты, г;
 m – масса навески сырья, г;
 W – влажность сырья, %.

Содержание индивидуальных органических кислот в витаминных сборах и компонентах представлено в таблице 5.1.

Согласно полученным данным, сорбиновую кислоту можно рассматривать в качестве маркера для оценки подлинности рябины обыкновенной и витаминного сбора №2 при проведении анализа методом ВЭЖХ.

На основании результатов ВЭЖХ анализа было решено использовать лимонную кислоту, как преобладающий компонент, при пересчете количественного содержания суммы органических кислот для плодов шиповника, плодов смородины черной и витаминного сбора №1 (табл.5.1).

Таблица 5.1

Количественное содержание различных органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах (ВЭЖХ)

n=5; p=0,95

Объект исследования	Содержание индивидуальных органических кислот, мг/г						
	яблочная	сорбиновая	лимонная	фумаровая	винная	аскорбиновая	Сумма кислот
Плоды шиповника	1,990	--	25,485	0,007	--	1,145	28,627
Плоды рябины обыкновенной	33,786	2,145	1,861	0,049	0,272	0,005	38,118
Плоды смородины черной	6,294	--	79,489	0,029	0,343	0,407	86,562
Витаминный сбор №1	4,082	--	50,343	0,012	0,289	0,332	55,058
Витаминный сбор №2	16,951	0,891	13,068	0,249	0,195	0,137	31,491

5.1.2 Установление содержания суммы органических кислот алкалиметрией с использованием индикаторов

Для определения содержания суммы свободных органических кислот в витаминных сборах №1, №2 и отдельных компонентах применяли модифицированную методику кислотно-основного титрования, предложенную в ГФ XI (ФС 38 «Плоды шиповника»). Небольшие изменения в методику ГФ внесены для получения более точных и сопоставимых результатов [57, 58, 59, 96].

Около 25 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещали в колбу вместимостью 500 мл, заливали 250 мл дистиллированной воды и выдерживали в течение 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем охлаждали, фильтровали, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводили объем извлечения водой до метки и перемешивали.

Аликвоту извлечения равную 10 мл, помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 200 мл дистиллированной воды, 1 мл 1% спиртового раствора фенолфталеина и 2 мл 0,1% раствора метиленового синего и титровали раствором едкого натра в концентрации 0,1 моль/л до появления в пене лилово-красной окраски.

Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную и лимонную кислоты соответственно, в зависимости от содержания этих кислот в анализируемом объекте, согласно данным ВЭЖХ анализа в процентах (X) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \cdot T \cdot K \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

$T = 0,0067$ – количество яблочной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

$T = 0,0064$ – количество лимонной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах;

K – поправочный коэффициент;

V_a – объем извлечения, взятого на титрование, в миллилитрах;

m – масса сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах;

250 – объем полученного извлечения, в миллилитрах.

Результаты определения содержания суммы свободных органических кислот в плодах шиповника, рябины и калины представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2

Содержание суммы органических кислот в витаминных сборах №1 и 2 и их компонентах (алкалиметрия с использованием индикаторов).

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

Объект исслед. Содерж. орг. кислот, %	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды черной смородины	Витаминный сбор №1 ¹	Витаминный сбор №2 ¹	Витаминный сбор №2 (Фирма Здоровье) ²
X, %	2,74±0,01	3,78±0,02	7,18±0,09	4,02±0,07	3,06±0,02	3,70±0,02
Норма по НД, %	не мене 2,6	не менее 3,2%	не норм.	не норм.	не норм.	не норм.
Теоретическое значение*	--	--	--	4,96	3,26	--

1 – модельные образцы витаминных сборов №1 и №2

2 – промышленный образец витаминного сбора №2

* – теоретическое значение, рассчитанное исходя из содержания органических кислот в компонентах сбора

По данным, приведенным в таблице 5.2 и рисунке 5.5, можно заключить, что экспериментально полученные данные по показателю «суммы органических кислот» в плодах шиповника и плодах рябины обыкновенной соответствуют норме в ГФ XI и ФСП. Небольшое различие в содержании суммы органических кислот в модельном образце витаминного сбора №2 и в промышленном, скорее всего, связано с использованием сырья различных производителей. Наибольшее содержание суммы органических кислот обнаружено в плодах смородины черной.

Теоретическое значение содержания суммы органических кислот, рассчитанное на основании значений отдельных компонентов сборов, для витаминных сборов №1 и №2 близко к полученному в ходе эксперимента (табл.5.2). Расхождение в практическом и теоретическом значениях могут быть связаны с влиянием сопутствующих веществ в сборах (возможно значительное содержание этерифицированных форм).

В связи с высоким содержанием органических кислот в плодах смородины черной, показатель «сумма свободных органических кислот» может быть рассмотрен для стандартизации сырья. Поэтому было проведено исследование по изучению изменчивости количественного содержания суммы органических кислот в плодах смородины черной в зависимости от года и места заготовки.

Таблица 5.3

Сумма органических кислот в пересчете на лимонную кислоту в плодах смородины, заготовленных в различных районах

n=5; p=0,95

Район заготовки, год	Содержание суммы органических кислот, %	
	<i>Индикаторное титрование</i>	<i>Потенциометрическое титрование</i>
Брянская обл.,2014 г.	7,18±0,09	6,35±0,09
Брянская обл.,2015 г.	7,11±0,06	6,28±0,06
Брянская обл.,2016 г.	7,26±0,02	6,78±0,02
Брянская обл.,2017 г.	7,06±0,04	6,55±0,04
Московская обл.,2015 г.	7,23±0,05	6,43±0,02
Московская обл.,2017 г.	7,61±0,02	6,32±0,05

Данные таблицы 5.3 показывают, что содержание свободных органических кислот в плодах смородины черной достаточно стабильно и колеблется от 7,04 до 7,63%, что позволяет рекомендовать норму этого показателя не менее 7,0%. В случае использования потенциометрического титрования, рекомендуемая норма будет ниже и составит не менее 6,2%.

5.1.3 Установление содержания суммы органических кислот потенциометрическим титрованием

При использовании методов количественного определения со смесью индикаторов, визуальная индикация конечной точки титрования затруднена в случае интенсивной окраски самих водных извлечений, таких как извлечения из плодов смородины черной.

Наибольшей точностью обладают инструментальные методы, поэтому определение суммы свободных органических кислот было проведено с помощью потенциометрического титрования на рН-метре «Аквилон рН-410» [57, 59, 96, 101].

Около 25 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещали в колбу вместимостью 250 мл, заливали 200 мл воды очищенной и выдерживали в течение 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем охлаждали, фильтровали, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводили объем извлечения водой до метки и перемешивали.

В мерный стакан с помощью пипетки отмеряли 25 мл водного извлечения, опускали комбинированный стеклянный электрод (стеклянный и хлорсеребряный электроды), присоединенный к соответствующему входу на рН-метре. Титровали 0,1 М раствора натрия гидроксида из микробюретки при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Фиксировали показания рН-метра и по полученным результатам строили кривые титрования в координатах $pH = f(V_{NaOH})$ для определения точки эквивалентности (кривые потенциометрического титрования представлены на рисунках 5.1А, 5.2А, 5.3А, 5.4А).

Также были построены дифференциальные кривые в координатах dV/dpH , по которым можно более точно определить конечную точку титрования и содержание суммы органических кислот в анализируемых пробах (дифференциальные кривые титрования представлены на рисунках 5.1Б, 5.2Б, 5.3Б, 5.4Б).

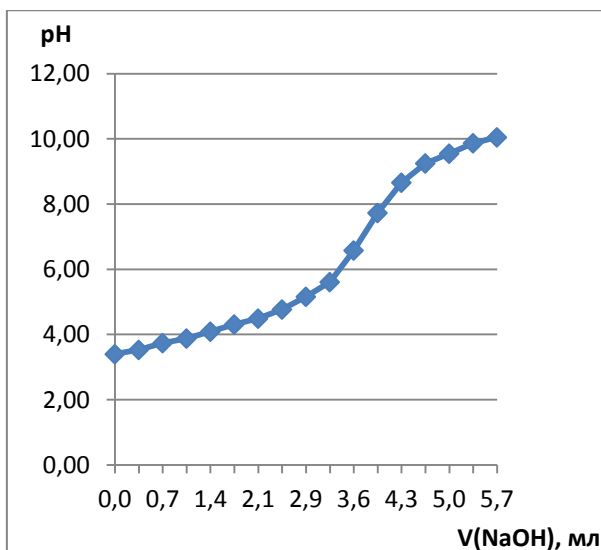


Рис. 5.1А. Интегральная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в плодах шиповника 0,1 М раствором натрия гидроксида

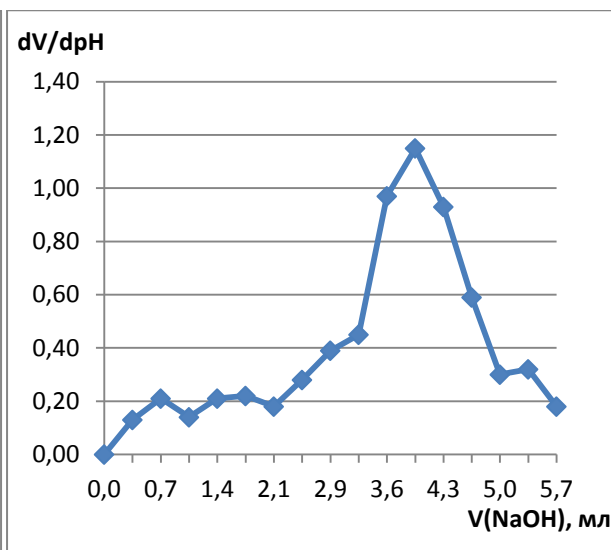


Рис. 5.1Б. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в плодах шиповника 0,1 М раствором натрия гидроксида

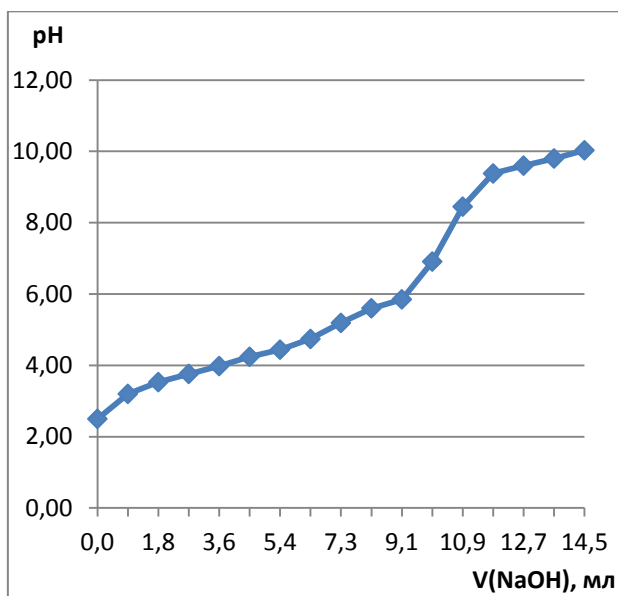


Рис. 5.2А. Интегральная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в сборе витаминном №1 0,1 М раствором натрия гидроксида

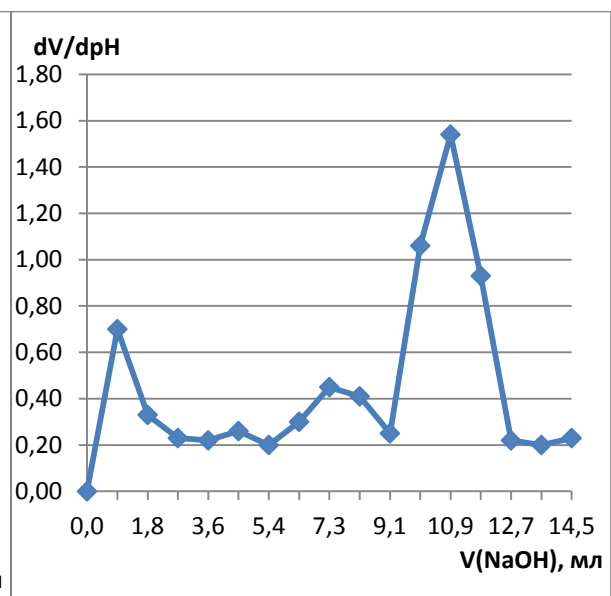


Рис. 5.2Б. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в сборе витаминном №1 0,1 М раствором натрия гидроксида

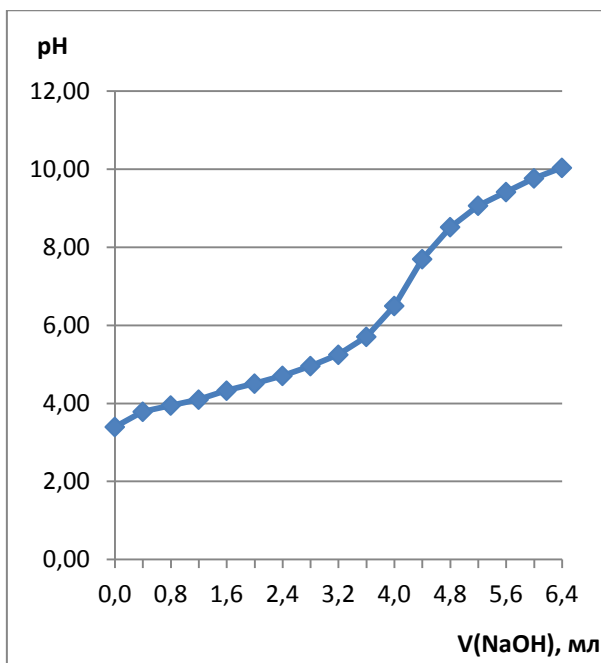


Рис. 5.3А. Интегральная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в сборе витаминном №2 0,1 М раствором натрия гидроксида

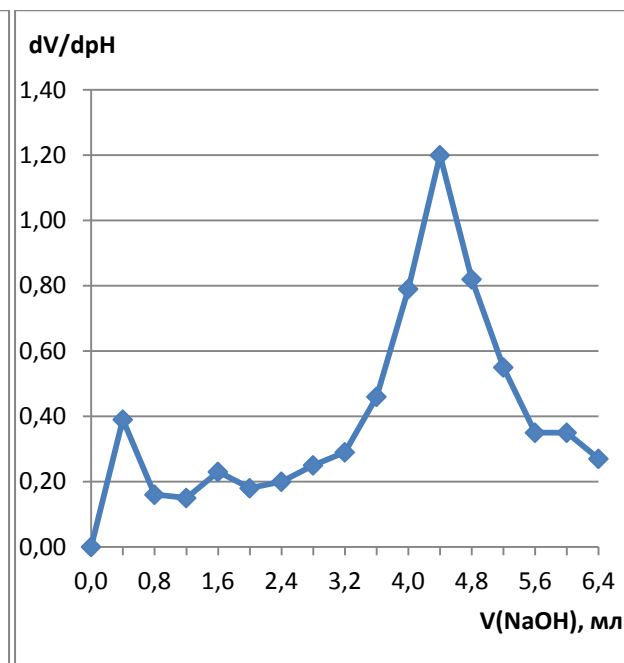


Рис. 5.3Б. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в сборе витаминном №2 раствором натрия гидроксида

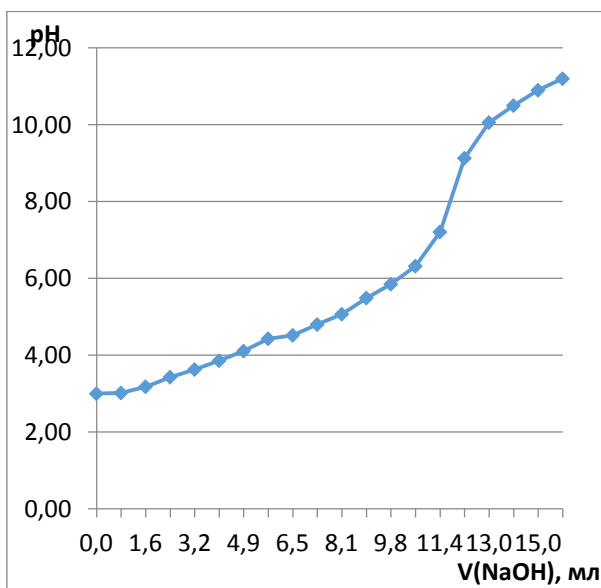


Рис. 5.4А. Интегральная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в плодах смородины черной 0,1 М раствором натрия гидроксида

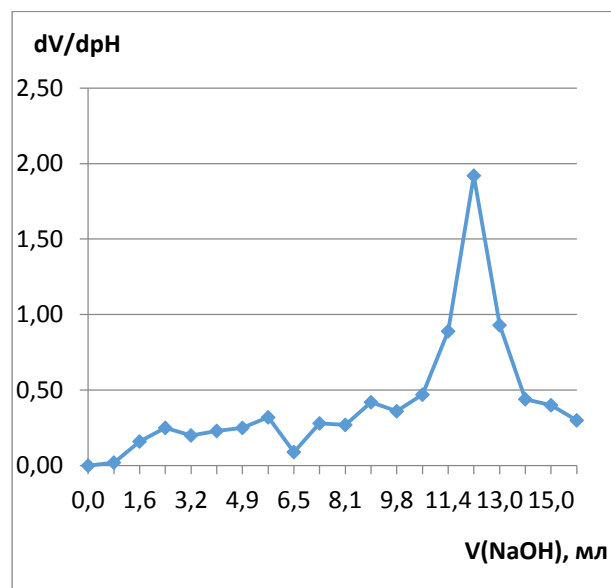


Рис. 5.4Б. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот в плодах смородины черной раствором натрия гидроксида

Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную и лимонную кислоты в процентах (X) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \cdot T \cdot K \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

$T = 0,0067$ – количество яблочной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

$T = 0,0064$ – количество лимонной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах;

K – поправочный коэффициент;

V_a – объем извлечения, взятый на титрование, в миллилитрах;

m – масса сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

250 – объем полученного извлечения, в миллилитрах.

Результаты по содержанию суммы свободных органических кислот, полученные потенциометрическим титрованием, представлены в таблице 5.4 и рисунке 5.5.

Таблица 5.4

Сумма свободных органических кислот в пересчете на яблочную и лимонную кислоты в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах (потенциометрическое титрование)

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

Объект исследования	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды черной смородины	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X, %	2,02±0,02	3,68±0,08	6,35±0,09	3,47±0,06	3,01±0,06

Из представленных в таблицах 5.2 и 5.4 данных можно заключить, что результаты индикаторного титрования несколько завышены, что можно объяснить затруднением индикации конечной точки титрования вследствие интенсивной окраски анализируемых объектов, кроме того, интервал перехода используемого индикатора фенолфталеина находится достаточно в широком диапазоне pH 8.2-9.8, что также может влиять на результаты. При

потенциометрическом титровании фиксируется скачок потенциала индикаторного электрода, что обеспечивает более точное детектирование конечной точки титрования. Т.о. для анализа содержания суммы свободных органических кислот в плодах смородины черной и витаминного сбора №1 более пригодным можно считать потенциометрическое титрование.

5.1.4 Установление содержания суммы органических кислот кулонометрическим титрованием

Кулонометрическое титрование проводили с помощью прибора «Эксперт-006». Электрогенерацию гидроксид-ионов проводили при постоянной силе тока 5,6-5,7 мА из насыщенного раствора сульфата калия, служившего электролитом. Индикацию конечной точки титрования проводили с помощью комбинированного рН-электрода ЭСК-10614 [57, 59, 96].

Методика. 25 г измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, сырья помещали в колбу вместимостью 250 мл, заливали 200 мл воды очищенной и выдерживали в течение 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем охлаждали, фильтровали, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводили объем извлечения водой до метки и перемешивали.

В мерный стакан отмеряли 50 мл раствора электролита, проводили генерацию гидроксид-ионов, пипеткой вводили аликвоту водного извлечения ($V_a = 0,5$ мл). Органические кислоты титруются сгенерированными гидроксид-ионами. Прибор кулонометр «Эксперт-006» автоматически обрабатывает данные и выдает результат в виде содержания кислот в мкг в аликвоте.

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

$$X = \frac{X \cdot 10^{-6} \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

X – показания кулонометра, содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту, в микрограммах;

V_a – объем извлечения, взятый на титрование, в миллилитрах;

m – масса сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

250 – объем полученного извлечения, в миллилитрах.

Результаты по содержанию органических кислот на кулонометре представлены в таблице 5.5 и рисунке 5.5.

Таблица 5.5

Сумма органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах (кулонометрия)

n=5; p=0,95

Объект исследования	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды черной смородины	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X, %	2,60±0,05	2,98±0,07	8,79±0,03	6,31±0,05	3,15±0,08

Результаты кулонометрического титрования несколько занижены по сравнению с результатами, полученными с помощью других методик, но обеспечивают достаточно высокую точность в анализе. Сводные результаты по содержанию суммы свободных органических кислот, установленное различными методами индикации, представлено в таблице 6.6.

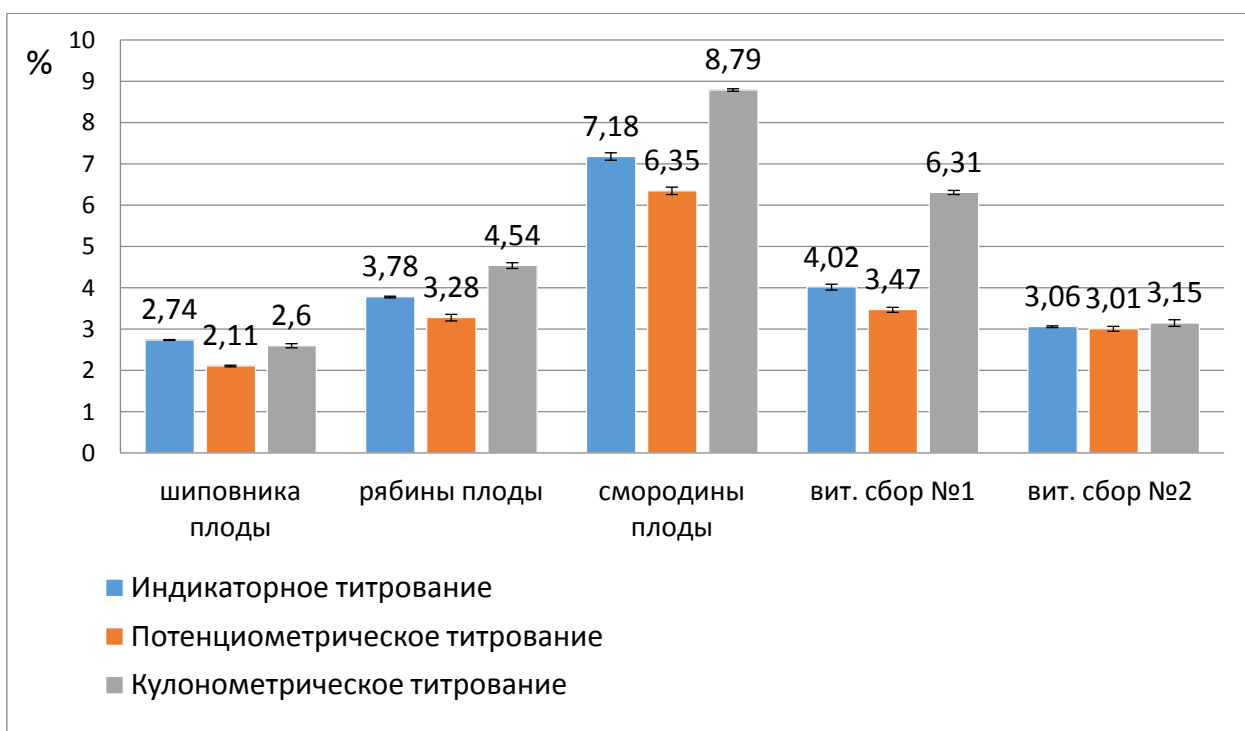


Рис. 5.5. Содержание суммы органических кислот, установленное методами с различной индикацией конечной точки титрования

Сравнение данных о сумме свободных органических кислот в витаминных сборах №1 и №2, а также в их компонентах, полученных индикаторным, потенциометрическим и кулонометрическим титрованием, показало большую стабильность результатов, полученных потенциометрическим титрованием, а также большую сходимость этих данных с результатами методики индикаторного титрования. Кулонометрическое титрование, особенно в случае анализа настоев дало слишком сильный разброс с данными, полученными другими методами (табл.7.6).

5.2 Валидация методик потенциометрического титрования органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах

Правомерность использования потенциометрического титрования в анализе органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и плодах смородины черной была доказана проведением валидации [8, 53, 113] предложенных методик.

5.2.1 Валидация методики потенциометрического титрования органических кислот в плодах смородины черной

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

1) Специфичность

Рисунки 5.6, 5.7, 5.8 иллюстрируют специфичность разработанной методики - результаты титрования экстрагента, извлечения из плодов смородины, раствора лимонной кислоты.

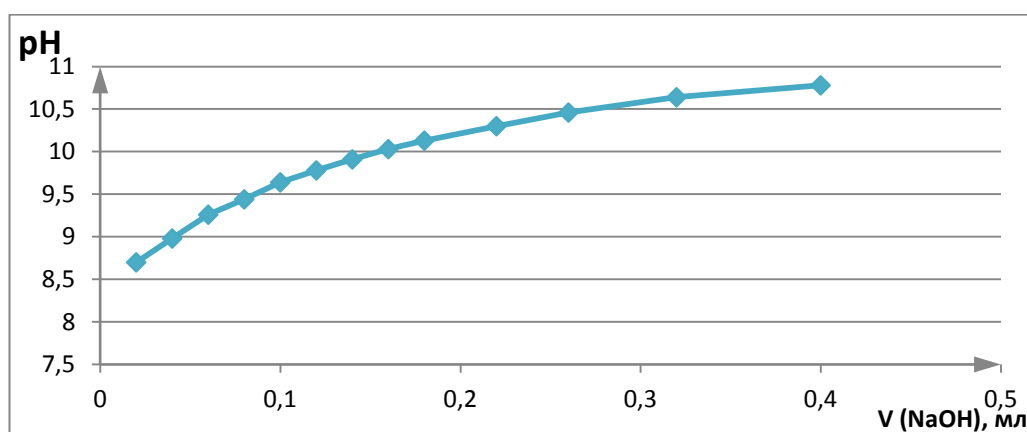


Рис. 5.6. Кривая титрования воды очищенной раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

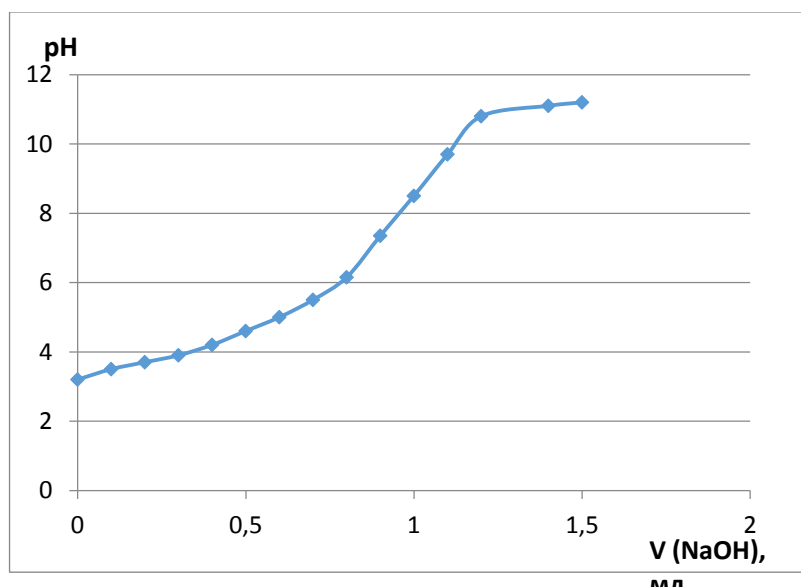


Рис.5.7. Кривая титрования 0,1 М раствора лимонной кислоты раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

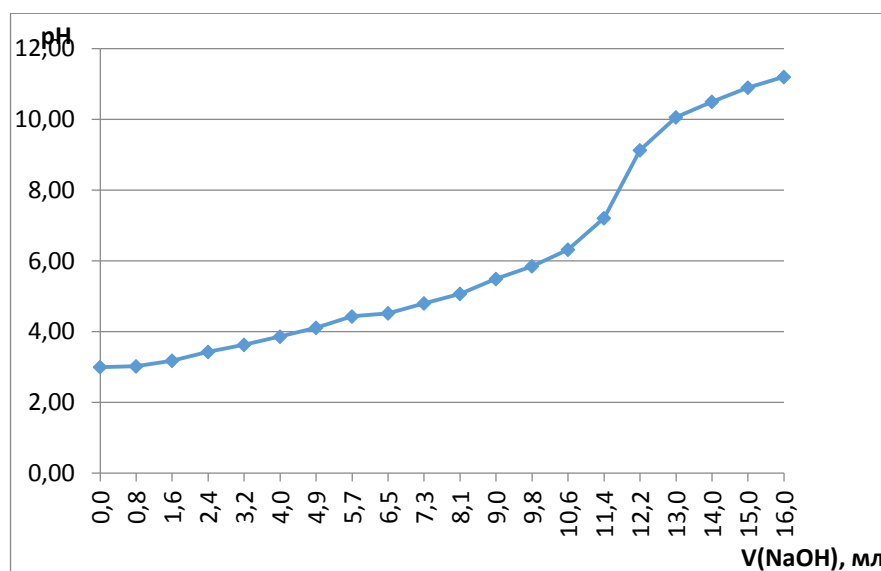


Рис.5.8. Кривая титрования извлечения плодов смородины раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

2) *Линейность*

Линейность методики доказана если в выбранном диапазоне применения можно показать прямопропорциональное соотношение между концентрацией исследуемого вещества в растворе и расходом титранта. Для доказательства линейности готовили растворы с 5 различными концентрациями исследуемого вещества (лимонной кислоты) в диапазоне концентраций 80-120%. Для этого условно принимали, что концентрация лимонной кислоты в анализируемой пробе соответствует 100% и составляет 3,12 г/л. Для получения раствора с уровнем концентрации 80% проводили разбавление анализируемого раствора в 1,25 раза. Для создания уровня концентрации 90% раствор разбавляли в 1,11 раза. Концентрации уровней 110% и 120% получали добавлением к анализируемому раствору 7,8 мг и 15,6 мг лимонной кислоты соответственно.

Таблица 5.6

Линейность потенциометрического определения суммы органических кислот в пересчете на лимонную кислоту в извлечении плодов смородины

Уровень концентрации	Концентрация суммы кислот в пересчете на лимонную к-ту, г/л	Расход 0,1 М NaOH
80	2,50	9,78
80	2,51	9,81
90	2,81	10,99
90	2,80	10,95
100	3,12	12,20
100	3,15	12,30
110	3,44	13,44
110	3,43	13,39
120	3,75	14,66
120	3,74	14,62

Таблица 5.7

Линейность потенциометрического титрования органических кислот
(статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y = -0.39241 + 4.01726 x$
Наклон a	4,01726
Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал	0,39241
Коэффициент корреляции r	0,999

Согласно данным таблицы 5.7, коэффициент корреляции больше 0,990, следовательно, линейность считается доказанной.

3) Диапазон применения

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

4) Правильность

Правильность определялась по методу добавок. Отклик определялся путем добавления действующего вещества к исследуемому образцу с уровнем концентрации 70% от выбранной концентрации в пробе. Затем добавками содержание лимонной кислоты доводили до 80, 100, 120 %.

Таблица 5.8

Правильность методики потенциометрического определения органических кислот

Уровень концентрации, %	Добавленная масса лимонной кислоты, мг	Расход 0,1М натрия гидроксида, мл	Определенное содержание лимонной кислоты, мг	Заданное содержание лимонной кислоты, мг	Отклик, %
80	8,1	9,81	62,8	62,7	100,16
80	7,7	9,78	62,6	62,3	100,48
80	7,9	9,79	62,7	62,5	100,35
100	22,8	12,1	77,4	77,4	100
100	23,6	12,3	78,7	78,2	100,64
100	22,9	12,0	76,8	77,5	99,10
120	38,6	14,4	92,2	93,2	98,93
120	41,0	15,0	96,0	95,6	100,42
120	37,8	14,3	91,5	92,4	99,05

Для получения уровня концентрации 70% 17,5 мл извлечения доводили в мерной колбе до 25 мл водой. Далее добавлением навесок лимонной кислоты уровень концентрации доводили до 80, 100, 120%.

Таблица 5.9

Статистические характеристики потенциометрического титрования органических кислот в пересчете на лимонную кислоту

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,90
Значение стандартного отклонения	0,68
Значение коэффициента вариации (КВ)	0,68
Доверительный интервал - нижняя граница (p=95%)	98,93
Доверительный интервал - верхняя граница (p=95%)	100,64

Коэффициент вариации меньше 1,5, следовательно, критерий доказан.

5) Прецизионность

5.1. Сходимость (повторяемость)

Сходимость была доказана при помощи испытаний 6 проб одной серии с концентрацией исследуемого вещества в анализируемом растворе, равной 100% плодов смородины черной (табл. 5.10).

Таблица 5.10

Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот

Проба	Расход 0,1M NaOH, мл	Содержание органических кислот в пересчете на лимонную к-ту, г/л
1	12,22	3,13
2	12,28	3,14
3	12,18	3,12
4	12,20	3,12
5	12,24	3,13
6	12,31	3,15

Таблица 5.11

Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот
(статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	3,12
Наибольшее значение, %	3,15
Среднее значение, %	3,132
Значение стандартного отклонения, %	0,012
Значение коэффициента вариации (КВ), %	0,373
Доверительный интервал (p=95%), %	3,120 – 3,144

Коэффициент вариации меньше 1,5, следовательно, критерий доказан.

5.2. Промежуточная прецизионность

Доказывалось, что методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от изменения внешних обстоятельств при однородности пробы. В качестве обстоятельств были выбраны такие типичные переменные, как сотрудники и день анализа.

Таблица 5.12

Результаты определения сходимости

Обозначение	Сотрудник А, день 1			Сотрудник Б, день 2		
	Навеска сырья, г	Расход NaOH, 0,1 М	Содержание суммы свободных органических кислот*, %	Навеска сырья, г	Расход NaOH, 0,1 М	Содержание суммы свободных органических кислот*
1	25,0036	12,08	3,27	25,0148	12,20	3,30
2	25,0117	12,44	3,36	25,0001	12,23	3,31
3	25,0210	12,37	3,34	25,0203	12,31	3,33
4	25,0008	12,22	3,30	25,0168	11,90	3,21
5	25,0011	12,16	3,29	25,0060	12,27	3,32
6	24,9989	11,99	3,24	25,1003	11,90	3,22

*В пересчете на лимонную кислоту и абсолютно сухое сырье.

Таблица 5.13

Результаты определения сходимости (статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты Сотрудник А	Результаты Сотрудник Б
Наименьшее значение, %	3,24	3,21
Наибольшее значение, %	3,36	3,32
Среднее значение, %	3,30	3,28
Стандартное отклонение	0,0443	0,0527
Коэффициент вариации, %	0,0134	0,0161
F (5%; 5; 5)=5,05	Контрольное значение 1,4	
t (5%; 10)	Контрольное значение 1	

Согласно значениям таких статистических характеристик, как критерий Стьюдента и критерий Фишера, можно сделать вывод о незначимости исследуемых переменных факторов на результаты анализа.

5.2.2 Валидация методики потенциометрического титрования органических кислот в витаминном сборе №1

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

1) Специфичность

Рисунки 5.9, 5.10, 5.11 иллюстрируют специфичность разработанной методики - результаты титрования экстрагента, извлечения из витаминного сбора №1, раствора лимонной кислоты.

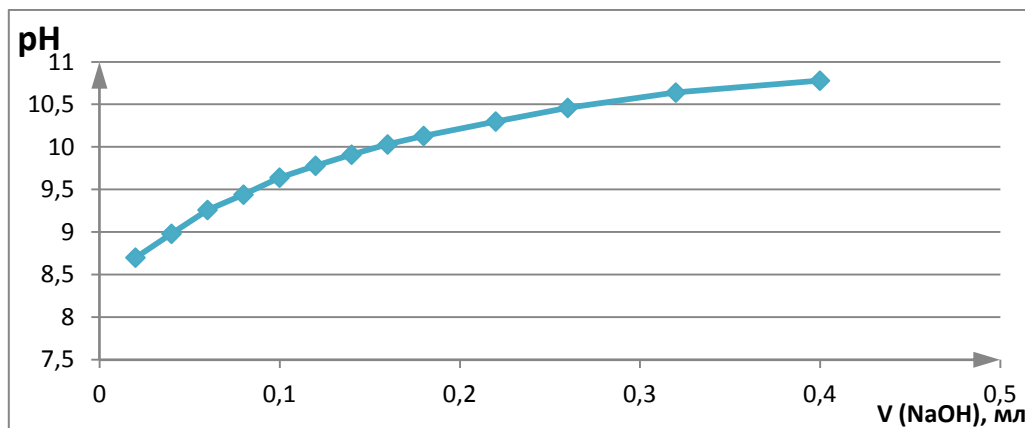


Рис. 5.9. Кривая титрования воды очищенной раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

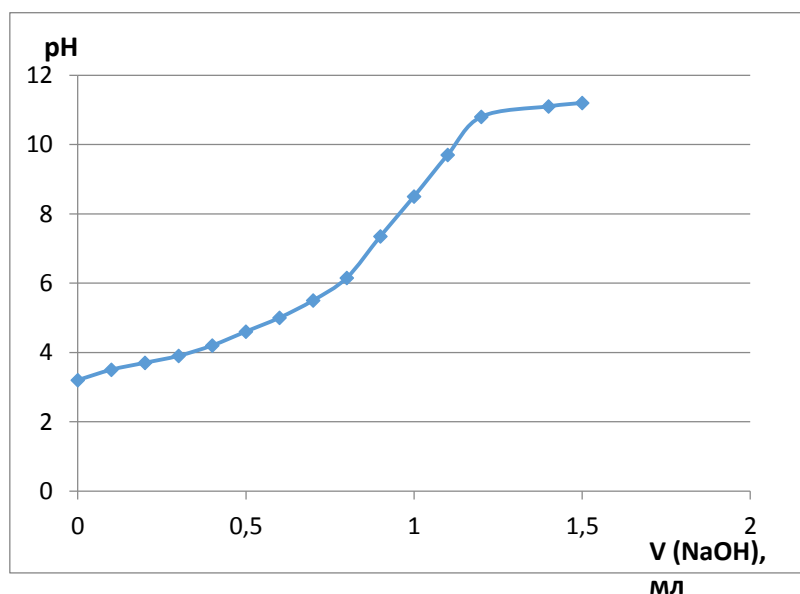


Рис.5.10. Кривая титрования 0,1 М раствора лимонной кислоты раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

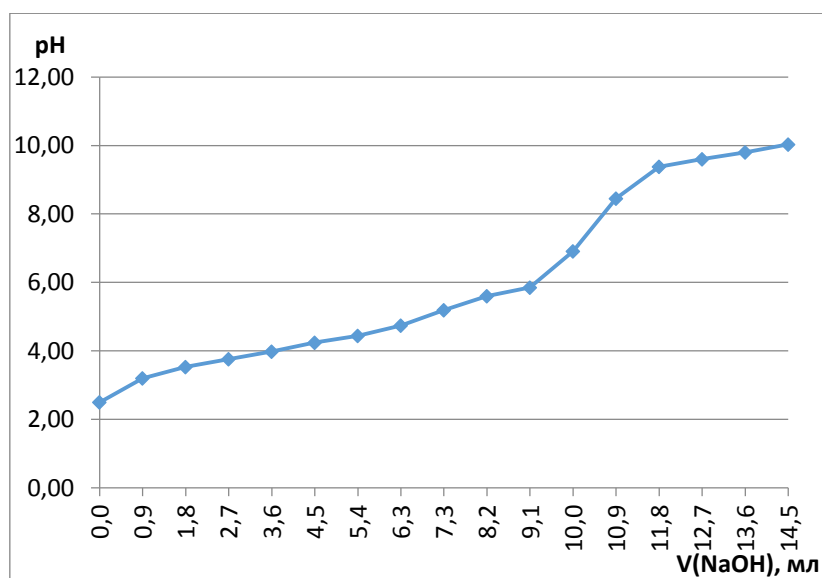


Рис.5.11. Кривая титрования извлечения из витаминного сбора №1 раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

2) *Линейность*

Линейность методики доказана если в выбранном диапазоне применения можно показать прямопропорциональное соотношение между концентрацией исследуемого вещества в растворе и расходом титранта. Для доказательства линейности готовили растворы с 5 различными концентрациями исследуемого вещества (лимонной кислоты) в диапазоне концентраций 80-120%. Для этого условно принимали, что концентрация лимонной кислоты в анализируемой пробе соответствует 100% и составляет 2,79 г/л. Для создания уровня концентрации 80% раствор разбавляли в 1,25 раза: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили 20 мл раствора А и доводили водой до метки. Для создания уровня концентрации 90% раствор разбавляли в 1,11 раза концентрация уровня 110% и 120% получали добавлением к анализируемому раствору 6,9 мг и 13,9 мг лимонной кислоты соответственно.

Таблица 5.14

Линейность потенциометрического определения суммы органических кислот в пересчете на лимонную кислоту в извлечении из витаминного сбора №1

Уровень концентрации	Концентрация суммы кислот в пересчете на лимонную к-ту, г/л	Расход 0,1 М NaOH
80	2,225	8,69
80	2,237	8,74
90	2,522	9,85
90	2,504	9,78
100	2,792	10,90
100	2,831	11,06
110	3,059	11,95
110	3,110	12,15
120	3,343	13,06
120	3,359	13,12

Таблица 5.15

Линейность потенциометрического титрования органических кислот
(статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y = 3.9072 x - 0.00324$
Наклон а	3.9072
Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	0.00324
Коэффициент корреляции r	1,000

Согласно данным таблицы 6.14, коэффициент корреляции больше 0,990, следовательно, линейность считается доказанной.

3) Диапазон применения

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

4) Правильность

Правильность определялась по методу добавок. Отклик определялся путем добавления действующего вещества к исследуемому образцу с

уровнем концентрации 70% от выбранной концентрации в пробе (в 1,43 раза). В мерную колбу к 25 мл добавляли 17,5 и доводили до метки. Затем добавками содержание лимонной кислоты доводили до 80, 100, 120 %.

Таблица 5.16

Правильность методики потенциометрического определения органических кислот

Уровень концентрации, %	Добавленная масса лимонной кислоты, мг	Расход 0,1М натрия гидроксида, мл	Определенное содержание лимонной кислоты, мг	Заданное содержание лимонной кислоты, мг	Отклик, %
80	7,2	8,91	2,281	2,280	100,04
80	6,9	8,86	2,268	2,268	100,0
80	7,4	8,94	2,289	2,288	100,04
100	21,4	11,12	2,847	2,848	99,96
100	20,8	11,00	2,816	2,824	99,71
100	21,7	11,16	2,857	2,860	99,90
120	35,4	13,29	3,402	3,408	99,82
120	35,8	13,33	3,412	3,424	99,66
120	35,5	13,34	3,415	3,412	100,08

Для получения уровня концентрации 70% 17,5 мл извлечения доводили в мерной колбе до 25 мл водой. Далее добавлением навесок лимонной кислоты уровень концентрации доводили до 80,100,120%.

Таблица 5.17

Статистические характеристики потенциометрического титрования органических кислот в пересчете на лимонную кислоту

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,91
Значение стандартного отклонения	0,15
Значение коэффициента вариации (КВ)	0,15
Доверительный интервал - нижняя граница (p=95%)	99,66
Доверительный интервал - верхняя граница (p=95%)	100,08

Коэффициент вариации меньше 1,5, следовательно критерий доказан.

5) Прецизионность

5.1. Сходимость (повторяемость)

Сходимость была доказана при помощи испытаний 6 проб одной серии с концентрацией исследуемого вещества в анализируемом растворе, равной 100%. Витаминного сбора №1 (табл. 5.18).

Таблица 5.18

Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот

Проба	Расход 0,1М NaOH, мл	Содержание органических кислот в пересчете на лимонную к-ту, г/л
1	10,93	2,88
2	11,08	2,92
3	10,88	2,87
4	11,12	2,93
5	11,05	2,91
6	10,95	2,89

Таблица 5.19

Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот
(статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	2,90
Наибольшее значение, %	3,15
Среднее значение, %	2,90
Значение стандартного отклонения, %	0,022
Значение коэффициента вариации (КВ), %	0,816
Доверительный интервал (p=95%), %	2,878 – 2,922

Коэффициент вариации меньше 1,5, следовательно критерий доказан.

5.2. Промежуточная прецизионность

Доказывалось, что методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от изменения внешних обстоятельств при однородности пробы. В качестве обстоятельств были выбраны такие типичные переменные, как сотрудники и день анализа.

Таблица 5.20

Результаты определения сходимости

Обозначение	Сотрудник А, день 1			Сотрудник Б, день 2		
	Навеска сырья, г	Расход NaOH, 0,1 М	Содержание суммы свободных органических кислот*, %	Навеска сырья, г	Расход NaOH, 0,1 М	Содержание суммы свободных органических кислот*
1	25,0349	11,32	2,98	25,0124	10,81	2,85
2	25,0018	10,73	2,83	25,0390	10,72	2,82
3	25,0003	10,95	2,89	25,0016	11,04	2,91
4	25,0118	11,08	2,92	25,0098	11,02	2,90
5	25,0412	12,04	2,90	25,0032	10,98	2,98
6	25,0094	10,99	2,90	25,0318	10,99	2,89

*В пересчете на лимонную кислоту и абсолютно сухое сырье.

Таблица 5.21

Результаты определения сходимости (статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты Сотрудник А	Результаты Сотрудник Б
Наименьшее значение, %	2,83	2,82
Наибольшее значение, %	2,98	2,98
Среднее значение, %	2,90	2,89
Стандартное отклонение	0,0484	0,0549
Коэффициент вариации, %	0,0167	0,0189
F (5%; 5; 5)=5,05	Контрольное значение 1,29	
t (5%; 10)	Контрольное значение 0,5	

Согласно значениям таких статистических характеристик, как критерий Стьюдента и критерий Фишера, можно сделать вывод о незначимости исследуемых переменных факторов на результаты анализа.

5.2.3 Валидация методики потенциометрического титрования органических кислот в витаминном сборе №2

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

1. Специфичность.

Рисунки 5.12, 5.13, 5.14 иллюстрируют специфичность разработанной методики - результаты титрования экстрагента, извлечения из витаминного сбора №2, раствора яблочной кислоты.

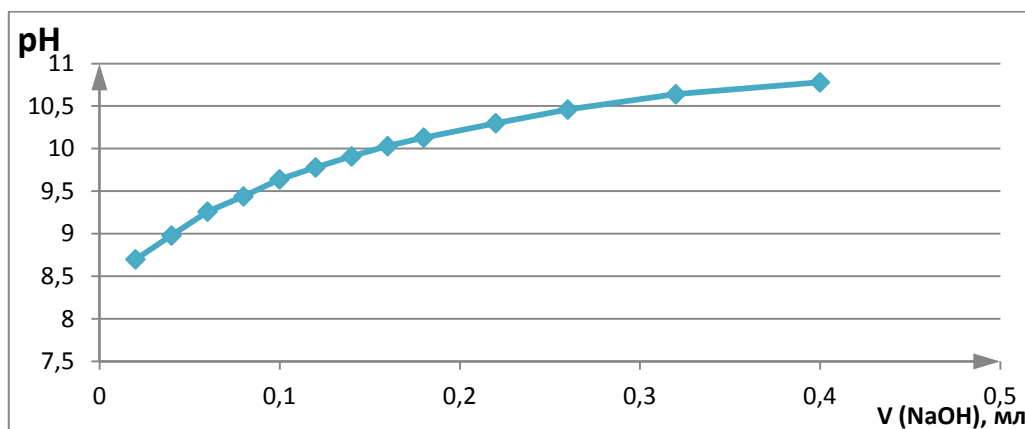


Рис. 5.12. Кривая титрования воды очищенной раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

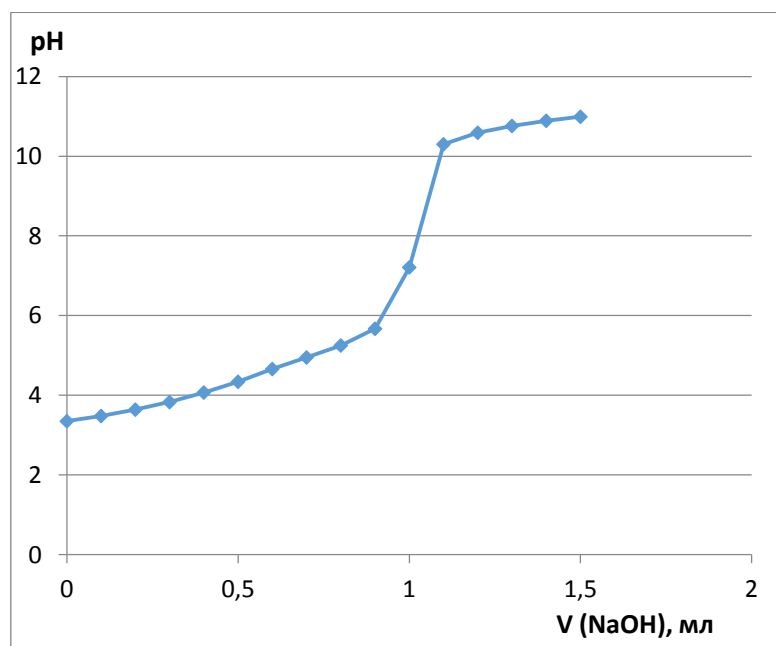


Рис.5.13. Кривая титрования 0,1 М раствора яблочной кислоты раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

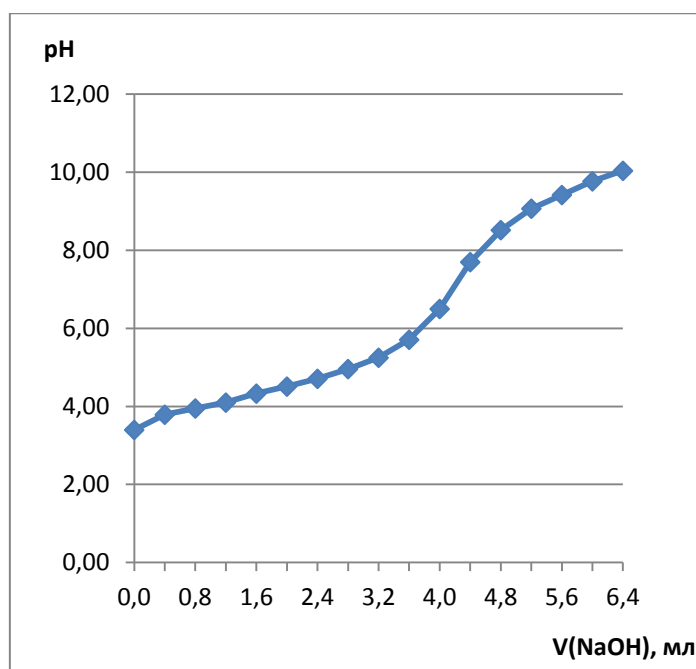


Рис.5.14. Кривая титрования извлечения витаминного сбора №2 раствором натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М

2. Линейность.

Линейность методики доказана если в выбранном диапазоне применения можно показать прямопропорциональное соотношение между концентрацией исследуемого вещества в растворе и расходом титранта. Для доказательства линейности готовили растворы с 5 различными концентрациями исследуемого вещества (яблочной кислоты) в диапазоне концентраций 80-120%. Для этого условно принимали, что концентрация лимонной кислоты в анализируемой пробе соответствует 100% и составляет 74,7 мг. Для получения раствора с уровнем концентрации 80% проводили разбавление анализируемого раствора в 1,25 раза (20 мл рствора А в мерную колбу на 25 мл и до метки водой). Для создания уровня концентрации 90% раствор разбавляли в 1,11 раза концентрация уровня 110% и 120% получали добавлением к анализируемому раствору 7,5 мг и 14,9 мг лимонной кислоты соответственно.

Таблица 5.22

Линейность потенциометрического определения суммы органических кислот в пересчете на ялочную кислоту в извлечении из витаминного сбора №2

Уровень концентрации	Концентрация суммы кислот в пересчете на лимонную к-ту, г/л	Расход 0,1 М NaOH
80	2,389	8,91
80	2,394	8,93
90	2,687	10,03
90	2,691	10,04
100	2,988	11,15
100	2,999	11,19
110	3,285	12,26
110	3,288	12,27
120	3,584	13,37
120	3,589	13,39

Таблица 5.23

Линейность потенциометрического титрования органических кислот
(статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	$y = 2.9702 x + 1.9778$
Наклон a	2.9702
Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	1.9778
Коэффициент корреляции r	0,996

Согласно данным таблицы 5.23, коэффициент корреляции больше 0,990, следовательно, линейность считается доказанной.

3. Диапазон применения.

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

4. Правильность

Правильность определялась по методу добавок. Отклик определялся путем добавления действующего вещества к исследуемому образцу с уровнем концентрации 70% от выбранной концентрации в пробе. Затем добавками содержание яблочной кислоты доводили до 80, 100, 120 %.

Таблица 5.24

Правильность методики потенциометрического определения органических кислот

Уровень концентрации, %	Добавленная масса яблочной кислоты, мг	Расход 0,1М натрия гидроксид а, мл	Определенное содержание яблочной кислоты, мг	Заданное содержание яблочной кислоты, мг	Отклик, %
80	7,5	8,91	59,7	59,8	99,83
80	7,8	8,98	60,2	60,1	100,17
80	7,2	8,86	59,4	59,5	99,83
100	22,3	11,13	74,6	74,6	100,0
100	22,0	11,07	74,2	74,3	99,87
100	22,5	11,14	74,6	74,8	99,73
120	37,5	13,41	89,8	89,8	100,0
120	37,0	13,30	89,1	89,3	99,78
120	37,2	13,35	89,4	89,5	99,89

Для получения уровня концентрации 70% 17,5 мл извлечения доводили в мерной колбе до 25 мл водой. Далее добавлением навесок яблочной кислоты уровень концентрации доводили до 80,100,120%.

Таблица 5.25.

Статистические характеристики потенциометрического титрования органических кислот в пересчете на яблочную кислоту

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,91
Значение стандартного отклонения	0,14
Значение коэффициента вариации (КВ)	0,14
Доверительный интервал - нижняя граница (p=95%)	99,73
Доверительный интервал - верхняя граница (p=95%)	100,17

Коэффициент вариации меньше 1,5, следовательно критерий доказан.

5. Прецизионность

5.1. Сходимость (повторяемость)

Сходимость была доказана при помощи испытаний 6 проб одной серии с концентрацией исследуемого вещества в анализируемом растворе, равной 100%. плодов смородины черной (табл. 5.26).

Таблица 5.26

Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот

Проба	Расход 0,1М NaOH, мл	Содержание органических кислот в пересчете на яблочную к-ту, мг
1	11,15	73,8
2	11,23	75,2
3	10,98	73,6
4	11,05	74,0
5	11,02	73,8
6	10,99	73,6

Таблица 5.27

Повторяемость потенциометрического титрования органических кислот
(статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	73,6
Наибольшее значение, %	75,2
Среднее значение, %	74
Значение стандартного отклонения, %	0,61
Значение коэффициента вариации (КВ), %	0,819
Доверительный интервал ($p=95\%$), %	73,39 – 74,61

Коэффициент вариации меньше 1,5, следовательно критерий доказан.

5.2. Промежуточная прецизионность

Доказывалось, что методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от изменения внешних обстоятельств при однородности пробы. В качестве обстоятельств были выбраны такие типичные переменные, как сотрудники и день анализа.

Таблица 5.28

Результаты определения сходимости

Обозначение	Сотрудник А, день 1			Сотрудник Б, день 2		
	Навеска сырья, г	Расход NaOH, 0,1 М	Содержание суммы свободных органических кислот*, %	Навеска сырья, г	Расход NaOH, 0,1 М	Содержание суммы свободных органических кислот*
1	25,0043	11,18	3,09	25,0011	11,16	3,09
2	25,1034	11,15	3,07	25,0008	11,08	3,07
3	25,0269	11,09	3,06	25,0183	11,19	3,09
4	25,0018	11,17	3,09	25,0450	11,21	3,10
5	25,0009	11,20	3,10	25,0001	11,09	3,07
6	25,0107	11,09	3,07	25,0201	11,15	3,08

*В пересчете на яблочную кислоту и абсолютно сухое сырье.

Таблица 5.29

Результаты определения сходимости (статистические характеристики)

Статистические характеристики	Результаты Сотрудник А	Результаты Сотрудник Б
Наименьшее значение, %	3,06	3,07
Наибольшее значение, %	3,10	3,10
Среднее значение, %	3,08	3,08
Стандартное отклонение	0,0155	0,0121
Коэффициент вариации, %	0,0050	0,0039
F (5%; 5; 5)=5,05	Контрольное значение 0,61	
t (5%; 10)	Контрольное значение 1	

Согласно значениям таких статистических характеристик, как критерий Стьюдента и критерий Фишера, можно сделать вывод о незначимости исследуемых переменных факторов на результаты анализа.

5.3 Количественный анализ кислоты аскорбиновой в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах

Кислота аскорбиновая является основным водорастворимым витамином, содержащимся в значительных количествах во всех компонентах сборов витаминных. За счет окислительно-восстановительных свойств кислота аскорбиновая может участвовать в ферментативных процессах организма, выступая донором или акцептором протонов [206, 210]. Помимо собственной фармакологической активности, витамин С повышает биодоступность флавоноидов и способствует проявлению ими капилляроукрепляющей активности [147, 177, 214].

5.3.1 Установление содержания кислоты аскорбиновой окислительно–восстановительным титрованием

Для определения содержания кислоты аскорбиновой в плодах шиповника, рябины обыкновенной, черной смородины и витаминных сборах №1 и №2 применяли титриметрический метод, представленный в частной фармакопейной статье 38 «Плоды шиповника» ГФ XI изд., вып. 2. Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах, различными физико-химическими методами, представлены в таблице 5.30 [57, 96].

5.3.2 Установление содержания кислоты аскорбиновой йодатометрически

Так же количественное определение кислоты аскорбиновой проводили методом йодатометрии по методике, описанной в ОФС 42-0114-09 «Методы количественного определения витаминов». В основе метода лежит окисление кислоты аскорбиновой калия йодатом [59].

Результаты количественного определения представлены в таблице 5.30, и на рисунке 5.15.

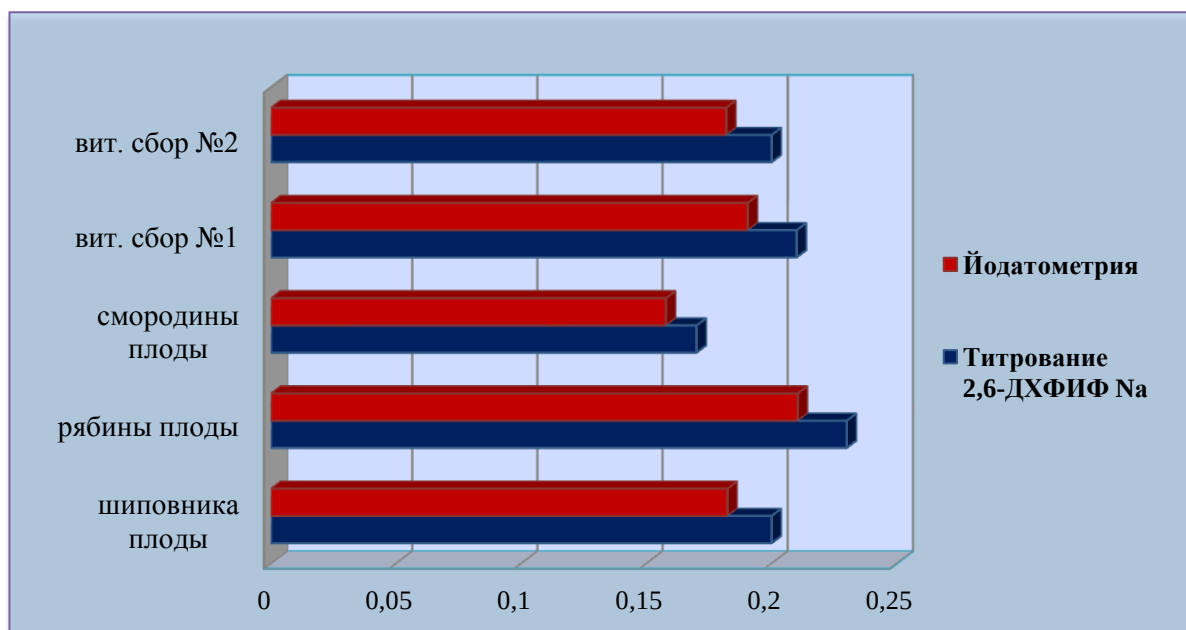


Рис.5.15. Сравнительный анализ содержания кислоты аскорбиновой в сборах витаминных №1 и №2 и отдельных компонентах различными методами индикации

Сравнительный анализ, представленных в таблице 5.30, свидетельствует о сходимости результатов, следовательно, о возможности применения методики йодатометрического титрования для анализа аскорбиновой кислоты в сборах витаминных №1 и №2 и отдельных компонентах по сравнению с фармакопейной методикой. Содержание кислоты аскорбиновой, определенное по обеим методикам, соответствует требованиям нормативной документации, предъявляемым к витаминным сборам № 1 и № 2, а также требованиям ГФ XII и XIII изданий, предъявляемым к плодам шиповника.

Однако окислительно-восстановительное титрование не обладает абсолютной селективностью относительно аскорбиновой кислоты.

5.3.3 Установление содержания кислоты аскорбиновой методом прямой спектрофотометрии

Для определения кислоты аскорбиновой проводили холодное настаивание. Затем, около 5 г сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу, приливали 50 мл 40% этанола и оставляли настаиваться

15-30 мин. Затем извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки 40% этиловым спиртом. Аликвоту 0,5 мл помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем до метки 40% спиртом этиловым. Снимают спектр поглощения в диапазоне длин волн 250-350 нм [173] на фоне 40% спирта этилового.

В качестве стандартного раствора использовали 0,03% раствор кислоты аскорбиновой. Точную навеску предварительно высушенной до постоянной массы ГСО кислоты аскорбиновой растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл. Далее проводили спектрофотометрию с внесением внешнего стандарта в анализируемый раствор.

Приготовление рабочего раствора: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл кислоты аскорбиновой 0,03%, добавляют 0,5 мл анализируемого извлечения и доводят объем до метки 40% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения служил 40% спирт этиловый.

Анализ длин волн, соответствующих максимумам поглощения кислоты аскорбиновой и извлечений из витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов, показал, что кислота аскорбиновая вносит вклад в максимумы поглощения извлечений (рис.5.16).

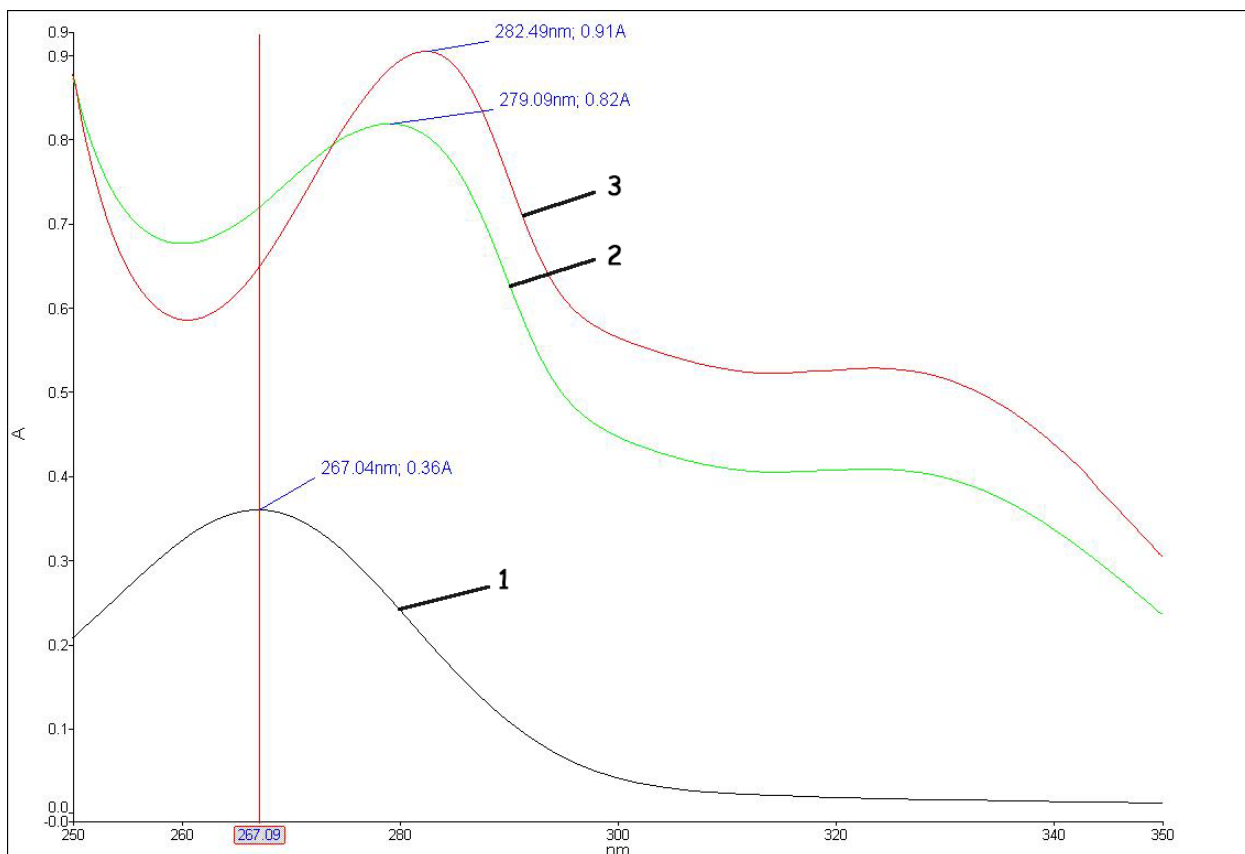


Рис.5.16. Абсорбционные спектры поглощения на примере сбора витаминного №2

1-спектр поглощения кислоты аскорбиновой; 2-спектр поглощения извлечения из витаминного сбора №2; 3-спектр поглощения извлечения с добавлением внешнего стандарта кислоты аскорбиновой

Содержание кислоты аскорбиновой рассчитывали по формуле:

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

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность раствора стандартного образца;

m_0 - масса стандартного образца, г;

V_a -объем аликвоты испытуемого раствора, мл;

m_c - масса сырья, г;

W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

Результаты анализа представлены в таблице 6.30.

5.3.4 Количественное определение кислоты аскорбиновой методом ВЭЖХ

Установление содержания кислоты аскорбиновой проводили согласно методике, описанной в параграфе 5.1.1, результаты ВЭЖХ анализа представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.30

Содержание кислоты аскорбиновой в подах шиповника, рябины и в витаминных сборах №1 и №2

n=5; p=0,95

Объекты исслед. Метод анализа	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины черной	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
Методика ГФ, %	0,20±0,01	0,23±0,01	0,30±0,01	0,26±0,01	0,20±0,01
Йодатометрия, %	0,18±0,04	0,21±0,01	0,29±0,01	0,25±0,01	0,18±0,04
ВЭЖХ, %	0,1145 ±0,0001	0,0005 ±0,0001	0,0407 ±0,00001	0,0332 ±0,0001	0,0137 ±0,000
СФМ, %	0,68±0,04	0,65±0,02	0,62±0,02	0,64±0,04	0,37±0,04

Однако метод прямой спектрофотометрии является неселективным по отношению к кислоте аскорбиновой, поскольку в данный максимум вклад вносят и другие соединения, такие как фенолоспирты. Следовательно, результаты количественного анализа завышены.

Методика ВЭЖХ дает результаты по отдельным органическим кислотам, не учитывая все соединения этой группы. Из этого следует, что метод ВЭЖХ не подходит для стандартизации ЛРС по показателю «сумма свободных органических кислот».

5.4 Количественный анализ дубильных веществ в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах

Дубильные вещества относятся к группе биологически активных соединений – представителей полифенолов. Их ценность для фармации заключается в способности образовывать связи с белками, в результате чего они и обладают вяжущим, противовоспалительным, кровоостанавливающим

и бактерицидным действиями [31, 187]. Так же они способны выпадать в осадок в результате взаимодействия с алкалоидами, сердечными гликозидами и солями тяжелых металлов, что позволяет применять их в медицине в качестве антидотов. Конденсированные дубильные вещества (катехины чая) обладают сопряженными антиоксидантными (АО) и капилляроукрепляющими свойствами. АО активность свойственна также танину [200, 201].

Для определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах в ГФ XIII изд. предложены титриметрический и спектрофотометрический методы.

Определение содержания дубильных веществ в витаминных сборах и их компонентах проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII, том 2, стр. 417 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [60, 61].

Полученные данные представлены в таблице 5.31.

Таблица 5.31

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в витаминных сборах №1 и 2 и их компонентах

n=5; p=0,95

Объект исслед.	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды черной смородины	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2	Витаминный сбор №2 (Фирма Здоровье)
X, %	3,24±0,01	2,37±0,02	1,75±0,09	3,63±0,07	4,48±0,02	5,57±0,02
Теор. значение	--	--	--	4,99	5,61	--

Полученные в ходе эксперимента результаты (табл. 5.31) свидетельствуют о возможности установления содержания суммы дубильных веществ в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах по методике ОФС.1.4.1.0018.15 ГФ XIII изд. Несмотря на простоту выполнения анализа, данный метод имеет недостатки. В процессе титрования происходит окисление всех соединений, чей окислительно-восстановительный потенциал ниже, чем у перманганата калия в данных условиях. Кроме того,

индигосульфокислота относится к рН-зависимым индикаторам, в связи с чем могут возникать неточности в анализе.

Теоретическое значение содержания дубильных веществ, рассчитанное на основании значений отдельных компонентов, для витаминных сборов №1 и №2 значительно отличается от полученных в ходе эксперимента при титриметрии извлечений с различным уровнем кислотности (табл.5.31).

5.5 Качественный и количественный анализ содержания флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах

Благоприятное влияние препаратов шиповника, смородины черной и рябины обыкновенной на проницаемость сосудов связано с содержанием флавоноидов: рутина, кверцетина, мирицетина, изорамнетина, кемпферола, катехинов, лейкоцианов [18, 180, 209, 210]. Этой группой БАВ обусловлено также желчегонное, диуретическое, противовоспалительное действие [190].

В связи с тем, что флавоноиды представляют гидрофильную фракцию витаминных сборов №1 и №2, они обуславливают ряд фармакологических свойств изучаемых объектов и препаратов на их основе. Следовательно, целесообразным является разработка методики количественного определения этих БАВ.

Анализ флавоноидов проводили методом ВЭЖХ и методом дифференциальной спектрофотометрии, согласно методу, описанному в ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях [39].

5.5.1 Анализ флавоноидов методом ВЭЖХ

Установление количественного содержания флавоноидов в витаминных сборах №1, №2 и компонентах проводили на системе ультраэффективной жидкостной хроматографии “Ultimate 3000”, оснащенной дегазатором, трехканальным насосом, термостатом колонок, термостатируемым автосамплером, диодно-матричным детектором и

тройным квардупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo TSQ Endura.

Пробоподготовку образца осуществляли по следующей методике.

Точную навеску измельченного образца массой около 5,0 г помещали в колбу на 100 мл, добавляли 75 мл 70% этанола, пробу интенсивно встряхивали и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. Экстракт охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки 70% этанолом. 2 мл экстракта помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 4500 об/мин. Надосадочную жидкость (полученный очищенный этанольный экстракт) помещали в вials для хроматографирования.

Условия хроматографического разделения.

Условия ВЭЖХ: неподвижная фаза – колонка ProteCol C18 H125 250×4.6 мм ID 5 μм 120A, подвижная фаза А – 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде, В – 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле; расход элюэнта 0.5 мл/мин; градиентное элюирование 0-10 мин 15-30% В, 10-20 мин 30-45% В, 20-30 мин 45-60% В, 30-35 мин 60-70% В, 35-38 мин 70% В, 38-40 мин 70-15% В, 40-50 мин 15% В; температура колонки 25 °С, температура автосамплера 20 °С, диодно-матричное детектирование при $\lambda=370$ нм, $\lambda=350$ нм, $\lambda=338$ нм $\lambda=290$ нм; спектры снимали в диапазоне от 190 до 700 нм.

Условия МС: ионизация нагреваемым электроспреем в режиме регистрации отрицательных ионов HESI/MS- в диапазоне m/z от 150 до 1000 Да, скорость сканирования 1000 Да/с, разрешение квадруполь Q1 0.7; рабочие параметры источника ионизации: напряжение на капилляре 2500 В, поток газа-осушителя (азот) 50 произвольных единиц (Arbitrary units), поток вспомогательного газа 15 произвольных единиц, поток продувочного газа 2 произвольные единицы, температура трубки переноса ионов 350 °С, температура испарителя 400 °С.

Содержание индивидуальных флавоноидов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где S – площадь пика флавоноида на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – площадь пика флавоноида на хроматограмме раствора СО;

m₀ – навеска СО флавоноида, г;

m – масса навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

В качестве стандартных образцов использовались коммерчески доступные индивидуальные вещества: рутин (≥94%, Sigma), гиперозид (≥95%, HWI ANALYTIK GMBH), изокверцитрин (≥94%, HWI ANALYTIK GMBH), авикулярин (ChromaDex), кемпферол-3-глюкозид (≥95%, PhytoLab), мирицетин (appr. 85%, Sigma), кверцетин (≥98%, Sigma), кемпферол (≥99%, Extrasynthese), изорамнетин (≥99%, Fluka).

Результаты хроматографирования представлены на рисунках 4.13 и 4.14 и в таблице 5.32.

Таблица 5.32

Количественное содержание суммы флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах (ВЭЖХ-УФ-МС)

n=5; p=0,95

Объект исследования	Содержание флавоноидов	
	мг/г	%
Плоды шиповника	0,905	0,0905
Плоды рябины обыкновенной	0,538	0,0538
Плоды смородины черной	0,552	0,0552
Витаминный сбор №1	0,726	0,0726
Витаминный сбор №2	0,535	0,0535

Наибольшее содержание суммы флавоноидов в плодах шиповника и витаминном сборе №1.

5.5.2 Анализ флавоноидов методом спектрофотометрии

При разработке методики учитывали такие факторы, как выбор экстрагента – водно-спиртового раствора с различной концентрацией спирта этилового и значение pH при проведении реакции флавоноидов с алюминия хлоридом [63].

Извлечения получали водно-спиртовыми растворами с концентрацией спирта 95, 70 % и настойки с концентрацией этанола 40%.

Методика. Измельченное сырье массой около 2 г (точная навеска) помещали в термостойкую колбу со шлифом, приливали 50 мл 95% спирта этилового и нагревали с обратным холодильником на плитке в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждали до комнатной температуры, фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки (раствор А). Аликвоту раствора А, равную 10 мл, переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 30% уксусной кислоты и 8 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этаноле. Объем доводили 95% этанолом до метки. В качестве раствора сравнения использовали раствор состоящий из 10 мл раствора А, 5 мл 30% уксусной кислоты, доведенных до метки в мерной колбе 95% этанолом. Через 40 минут снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 250 – 600 нм на фоне раствора сравнения.

Идентификация флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах

При определении суммы флавоноидов сначала снимали обзорный спектр извлечения на фоне экстрагента без добавления комплексообразователя (хлорида алюминия), затем с его добавлением [63]. При анализе обзорных спектров поглощения извлечения из плодов шиповника, смородины черной, рябины обыкновенной и витаминных сборов №1 и №2 в диапазоне длин волн 250-600 нм (рис.5.17) на абсорбционных спектрах наблюдались максимумы поглощения при длинах волн, характерных для фенольных соединений. Отсутствие батохромного сдвига на

спектре извлечений с добавлением алюминия хлорида свидетельствует о том, что содержание соединений флавоноидной природы невелико.

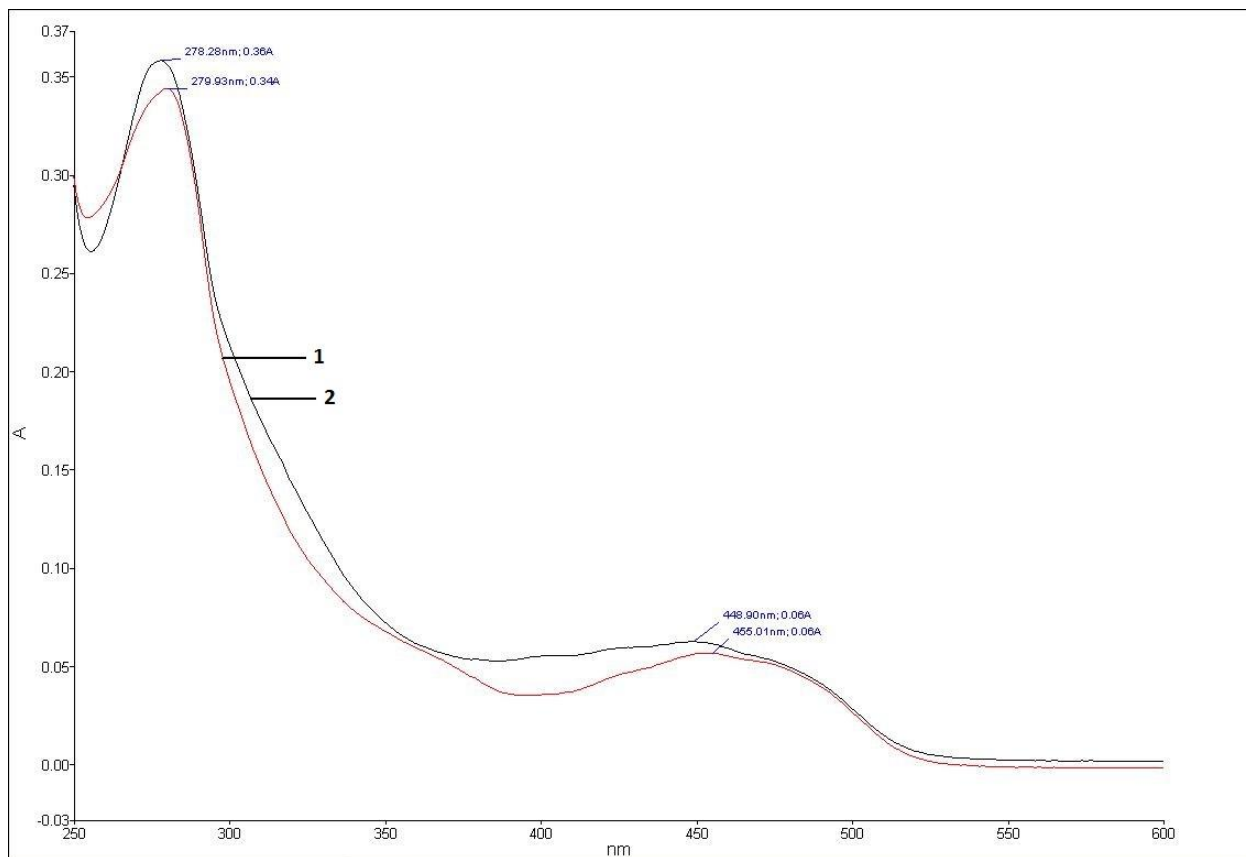


Рис.5.17. Обзорные спектры поглощения на примере плодов шиповника
1-спектр поглощения извлечения шиповника на фоне этанола,
2-спектр поглощения извлечения в присутствии алюминия хлорида на фоне этанола

В результате эксперимента было также установлено, что значение рН имеет важное значение для проведения реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом. При правильном подборе концентрации кислоты возможно повышение селективности реакции по кето-группе кольца С и гидроксильной группе кольца А, без участия соседних гидроксильных групп кольца В и мешающего влияния сопутствующих соединений, таких как простые фенолы, гидроксикоричные кислоты и фенолокислоты.

Было изучено влияние рН на спектральные характеристики для отдельных компонентов сборов. Для этого снимали абсорбционные спектры: 1) без подкисления, 2) с добавлением 30% уксусной кислоты, 3) с добавлением ацетатного буферного раствора. Полученные значения рН и

спектральные характеристики дифференциальных спектров представлены в табл. 5.33 и на рис. 5.18.

Таблица 5.33

Спектральные характеристики дифференциальных спектров фенольных соединений плодов рябины, шиповника и смородины в зависимости от условий эксперимента

Объект исследования	Спектральные характеристики при различных pH		
Извлечение из плодов смородины	pH=2,59 (без подкисления)	pH=2,25 (подкисление CH_3COOH)	pH=5,05 (ацетатный буфер)
	$\lambda_{\text{max1}}=421$; A=0,19 $\lambda_{\text{max2}}=302$; A=0,16	$\lambda_{\text{max1}}=413$; A=0,26 $\lambda_{\text{max2}}=298$; A=0,36	$\lambda_{\text{max1}}=421$; A=0,16 $\lambda_{\text{max2}}=316$; A=0,05
Извлечение из плодов рябины	pH=2,63 (без подкисления)	pH=2,23 (подкисление CH_3COOH)	pH=5,19 (ацетатный буфер)
	$\lambda_{\text{max1}}=407$; A=0,11 $\lambda_{\text{max2}}=354$; A=0,30	$\lambda_{\text{max1}}=409$; A=0,24 $\lambda_{\text{max2}}=357$; A=0,16	$\lambda_{\text{max1}}=371$; A=0,68 $\lambda_{\text{max2}}=305$; A=0,20
Извлечение из плодов шиповника	pH=2,60 (без подкисления)	pH=1,56 (подкисление CH_3COOH)	pH=5,17 (ацетатный буфер)
	$\lambda_{\text{max1}}=402$; A=0,18 $\lambda_{\text{max2}}=313$; A=0,23	$\lambda_{\text{max1}}=404$; A=0,30 $\lambda_{\text{max2}}=328$; A=0,18	$\lambda_{\text{max1}}=398$; A=0,53 $\lambda_{\text{max2}}=307$; A=0,16

Примечание: указаны только максимумы поглощения комплекса флавоноидов и ближайший к нему соединений.

Анализ данных табл. 5.33 и рис. 5.18 позволяет предположить, что при увеличении значения pH путем добавления ацетатного буфера в длинноволновый максимум поглощения вносит вклад комплекс флавоноидов с алюминия хлоридом, образующийся по кольцу Б, а также комплекс схожих по строению фенольных соединений с алюминия хлоридом. При добавлении кислоты максимум поглощения, ближайший к максимуму комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом (рис. 5.19), со временем падает, в то время как флавоноидный – растет (в таблице 5.33 представлены значения оптической плотности через 40 мин после начала реакции). Это позволяет сделать вывод, что методика анализа флавоноидов в компонентах витаминных сборов с добавлением кислоты оптимальна.

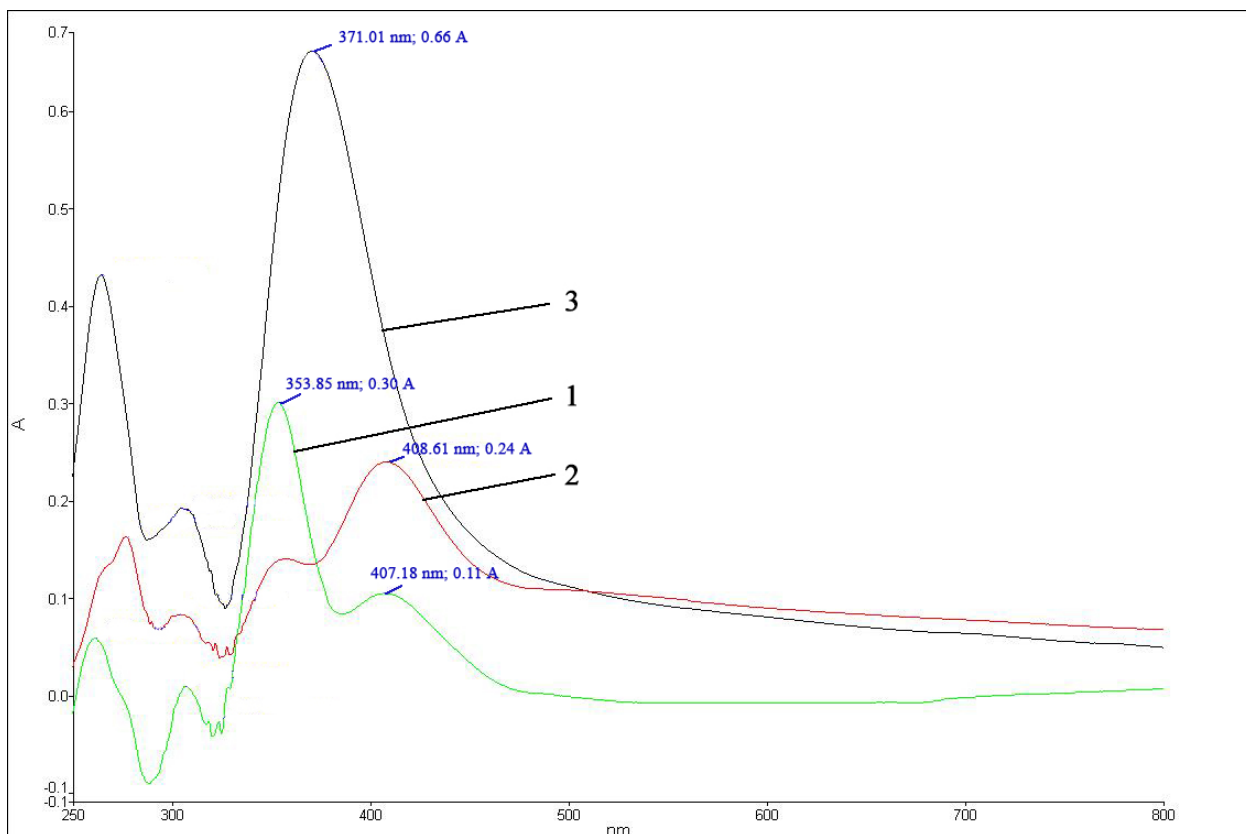


Рис.5.18. Дифференциальные спектры поглощения на примере плодов рябины обыкновенной

1-спектр поглощения извлечения рябины без подкисления (pH 2,63),

2-спектр поглощения извлечения с добавлением 30% уксусной кислоты (pH 2,23),

3-спектр поглощения извлечения с добавлением ацетатного буфера (5,19)

Подлинность субстанций. Также был разработан метод [155] решающий сразу две задачи – возможность одновременного количественного определения флавоноидов в плодах шиповника и в сборе витаминном №1 и доказательства подлинности этих лекарственных субстанций по присутствию сразу трех максимумов поглощения на абсорбционном спектре в сумме, как показано на рис. 5.20 и 5.21.

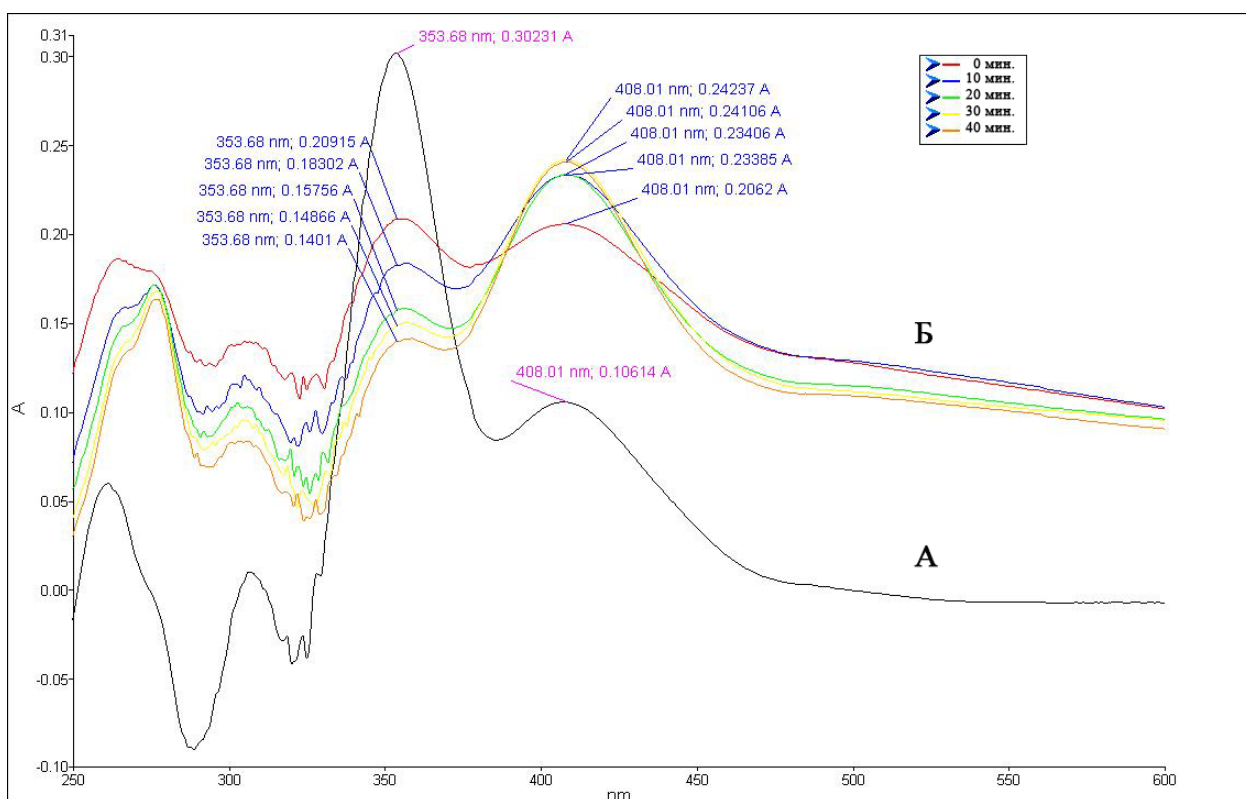


Рис.5.19. Кинетика образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом на примере плодов рябины обыкновенной
 А - спектр поглощения извлечения рябины без подкисления (рН 2,63),
 Б - спектр поглощения извлечения с добавлением 30% уксусной кислоты (рН 2,23),

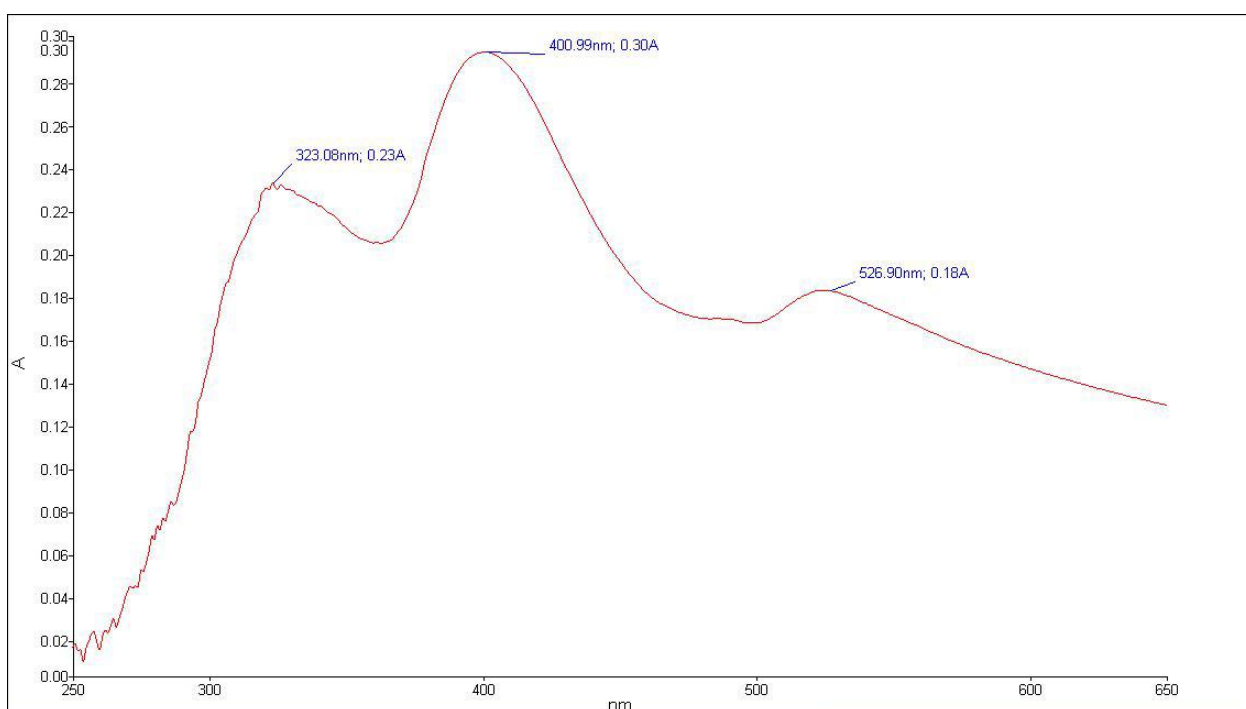


Рис.5.20. Абсорбционный дифференциальный спектр поглощения флавоноидов плодов шиповника с хлоридом алюминия

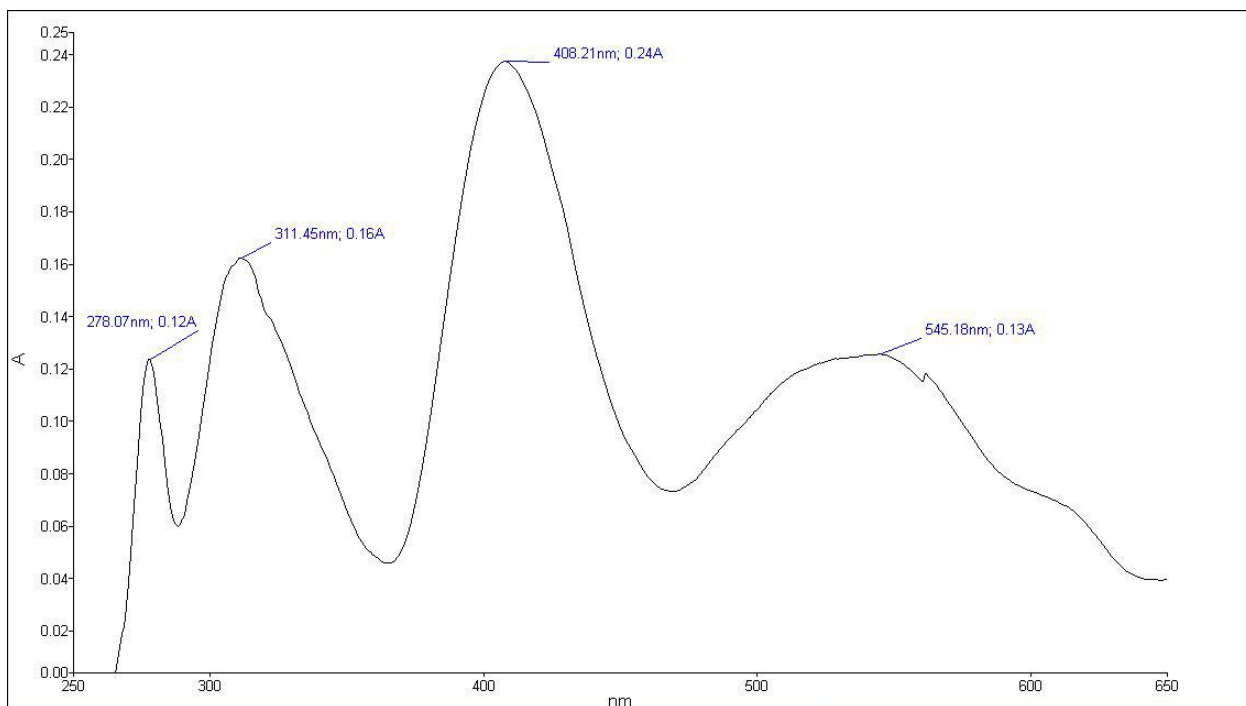


Рис.5.21. Абсорбционный дифференциальный спектр поглощения флавоноидов витаминного сбора №1 с хлоридом алюминия

Методика. Около 2 г сырья (точная навеска) помещают в термостойкую колбу со шлифом, заливают 50 мл спирта этилового концентрацией 95%, присоединяют к обратному холодильнику и кипятят на плитке с закрытой спиралью в течение 30 мин (раствор А). Аликвоту раствора А, равную 8 мл, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 5 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 %, 8 мл спиртового раствора алюминия хлорида с концентрацией 2% и доводят объем до метки 95% спиртом этиловым (раствор Б). Снимают спектр поглощения в диапазоне длин волн 250-650 нм на фоне раствора сравнения в течение 10-50 мин от начала реакции. Реакция среды раствора при таком соотношении компонентов составляет $pH = 1,6 \pm 0,4$.

Приготовление раствора сравнения: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 8 мл раствора А, добавляют 5 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 % и доводят объем до метки 95% спиртом этиловым.

На спектре поглощения раствора Б для плодов шиповника на фоне раствора сравнения обнаруживаются 3 максимума поглощения: при 323 нм, предположительно соответствующих фенолкарбоновым кислотам; при 404

нм, предположительно – флавоноидам; при 526 нм, предположительно – антоцианам (рис.5.20). На спектре поглощения раствора Б для витаминного сбора №1 на фоне раствора сравнения обнаруживаются 3 максимума: при 311 нм, предположительно соответствующих фенолкарбоновым кислотам, при 411 нм, предположительно – флавоноидам, при 540 нм, предположительно – антоцианам (рис.5.21).

Количественное определение флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах методом спектрофотометрии

Анализ флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии, согласно методу, описанному в ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях.

Исходя из данных представленных ранее в табл. 5.33 и на рис. 5.18 и учитывая, что максимум поглощения комплекса флавоноидов растет при создании более кислой реакции среды, нами были разработаны методики количественного определения для витаминных сборов №1 и №2 и плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной [63].

Извлечение готовили согласно методики, описанной в параграфе 5.5.2.

Анализ содержания флавоноидов проводили на спектрофотометре «Lambda-950» Perkin Elmer, США.

Количественное определение флавоноидов в плодах шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной методом спектрофотометрии

Методика. Аликвоту раствора А, равную 8 мл помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 5 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 %, 8 мл спиртового раствора алюминия хлорида с концентрацией 2% и доводят объем до метки 95% спиртом этиловым. Через 40 мин снимают спектр поглощения в диапазоне длин волн 250-650 нм на фоне раствора сравнения. Параллельно измеряют оптическую плотность комплексов рутина с алюминия хлоридом.

Приготовление раствора сравнения: в мерную колбу вместимостью 25

мл помещают 8 мл раствора А, добавляют 5 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 % и доводят объем до метки 95% спиртом этиловым.

Анализ длин волн, соответствующих максимумам поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом и комплексов стандартных образцов флавоноидов с алюминия хлоридом, а также результаты ВЭЖХ-анализа, позволяют проводить пересчет суммы флавоноидов в плодах шиповника, рябины обыкновенной и в плодах смородины черной (рис. 5.20, 5.22 и 5.23).

Получение комплексов стандартного образца рутина с алюминия хлоридом. Около 0,05 г (точная навеска) предварительно высушенного до постоянной массы ГСО рутина растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл в 95% спирте этиловым (раствор Б). Аликвоту раствора Б, равную 1 мл, помещали в мерную колбу объемом 25 мл, добавляли 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной 30% и довели до метки 96% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали 1 мл раствора Б и 0,5 мл кислоты уксусной 30%, которые разбавляли 96% спиртом этиловым в мерной колбе вместимостью 25 мл.

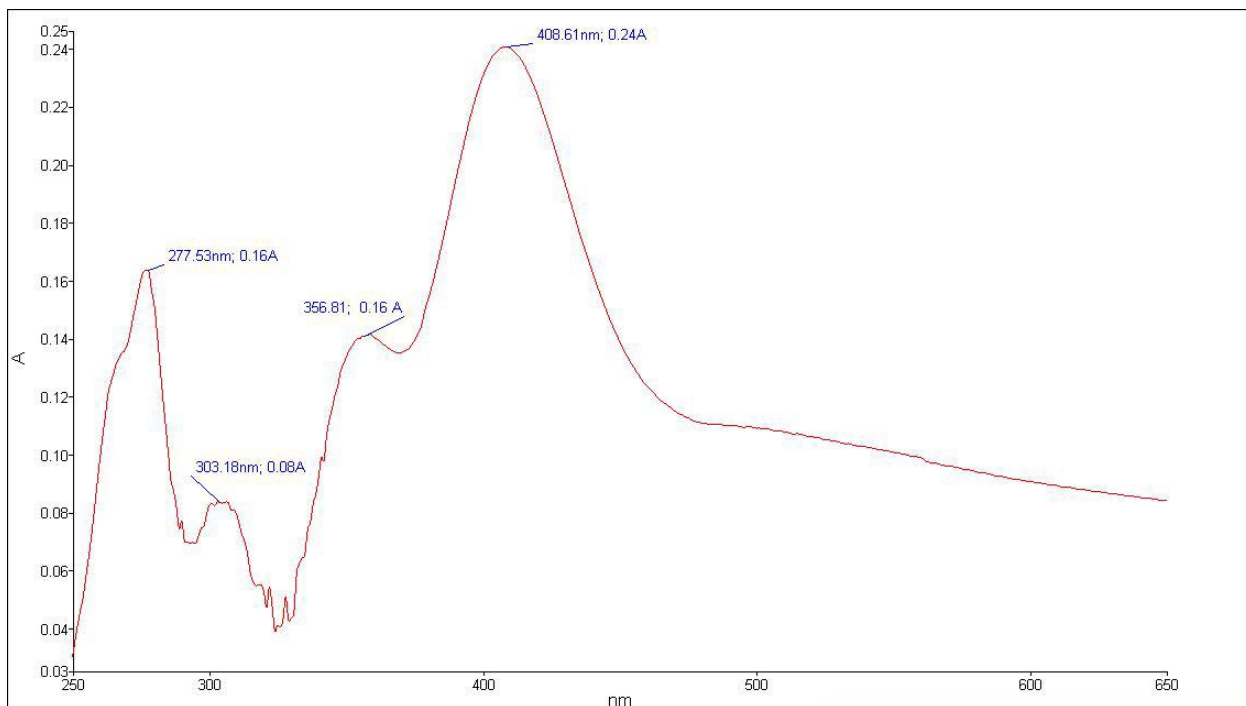


Рис.5.22. Абсорбционный дифференциальный спектр поглощения флавоноидов плодов рябины обыкновенной с хлоридом алюминия

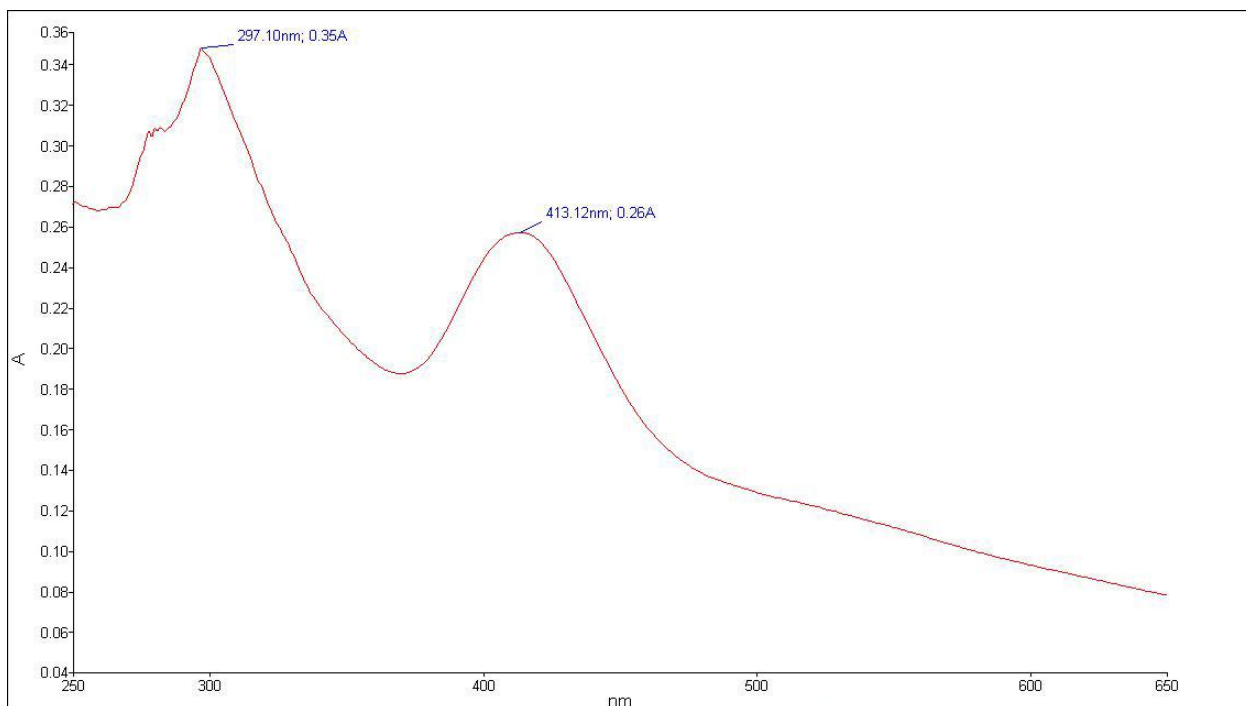


Рис.5.23. Абсорбционный дифференциальный спектр поглощения флавоноидов плодов смородины черной с хлоридом алюминия

Анализ абсорбционных спектров (рис. 5.20, 5.22 и 5.23) выявил наличие максимума поглощения при длинах волн 401, 409 и 413 нм для комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом плодов шиповника, плодов рябины и плодов смородины черной соответственно. Т.к. интервал между максимумами дифференциальной кривой и длинноволновой полосой стандартного образца рутина с алюминия хлоридом не превышает полуширины поглощения раствора комплекса стандартного образца (СО), то погрешность при анализе будет значительной. Кроме того возможность применения рутина в качестве СО обусловлена его присутствием во всех объектах исследования, что подтверждается результатами ВЭЖХ-МС (табл. 5.2).

Содержание флавоноидов рассчитывали по формуле:

$$X(\%) = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot V_a \cdot m_c \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

Где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность раствора стандартного образца;

m_0 - масса стандартного образца, г;

V_a -объем аликвоты испытуемого раствора, мл;

m_c - масса сырья, г;

W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

Данные по содержанию флавоноидов в компонентах витаминных сборов представлены в табл.5.34.

Таблица 5.34

Содержание флавоноидов в компонентах витаминных сборов в пересчете на абсолютно сухое сырье

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

Объект исследования	Содержание флавоноидов, %	Стандартный образец
Плоды рябины	$0,093 \pm 0,002$	Рутин
Плоды черной смородины	$0,102 \pm 0,004$	Рутин
Плоды шиповника	$0,115 \pm 0,001$	Рутин

Определение содержания флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 методом спектрофотометрии

Методика. Аликвоту раствора А, равную 10 мл, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 8 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 %, 8 мл спиртового раствора алюминия хлорида с концентрацией 2% и доводят объем до метки 95% спиртом этиловым. Через 40 мин снимают спектр поглощения в диапазоне длин волн 370-470 нм на фоне раствора сравнения. Параллельно измеряют оптическую плотность комплекса рутина с алюминия хлоридом.

Приготовление раствора сравнения: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 10 мл раствора А, добавляют 8 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 % и доводят объем до метки 95% спиртом этиловым.

Содержание флавоноидов рассчитывали по формуле:

$$X(\%) = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot V_a \cdot m_c \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

Где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность раствора стандартного образца;

m_0 - масса стандартного образца, г;

V_a -объем аликвоты испытуемого раствора, мл;

m_c - масса сырья, г;

W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

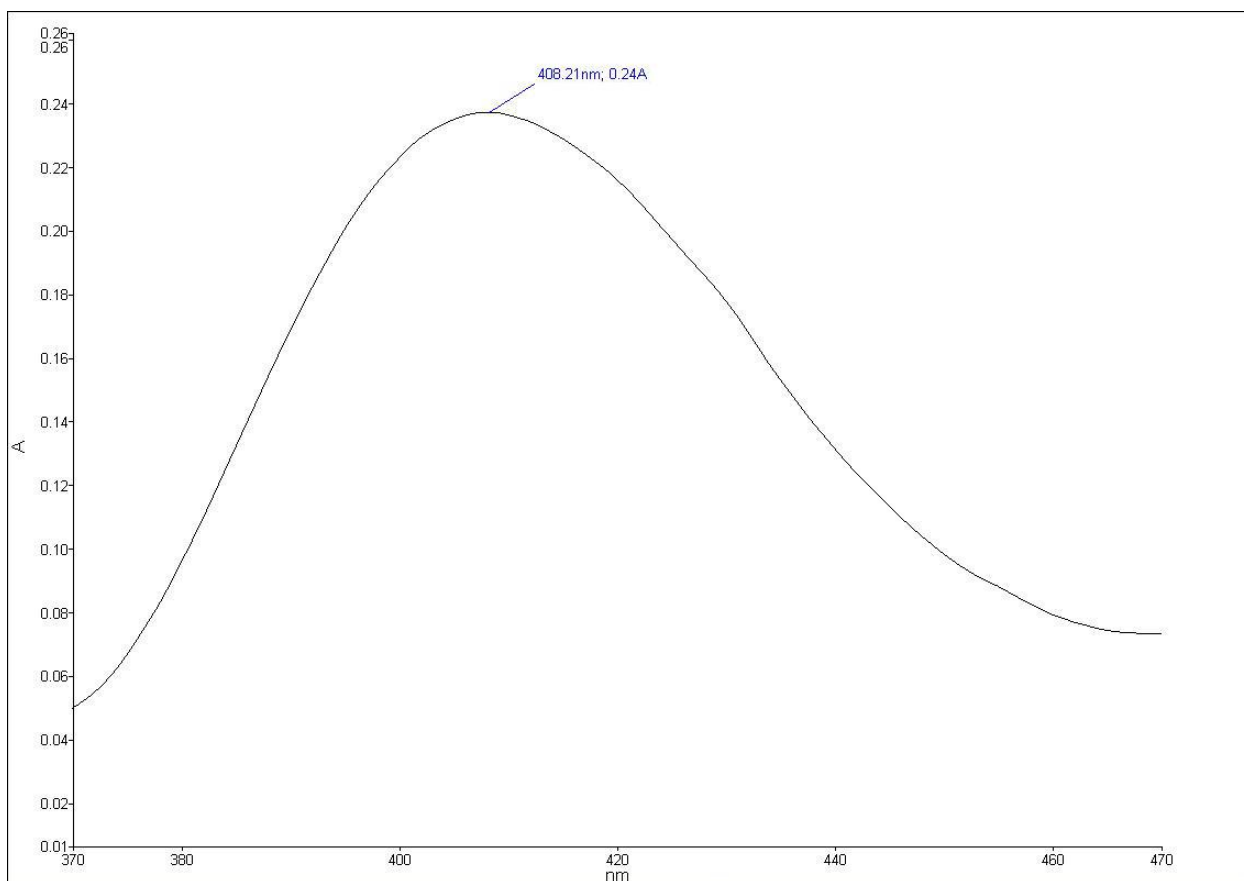


Рис.5.24. Абсорбционный дифференциальный спектр поглощения флавоноидов витаминного сбора №1 с хлоридом алюминия

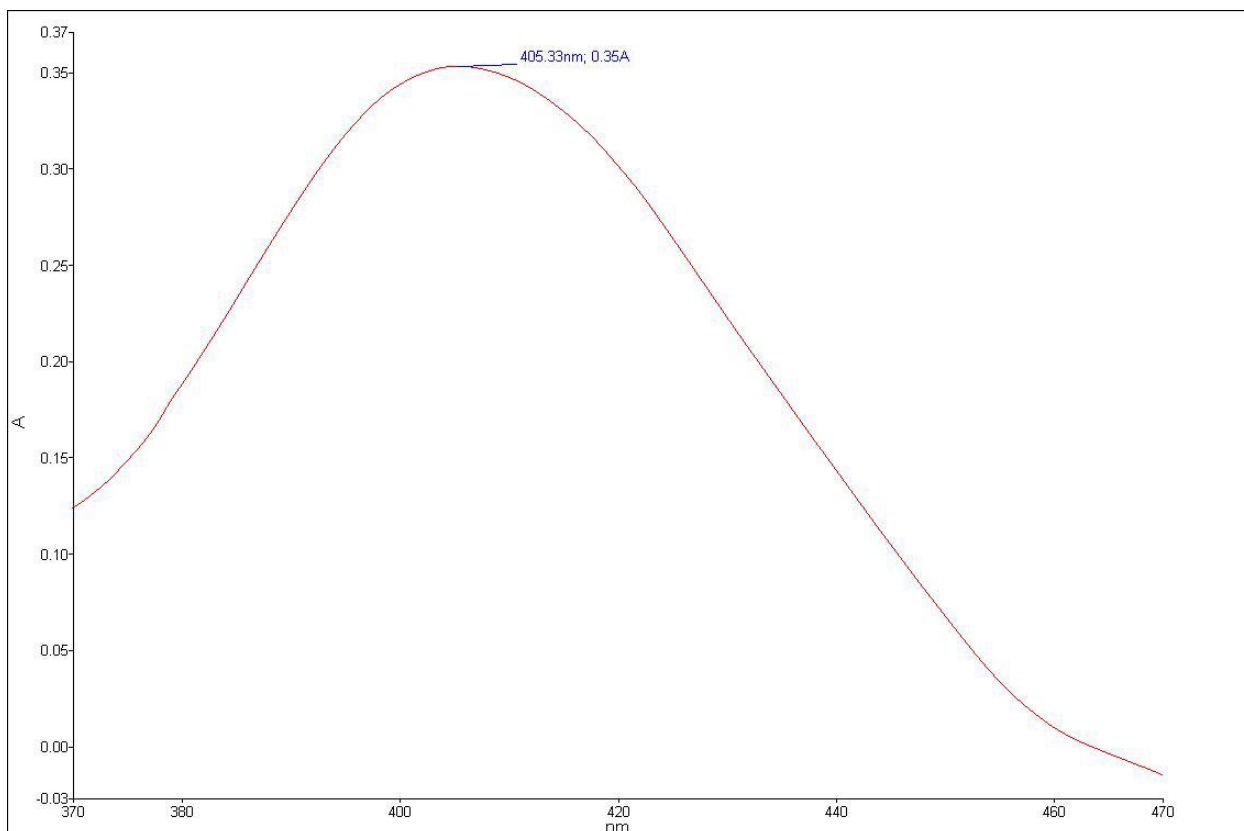


Рис.5.25. Абсорбционный дифференциальный спектр поглощения флавоноидов витаминного сбора №2 с хлоридом алюминия

Длины волн, соответствующие максимумам поглощения комплексов флавоноидов в витаминном сборе №1 и №2 и представленные на абсорбционных спектрах на рис. 5.24 и 5.25 и результаты ВЭЖХ-анализа, позволяют делать расчет суммы флавоноидов в сборах, в пересчете на рутин. Полученные данные представлены в табл. 5.35.

Таблица 5.35

Содержание флавоноидов в витаминных сборах в пересчете на абсолютно сухое сырье

n=5; p=0,95

Объект исследования	Содержание флавоноидов, %	Стандартный образец
Витаминный сбор №1	0,074±0,001	Рутин
Витаминный сбор №2	0,108±0,001	Рутин

В результате эксперимента [60] было показано влияние pH на характер дифференциальных спектров поглощения флавоноидов витаминных сборов и их компонентов, и выявлено, что оптимальным значением pH является 1,5-2,3.

Содержание флавоноидов оказалось невелико, как для отдельных компонентов, так и для сборов. Наибольшее количество флавоноидов обнаружено в плодах черной смородины - $0,163 \pm 0,004$. Однако проведенные исследования показали возможность установления подлинности изучаемых объектов с применением ВЭЖХ и СФМ анализа.

Таблица 5.36

Сводная таблица содержания флавоноидов в витаминных сборах в пересчете на абсолютно сухое сырье

n=5; p=0,95

Объект исследования	Содержание флавоноидов, %	
	<i>Спектрофотометрия</i>	<i>ВЭЖХ-УФ-МС</i>
Витаминный сбор №1	$0,074 \pm 0,001$	0,0726
Витаминный сбор №2	$0,108 \pm 0,001$	0,0535
Плоды рябины	$0,093 \pm 0,002$	0,0538
Плоды черной смородины	$0,102 \pm 0,004$	0,0552
Плоды шиповника	$0,115 \pm 0,001$	0,0905

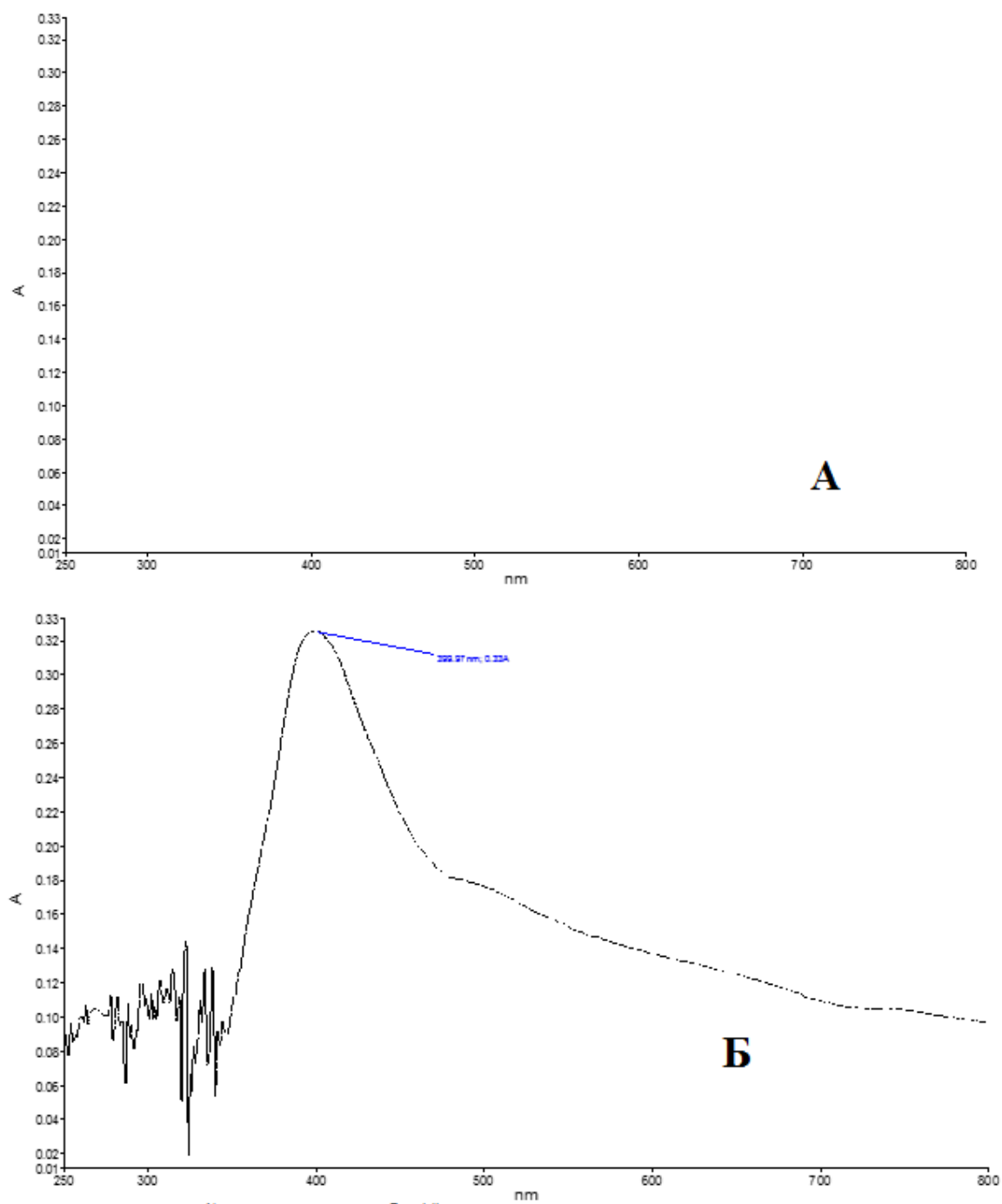
Расхождения в содержании суммы флавоноидов (табл. 5.36), установленном методом СФМ и ВЭЖХ-МС могут быть связаны с тем, что, несмотря на большую чувствительность ВЭЖХ-анализа, этот метод не позволяет определить сразу все флавоноиды, используя одну методику пробоподготовки. Также требуются СО для каждого флавоноида, а их количество ограничено.

Валидация методики спектрофотометрического определения содержания флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2, их компонентах

Поскольку флавоноиды представляют собой группу БАВ, оказывающих влияние на проницаемость сосудов, и результаты по определению содержания хорошо воспроизводятся, было решено провести валидацию разработанной методики на примере витаминного сбора №2 по таким критериям, как специфичность, линейность, правильность, прецизионность (как сходимость) и робастность, чтобы показать

возможность применения данной методики при установлении содержания флавоноидов.

На рисунке 5.26 изображены спектры исследуемого образца и СО рутина. Спектры получены на спектрофотометре Lambda 950. Исследуя графики, можно сделать вывод, что критерий доказан.



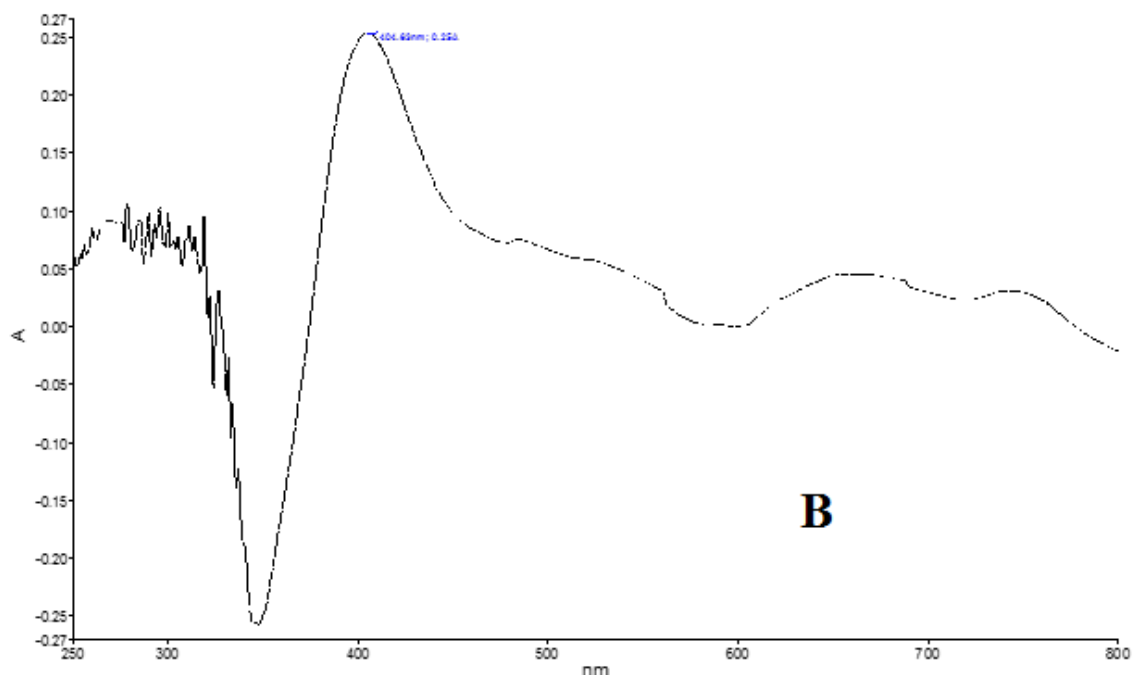


Рис. 5.26. Спектры исследуемого образца:
а – исследуемый образец отсутствует; б – стандартный образец раствора
кверцетина ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ г/мл); в – исследуемый образец

Опираясь на пункт 1.2 раздела 1 ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи XIII, можно сделать вывод, что критерий доказан (результаты спектрофотометрии не искажены).

1. Линейность: данный критерий считается доказанным, если можно выявить линейную зависимость уровня концентрации флавоноидов и уровня концентрации витаминного сбора №2.

Для данного критерия необходимо получить дифференциальные спектры при 80, 90, 100, 110, 120 и 130 % уровнях концентрации флавоноидов в витаминном сборе №2. Для этого в рабочую кювету отбирали X_1 мл раствора исследуемого образца (для уровня концентрации 110 и выше – добавляли X_2 мл раствора кверцетина), переносили в мерную колбу на 25 мл, добавляли 8 мл 2% спиртового раствора хлорида алюминия, 5 мл 3% ледяной уксусной кислоты и доводили до метки 96% этиловым спиртом. В кювете сравнения был аналогичный раствор при отсутствии 2% спиртового

раствора хлорида алюминия. Кверцетин добавляли в модельные смеси в виду коммерческой доступности, а также содержания в флавоноидной фракции витаминного сбора.

В таблице 5.37 приведены значения объема использованных растворов для приготовления того или иного уровня концентрации исследуемого образца.

Таблица 5.37

Объем растворов для приготовления того или иного уровня концентрации грудного сбора №2

Уровень С, %	V извлечения, мл (X1)	V кверцетина, мл (X2)
80	8	–
90	9	–
100	10	–
110	10	0,32
120	10	0,64
130	10	0,96

Полученные результаты длин волн (таблица 5.38, столбец 2) и оптической плотности (таблица 5.38, столбец 3) позволяет рассчитать $C_{\text{практ}}$ и $C_{\text{ср}}$, а также построить график зависимости оптической плотности от уровня концентрации флавоноидов в исследуемом образце (рисунок 5.26).

Таблица 5.38

Полученные результаты

Уровень С, %	λ , нм	A	A	$C_{\text{практ}}, 10^{-5}$ г/мл	$C_{\text{теор}}, 10^{-5}$ г/мл	$C_{\text{ср}}, 10^{-5}$ г/мл	Отклик, %
80	404,8	0,088	0,069	0,125	0,483	0,098	-
80	404,8	0,049		0,070			-
90	403,47	0,3826	0,382	0,543	0,566	0,542	104,23
90	402,8	0,3823		0,542			104,31
100	405,9	0,4458	0,443	0,632	0,629	0,629	99,39
100	405,7	0,4404		0,625			100,61
110	406,4	0,4863	0,482	0,690	0,691	0,684	100,23
110	410,2	0,4785		0,679			101,86
120	412,2	0,5494	0,546	0,779	0,754	0,775	96,78
120	410,2	0,5435		0,771			97,83
130	413,3	0,5993	0,598	0,850	0,817	0,848	96,12
130	412,4	0,5964		0,846			96,58

Данные для уровня концентрации 80% не учитываем в ходе расчётов, т.к. полученные данные не корректны.

Статистически критерий доказывается выводом уравнения прямой, определением угла её наклона, отрезка на оси ординат, коэффициентом корреляции и 95% доверительным интервалом от среднего значения (таблица 5.39).

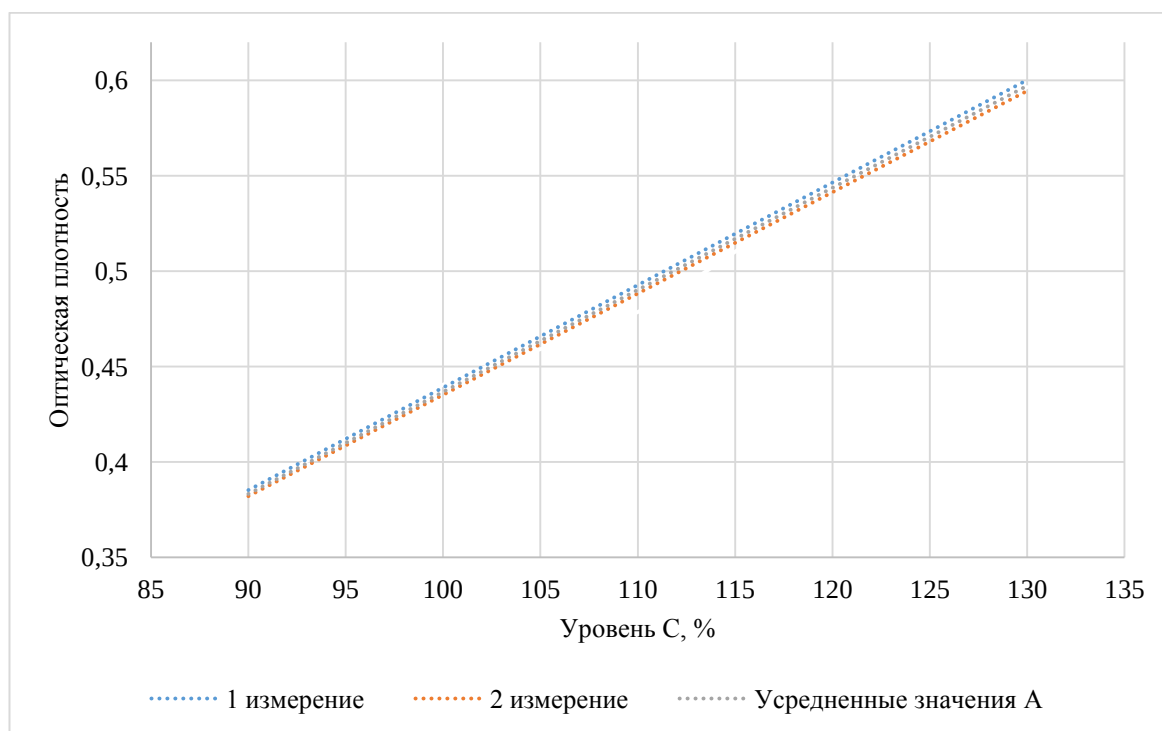


Рис.5.27. Графическое представление линейности методики спектрофотометрического определения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин

Таблица 5.39

Статистические характеристики графика зависимости оптической плотности от уровня концентрации флавоноидов в исследуемом образце

Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение	0,4902
Уравнение прямой	$y=0,0054x-0,0983$
Наклон а	0,0054
Отрезок на оси ординат b	0,0983
95% доверительный интервал	от 0,3919 до 0,5885
Коэффициент корреляции r	0,996

Исследуя рисунок 5.27 и таблицу 5.39 и опираясь на раздел 5 ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной

фармакопеи XIII, можно сделать вывод, что критерий доказан (линейная зависимость, отвечающая условию $|r| \geq 0,99$).

2. Правильность: данный критерий доказывается путем определения отклика по методу добавок. В нашем случае добавкой является спиртовой раствор кверцетина. Для определения правильности методики было проведено 10 испытаний с 5 различными уровнями концентраций флавоноидов в исследуемом образце (таблица 5.38, столбец 7). Значения отклика были рассчитаны формуле:

$$\text{Отклик} = \frac{\text{Стеор}}{\text{Спракт}} * 100\%$$

Статистически критерий доказывается средним значением отклонения, стандартным отклонением (SD), коэффициентом вариации (CV, %) и 95% доверительного интервала (ДИ) среднего значения (таблица 5.40).

Таблица 5.40

Статистические характеристики для критерия «правильность»

Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение	99,80
SD	3,021
CV, %	3,027
Нижняя граница ДИ	96,12
Верхняя граница ДИ	104,31

Согласно разделу 6 ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи XIII, можно сделать вывод, что критерий доказан ($CV \leq 4\%$).

3. Прецизионность (как сходимость): данный критерий должен показать, что методика анализа при проведении в одинаковых условиях (идентичные реактивы, тот же лаборант, в этот же день, то же оборудование) обеспечивает получение сравнимых результатов. Оценка и расчет результатов производится путем вычисления наименьшего, наибольшего и

среднего значений, стандартного отклонения (SD), коэффициента вариации (CV, %) и 95% доверительного интервала (ДИ).

Для определения правильности методики было проведено 6 испытаний с одинаковым уровнем концентрации флавоноидов в исследуемом образце (100%). Данные представлены в таблице 5.41.

Таблица 5.41

Полученные результаты для критерия «Прецизионность»

Обозначение в анализе	Оптическая плотность (A)
Проба 1	0,426
Проба 2	0,433
Проба 3	0,421
Проба 4	0,436
Проба 5	0,419
Проба 6	0,425
Наименьшее значение	0,419
Наибольшее значение	0,436
Среднее значение	0,427
SD	0,007
CV, %	1,579
ДИ	0,419 - 0,436

Исследуя полученные статистические характеристики и пункт 7.1 раздела 7 ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи XIII можно сделать вывод, что критерий доказан (данные со всех проб входят в границы доверительного интервала).

В ходе эксперимента была валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в витаминном сборе №2 (в пересчете на кверцетин), были доказаны все критерии приемлемости методики (специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость)). Следовательно, данная методика может применяться для количественного определения суммы флавоноидов в витаминных сборах.

5.5.3 Количественный анализ каротиноидов в плодах шиповника, рябины обыкновенной, смородины черной и в витаминных сборах №1 и №2

Ответственными за окраску растений являются пигменты такие как каротиноиды, хлорофилл и антоцианы. Особую роль занимают каротиноиды, поскольку являются предшественниками ретинола (витамина А). Ретинол участвует в окислительно-восстановительных процессах, регуляции синтеза белков, способствует нормальному обмену веществ, функции клеточных и субклеточных мембран, необходим для поддержания и восстановления эпителиальных тканей, из которых состоят кожа и слизистые покровы [38, 121]. Каротиноиды в растениях участвуют в процессе фотосинтеза, как переносчики активного кислорода. Данная группа БАВ участвует в функционировании различных защитных механизмов, оказывая мембраностабилизирующее, антиоксидантное, иммуностимулирующее действие, обеспечивая защиту от ультрафиолетового излучения [180, 186, 211]. Кроме того, каротиноиды увеличивают цитостатическую активность клеток-киллеров, замедляют рост опухоли и ускоряют ранозаживление [214]. Каротиноиды не синтезируются организмом, поэтому людям необходимо получать их с употреблением пищи. Синтетические ЛП плохо усвояемы и могут вызывать побочные эффекты, чего лишены природные источники витаминов группы А. Такими источниками могут служить такие лекарственные средства как витаминный сбор №1 и №2. Поэтому и возникает необходимость количественного определения [161] каротиноидов в данных объектах.

Установление содержания каротиноидов методом спектрофотометрии

Каротиноиды имеют структуру полиенов, которая обуславливает поглощение ими электромагнитного излучения в видимой области от 400 до 500 нм, что придает им окраску желтую, оранжевую или красную.

Определение содержания каротиноидов проводили согласно методике предложенной в статье [160].

Методика. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 95% этилового спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на плитке с закрытой спиралью в течение 60 мин., периодически встряхивают для смывания частиц сырья со стенок. Далее извлечение охлаждают, фильтруют в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки. Затем 5 мл извлечения для плодов (или 7 мл для сбора №1, 15 мл для сбора №2) переносят в мерную колбу на 25 мл, доводят объем до метки. В качестве раствора сравнения используют 95% этиловый спирт.

Спектры извлечений плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной снимали на спектрофотометре «Lambda-950» Perkin Elmer, США, в диапазоне длин волн 380 – 550 (рис.5.28, 5.29, 5.30).

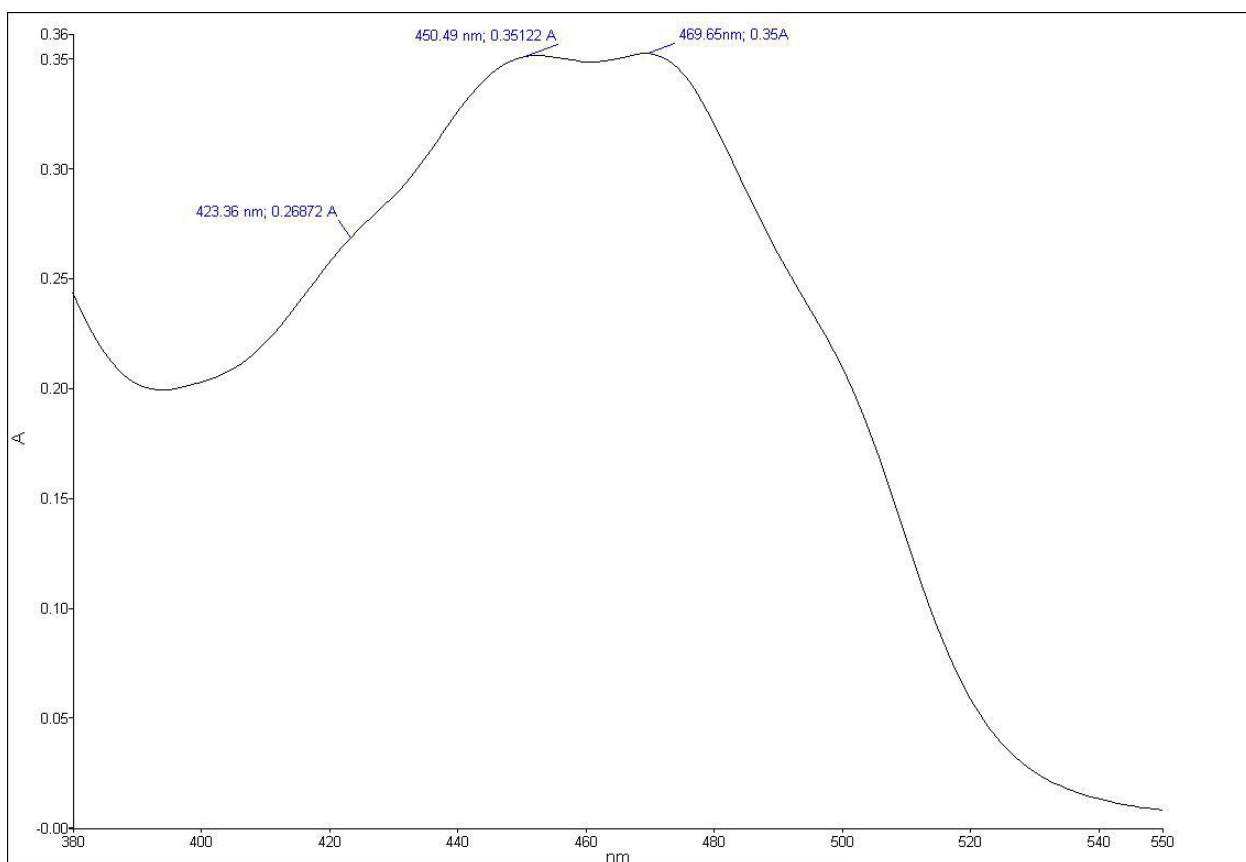


Рис.5.28. Абсорбционный спектр каротиноидов в плодах шиповника

Согласно литературным данным, спектры поглощения каротиноидов в большинстве случаев характеризуются наличием трех максимумов поглощения или двух максимумов поглощения и плеча [79].

При сравнении полученного спектра поглощения каротиноидов плодов шиповника (рис.5.28) со спектром стандартного образца β -каротина в этаноле, в обоих случаях наблюдаются три максимума поглощения при 425, 450, 477 нм, что свидетельствует о наличии β -каротина в плодах шиповника.

На абсорбционном спектре плодов рябины обыкновенной детектируется 2 максимума поглощения при 450 и 474 нм (рис.5.29). На абсорбционном спектре плодов смородины черной детектируется один максимум поглощения при 476 нм, соответствующий поглощению каротиноидов (рис.5.30).

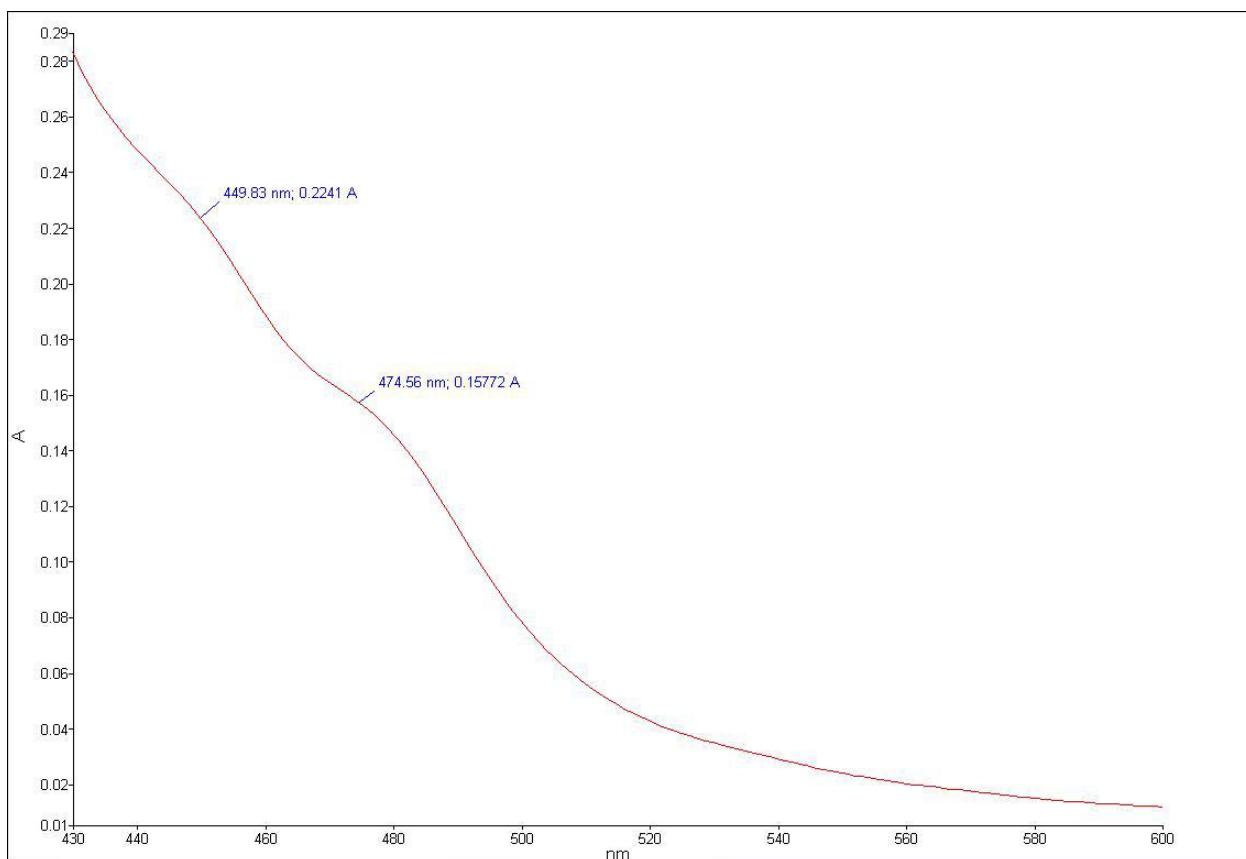


Рис.5.29. Абсорбционный спектр каротиноидов в плодах рябины обыкновенной

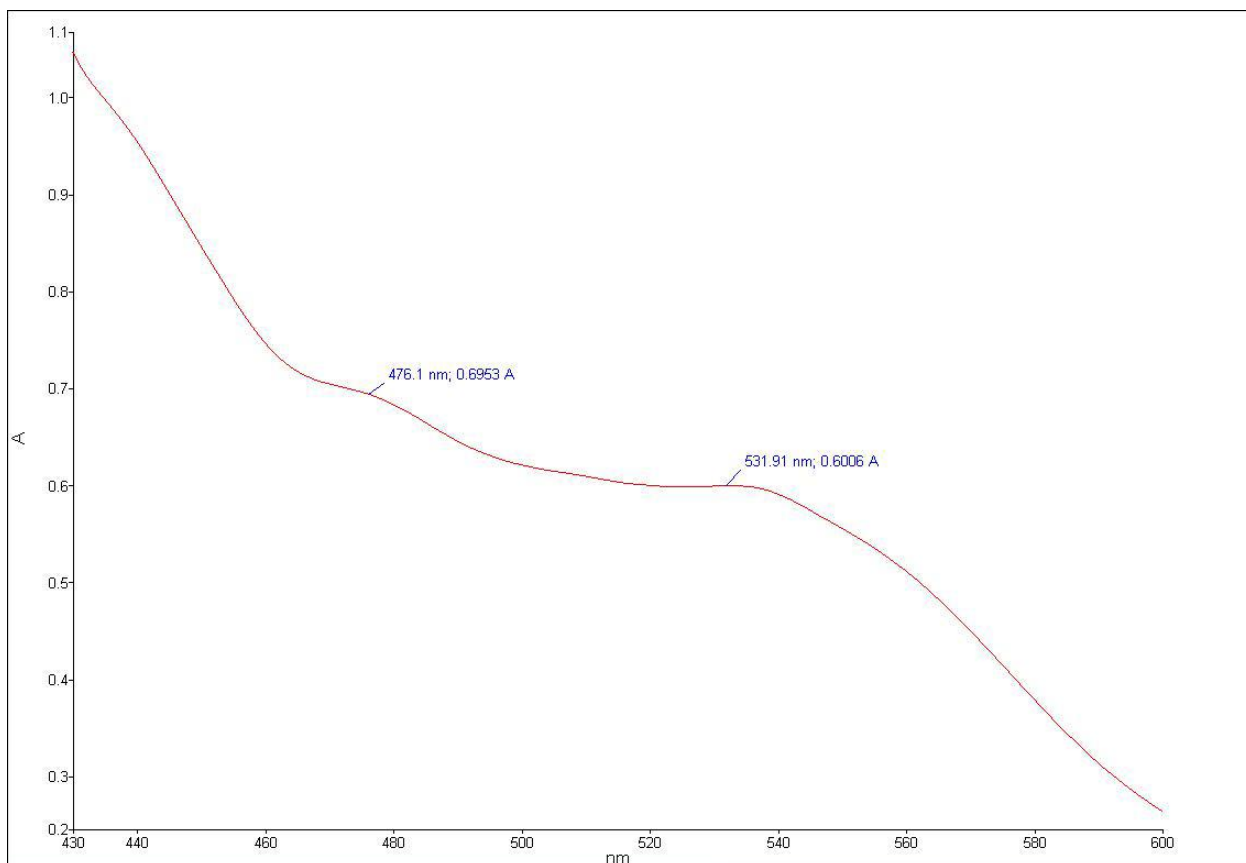


Рис.5.30. Абсорбционный спектр каротиноидов в плодах черной смородины

Для витаминного сбора №2 детектируются максимумы поглощения при 446 нм и 470 нм, для витаминного сбора №1 – при 440 и 470 нм, что также можно отнести к поглощению каротиноидов (рис.5.31, 5.32).

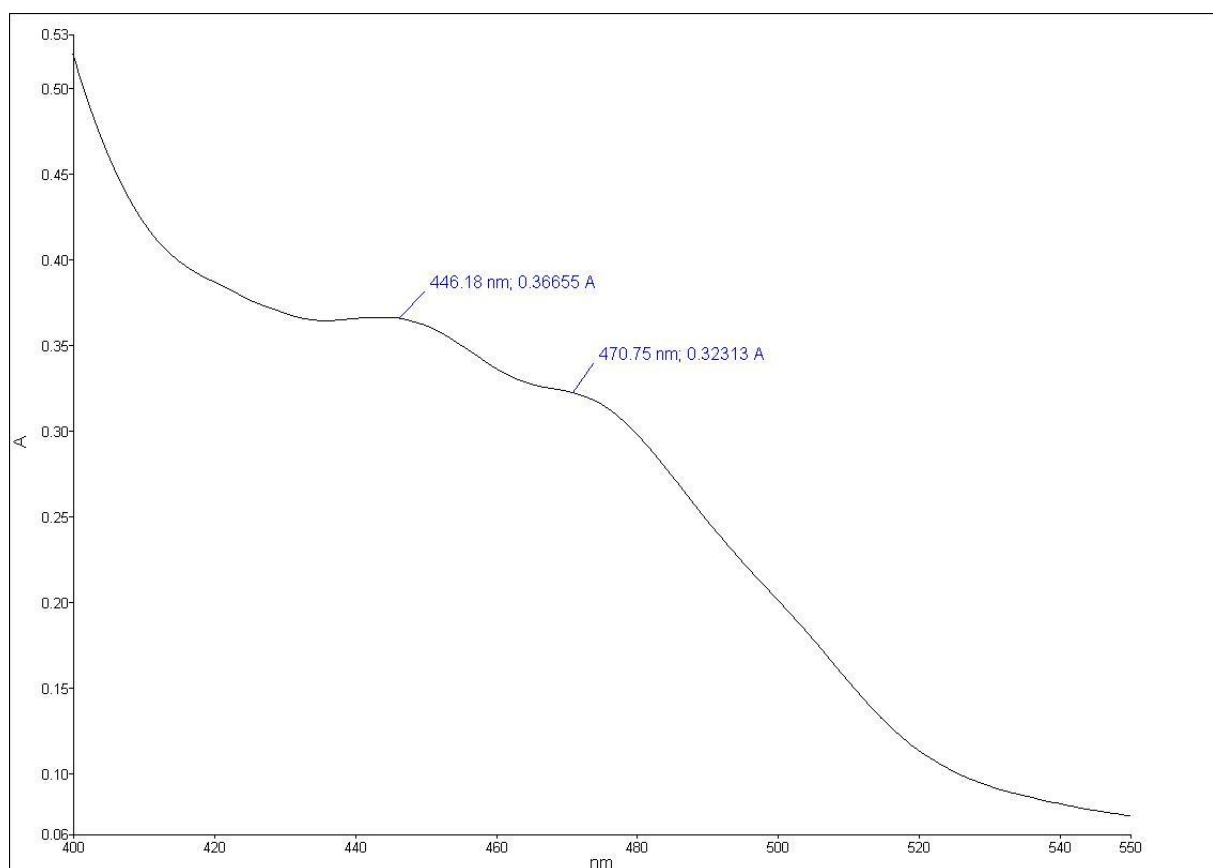


Рис.5.31. Абсорбционный спектр каротиноидов в витаминном сборе №2

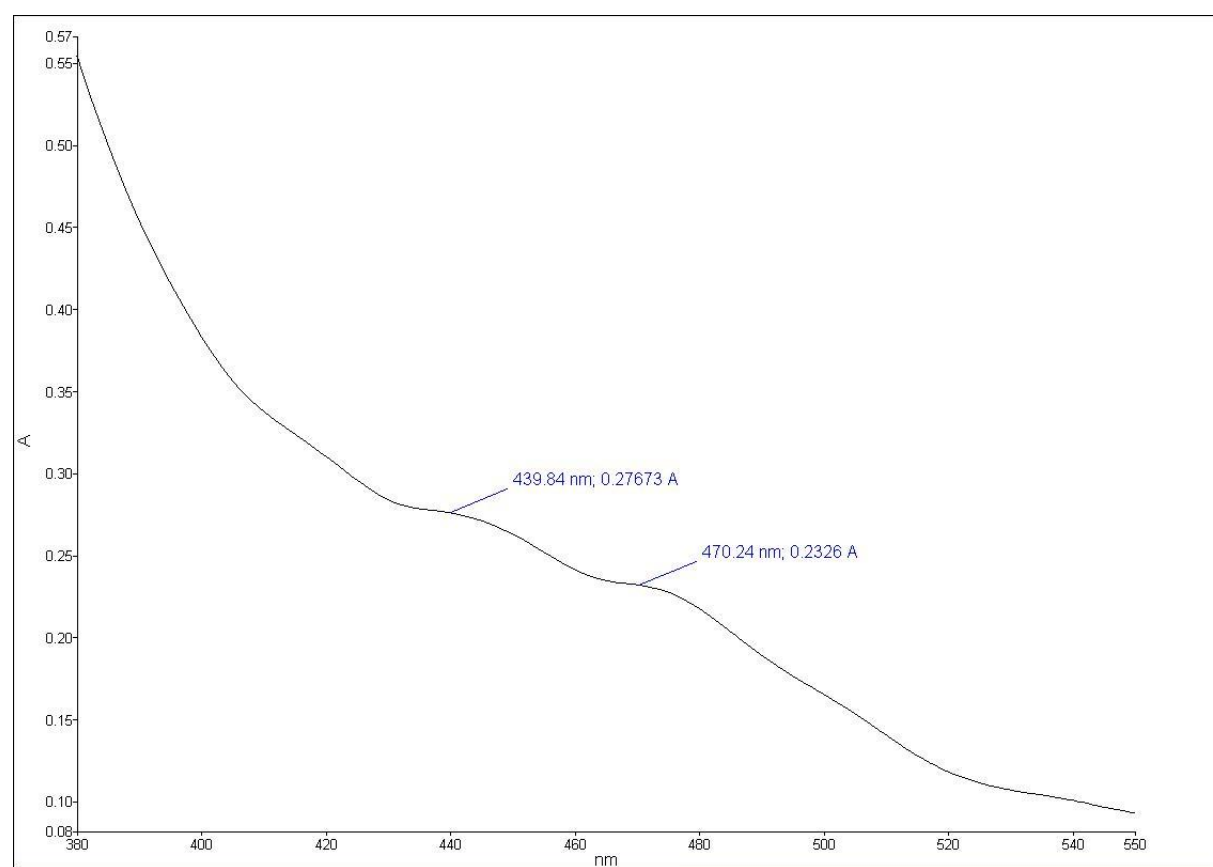


Рис.5.32. Абсорбционный спектр каротиноидов в витаминном сборе №1

Содержание каротиноидов в мг% в пересчете на β -каротин и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X(\text{мг}\%) = \frac{A \cdot 100 \cdot 1000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot (100 - W)}$$

Где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения, равный 2500 при $\lambda=450$ нм;

m - масса навески сырья, г;

W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

Результаты количественного содержания каротиноидов в изучаемых объектах представлены в таблице 5.42.

Таблица 5.42

Содержание каротиноидов в пересчете на β -каротин и абсолютно сухое сырье в витаминных сборах №1 и 2 и их компонентах

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

Объект исслед.	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды черной смородины	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X, мг%	0,029±0,001	0,018±0,001	0,058±0,001	0,019±0,001	0,030±0,001

5.6 Количественное определение антоцианов в витаминных сборах и их компонентах

За окраску растений также отвечают и такие пигменты как антоцианы, они применяются как натуральные красители. Однако основная их ценность для фармации заключается в их фармакологических эффектах: вазопротекторный, антиоксидантный, противовоспалительный, противоотечный [119, 180, 182, 186]. Также для данной группы соединений выявлена способность ускорять регенерацию родопсина, улучшать кровообращение глаза и предотвращать фотоиндуцированное повреждение сетчатки, улучшать состояние глаза при миопии и диабетической ретинопатии [10, 194, 195]. Подобный эффект антоцианов на организм

человека объясняется их антиоксидантной активностью, более выраженной, чем у α -токоферола, аскорбиновой кислоты, других групп флавоноидов, β -каротина [114].

Исходя из выше сказанного, для профилактики офтальмологических заболеваний и в качестве поддерживающей терапии, необходимо рассматривать растительные препараты, обогащенных антоцианами. Помимо общеизвестного источника антоцианов – плодов черники, данной группой БАВ богаты и плоды черной смородины и плодах рябины обыкновенной, что обосновывает изучение антоцианов в витаминных сборах №1 и №2.

Установление содержания антоцианов методом спектрофотометрии

Содержание антоцианов в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах проводили спектрофотометрически, согласно модифицированной методике ГФ XIII ФС.2.5.0002.15 Аронии черноплодной свежие плоды.

Методика. Около 1,0 г (точная навеска) измельченных плодов помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 25 мл спирта 96 %, содержащего хлористоводородную кислоту. Экстракцию проводят при нагревании на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин., при постоянном перемешивании. Полученный раствор охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки.

Аликвоту 5 мл переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки, в качестве раствора сравнения использовали спирт 96 %, содержащий хлористоводородную кислоту.

Приготовление спирта 96 %, содержащего хлористоводородную кислоту. К 100 мл спирта 96 % осторожно приливают по каплям 1,0 мл кислоты хлористоводородной концентрированной. Раствор используют свежеприготовленным.

Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре в диапазоне длин волн 450 - 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Во всех анализируемых объектах были получены максимумы поглощения, соответствующие антоциановому комплексу веществ, как показано на абсорбционных спектрах на рисунках 5.33 – 5.37.

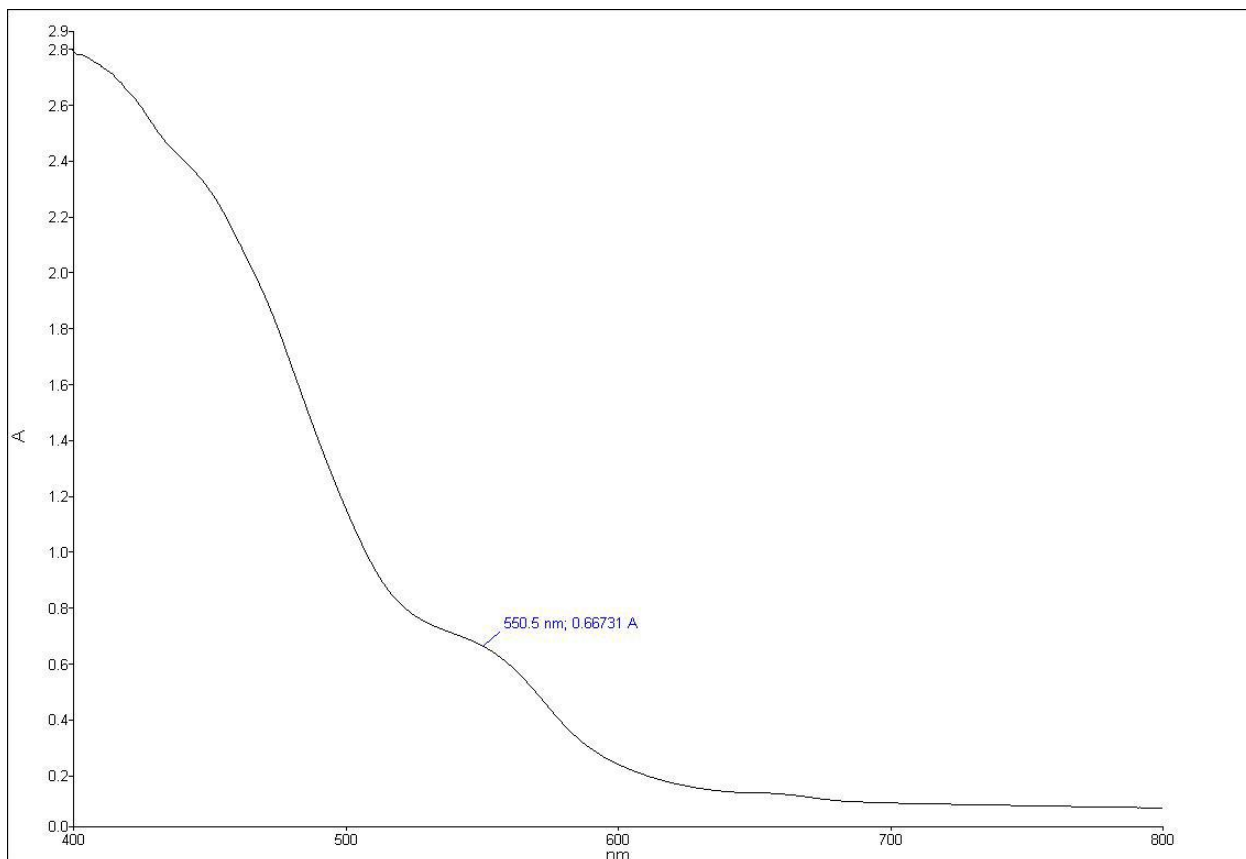


Рис.5.33. Абсорбционный спектр поглощения антоцианов в плодах шиповника

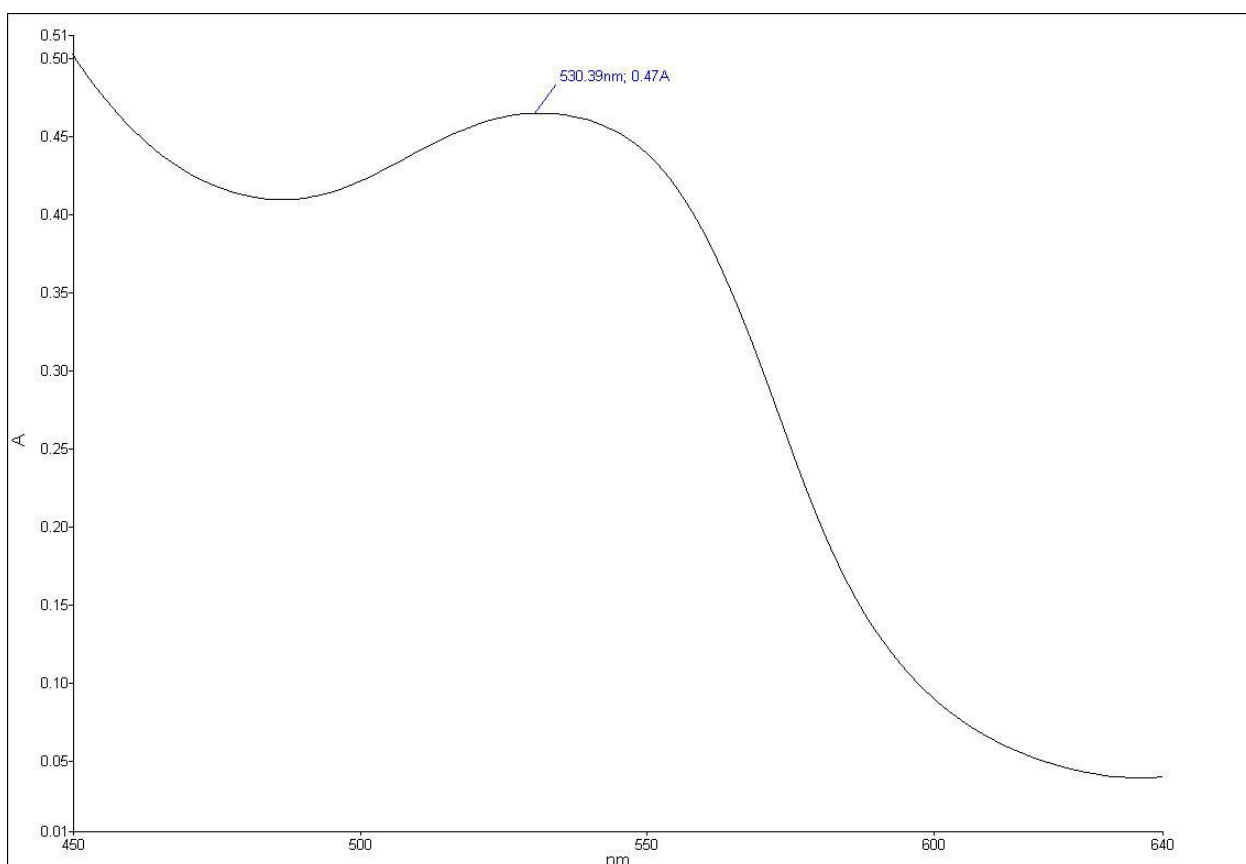


Рис.5.34. Абсорбционный спектр поглощения антоцианов в плодах рябины обыкновенной

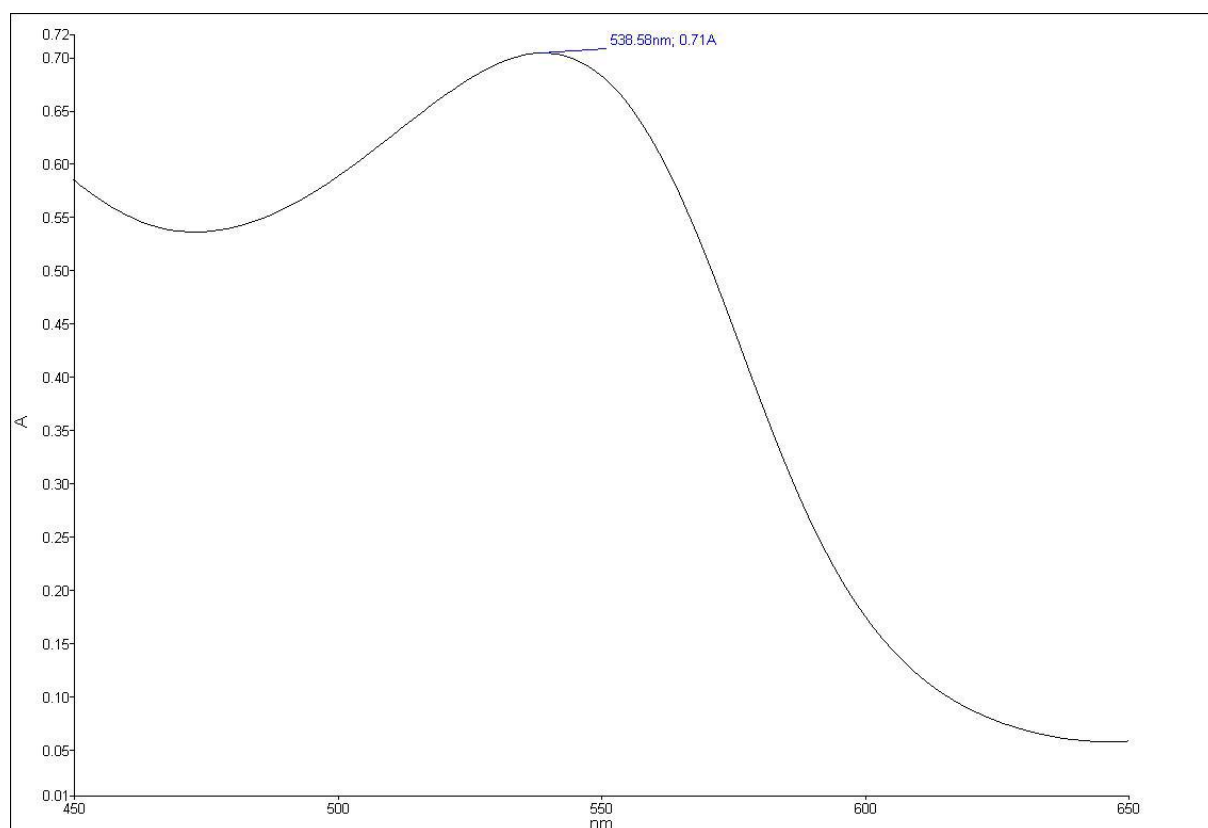


Рис.5.35. Абсорбционный спектр поглощения антоцианов в плодах смородины черной

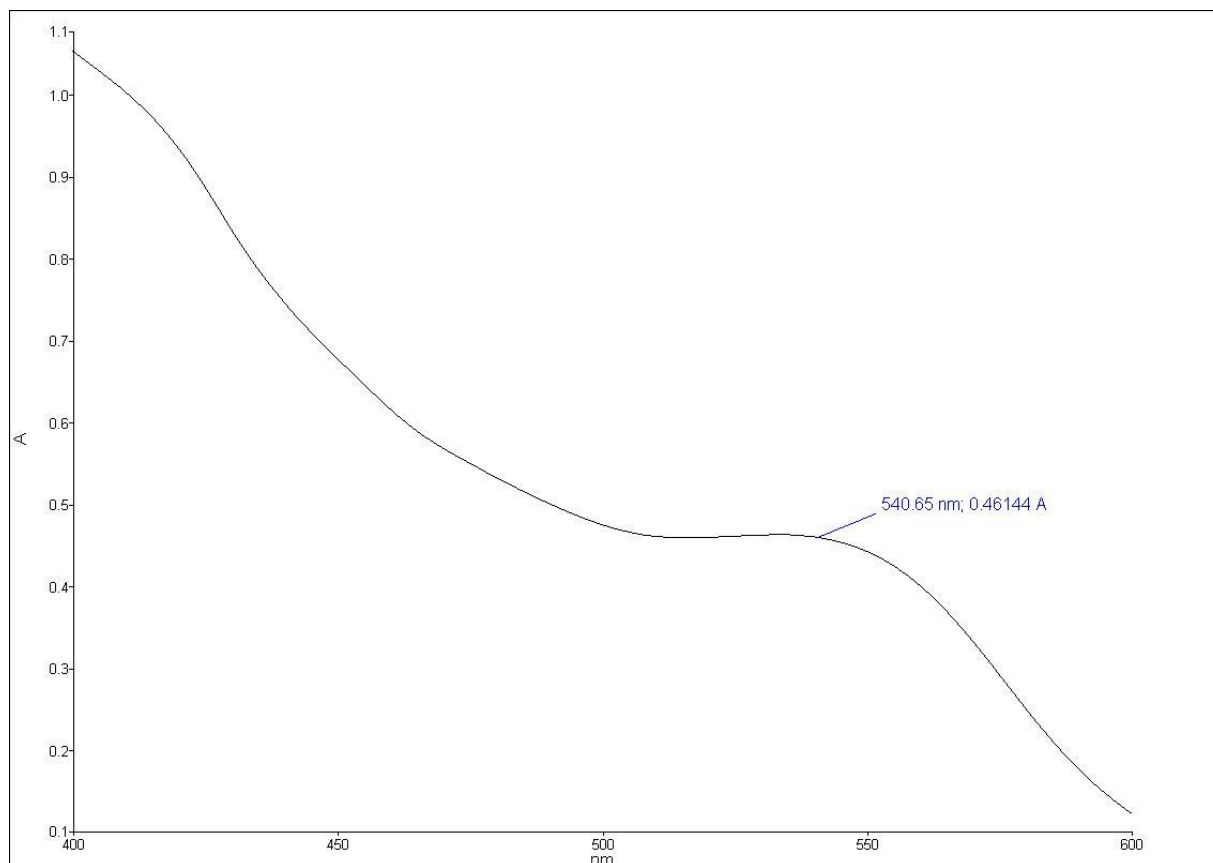


Рис.5.36. Абсорбционный спектр поглощения антоцианов в витаминном сборе №1

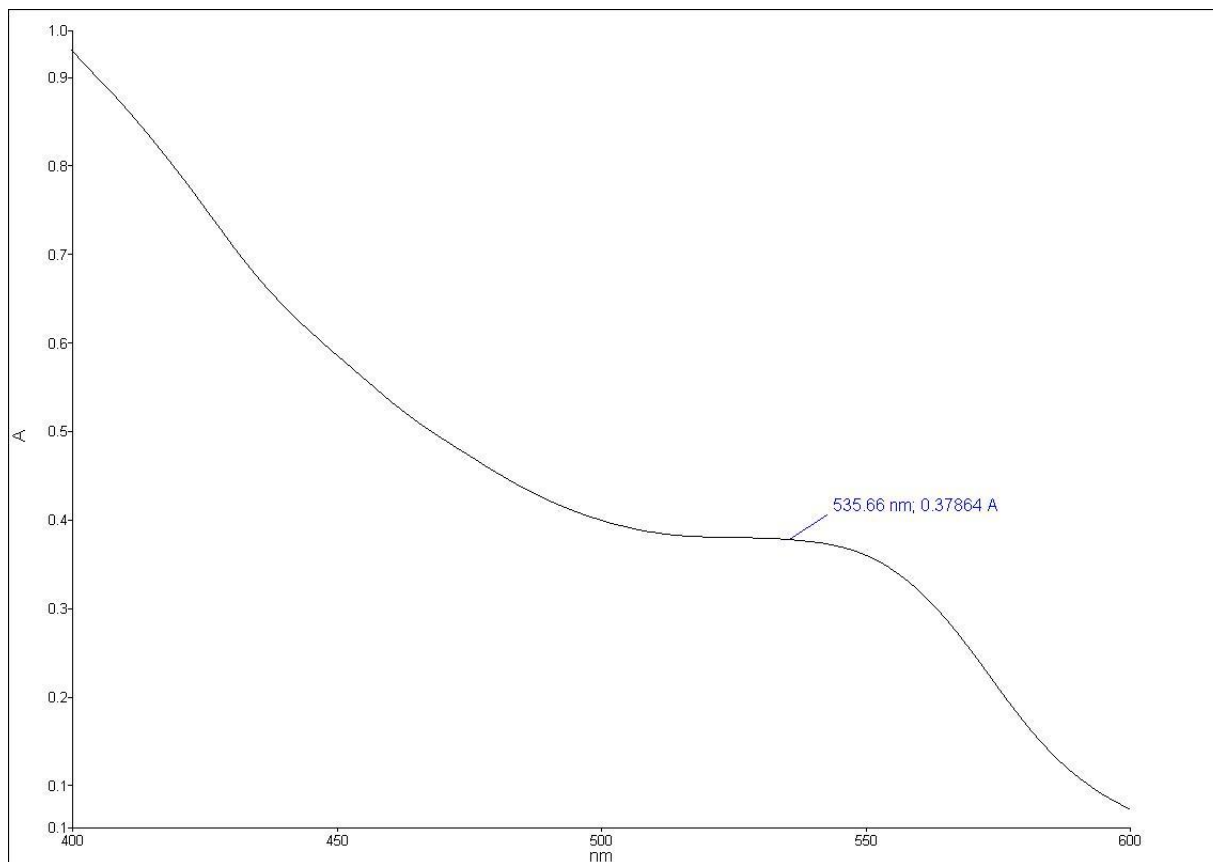


Рис.5.37. Абсорбционный спектр поглощения антоцианов в витаминном сборе №2

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot V_a \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения, равный 100 при $\lambda=534$ нм;

m - масса навески сырья, г;

V_a – аликвота анализируемого раствора, мл;

W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

Результаты количественного содержания антоцианов в изучаемых объектах представлены в таблице 5.43.

Таблица 5.43

Содержание антоцианов в пересчете на цианидина-3-О-глюкозид в витаминных сборах №1 и 2 и их компонентах

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

Объект исслед.	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды черной смородины	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X, %	0,173±0,001	0,609±0,001	0,934±0,005	0,589±0,003	0,490±0,004

5.7 Количественное определение полисахаридов методом гравиметрии

Углеводная основа изучаемых объектов представлена водорастворимыми полисахаридами. В медицинской практике используются обволакивающее, противовоспалительное и ранозаживляющее свойства крахмала, слизей и камедей, содержащихся в лекарственном растительном сырье [124].

Ранее полисахариды (ПС) считались только балластными веществами. В настоящее время установлена их противовоспалительная активность [47, 48, 49, 71], антиоксидантные и противовирусные свойства [9, 21],

следовательно, актуальным является установление их содержания в витаминных сборах и их компонентах.

Количественное определение полисахаридов в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах устанавливали согласно методике представленной в ГФ XIII в статье ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листа».

Методика. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагретой до кипения. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин.

Водные извлечения фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоёв марли, вложенной в стеклянную воронку и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96 %, перемешивают, подогревают на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора спирта 96 % в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96 % (1:1). Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X \% = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где

m_1 – вес фильтра, г;

m_2 – вес фильтра с осадком, г;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Полученные данные представлены в таблице 5.44.

Таблица 5.44

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в витаминных сборах №1 и 2 и их компонентах (гравиметрия)

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

Объект исследования	Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье, %
Плоды шиповника	$7,68 \pm 0,03$
Плоды рябины	$2,01 \pm 0,02$
Плоды смородины черной	$4,02 \pm 0,03$
Витаминный сбор №1	$7,56 \pm 0,03$
Витаминный сбор №2	$6,58 \pm 0,02$

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 5

1. Установлено количественное содержание основных групп БАВ в витаминных сборах №1 и №2 и компонентах: суммы органических кислот, кислоты аскорбиновой и дубильных веществ. Количественное определение проводили методами с различной индикацией конечной точки титрования (индикаторное титрование, потенциометрическое титрование, кулонометрия).
2. Показано преимущество потенциометрического титрования, поскольку для сильно окрашенных соединений установление конечной точки титрования по изменению окраски индикатора затруднено.
3. Разработаны и валидированы методики количественного определения суммы органических кислот методом потенциометрического титрования в витаминных сборах №1 и №2 и плодах смородины черной.

4. Разработана методика идентификации субстанции плодов шиповника и витаминного сбора №1 по спектру поглощения.
5. Разработаны методики количественного определения флавоноидов витаминных сборах и компонентах. Установлены оптимальные значения pH и время комплексообразования, способствующие повышению селективности реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия и обеспечивающие протекание реакции в соотношении флавоноид – AlCl_3 1:1. Определено оптимальное время комплексообразования для изучаемых объектов – 40-50 мин. Проведена валидация методики СФМ анализа на содержание суммы флавоноидов.
6. Было установлено содержание дубильных веществ – $3,24 \pm 0,01$ %, антоцианов – $0,173 \pm 0,001$ %, каротиноидов – $0,029 \pm 0,001$ мг% и полисахаридов – $7,68 \pm 0,03$ % в витаминных сборах и компонентах.

По результатам исследований (Главы 5) был получен патент РФ на изобретение (№ 2662059 от 28.12.2017) «Способ спектральной идентификации плодов шиповника и витаминного сбора».

Способ спектральной идентификации был введен в проект фармакопейной статьи «Витаминный сбор №1» как метод качественного анализа.

Исследования по разработке потенциометрическое титрование суммы свободных органических кислот вошли в фармакопейные статьи «Смородины черной плоды», «Витаминный сбор №1» и «Витаминный сбор №2» как метод стандартизации по показателю «сумма свободных органических кислот».

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ НАСТОЕВ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ №1 И №2

Витаминные сборы используются в виде водных извлечений – настоев. Данная лекарственная форма позволяет сохранить в нативной форме аскорбиновую кислоту и другие термолабильные БАВ. Настои получали согласно методики, описанной в ГФ XIII изд. (ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары). Целесообразным является в рамках теории «сквозной» стандартизации установить состав водных извлечений из витаминных сборов [75, 125, 148].

6.1. Органолептические характеристики. Коэффициент водопоглощения

При приготовлении водных извлечений лекарственное растительное сырье может поглощать некоторое количество воды, и после отжимания она задерживается в сырье. Поэтому при расчетах необходимо учитывать коэффициент водопоглощения, который, в свою очередь, зависит от степени удерживания воды конкретным видом сырья и отличается у различных видов лекарственного растительного сырья. Определение коэффициента проводили согласно методике ОФС.1.5.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья». Результаты исследований представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1

Коэффициент водопоглощения плодов шиповника, плодов рябины, плодов черной смородины и витаминных сборов №1 и 2

n=5; p=0,95

Объект исследования	Коэффициент водопоглощения, мл/г
Плоды шиповника	1,19±0,01
Плоды рябины	1,63±0,02
Плоды смородины черной	1,81±0,01
Витаминный сбор №1	1,89±0,02
Витаминный сбор №2	1,68±0,02

Настои готовили из измельченного лекарственного растительного сырья и витаминных сборов №1 и 2 в соответствии с общей фармакопейной статьей «Настои и отвары» ГФ XIII.

Методика. Около 10 г измельченных плодов шиповника (или плодов рябины, или плодов смородины черной или сбора №1 и №2) заливают водой комнатной температуры (1:10), взятой с учетом коэффициента водопоглощения. Настаивают в инфундирном аппарате на кипящей водяной бане в течение 15 мин., затем охлаждают при комнатной температуре не менее 45 мин., процеживают (отжимая растительное сырье) и прибавляют воду до требуемого объема извлечения (100 мл).

Определение органолептических характеристик проводили согласно ОФС.1.2.1.0006.15 и ОФС 42-0051-07: цвет - визуально на белом фоне при дневном свете, прозрачность – при освещении электрической лампой на черном фоне в сравнении с растворителем, вкус – пробуя извлечение.

Результаты определения представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2

Органолептические характеристики водных извлечений из плодов шиповника, рябины и сбора №2.

Объект исследования	Цвет	Вкус	Прозрачность
Шиповник	Светло-желтый	Кисло-сладкий	Прозрачный
Рябина	Желтоватый	Горьковато-кислый	Прозрачный
Плоды смородины черной	Темно-коричневый	Кисло-сладкий	Прозрачный
Витаминный сбор №1	Светло-коричневый	Кисло-сладкий	Прозрачный
Витаминный сбор №2	Темно-желтый	Горько-кислый	Прозрачный

Из полученных результатов видно, что настои соответствуют требованиям, предъявляемым к водным извлечениям, ГФ XIII изд. Все они представляют прозрачные жидкости желтоватой или коричневой окраски с кисло-сладким или горьковато-кислым вкусом.

6.2. Качественный анализ водных извлечений

Качественное обнаружение органических кислот и кислоты аскорбиновой в анализируемом ЛРС и в настоях проводилось с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) в восходящем токе растворителей [57, 58, 96].

Для проведения ТСХ готовили водные извлечения из анализируемого сырья по методике, описанной в ФС и получали настои по методике, представленной в ОФС ГФ XI. Полученные водные извлечения фильтровали и подвергали анализу.

Результаты качественного анализа представлены в параграфах 4.3. В настоях, также как и сырье, было установлено присутствие кислот яблочной, лимонной и аскорбиновой (рис.4.1 и 4.2).

6.3. Количественный анализ БАВ в водных извлечениях из витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов

Согласно литературным данным в настои из сырья переходит 7-10 % БАВ [153]. Гидрофильная фракция витаминных сборов представлена аскорбиновой кислотой и другими водорастворимыми витаминами, органическими кислотами, дубильными веществами, флавоноидами и т.д. В рамках теории «сквозной» стандартизации нами была проведена количественная оценка основных водорастворимых БАВ в настоях витаминных сборов и их компонентах.

6.3.1. Установление содержания суммы свободных органических кислот титриметрией с использованием индикаторов

При определении содержания суммы органических кислот в настоях, полученных из витаминных сборов №1 и 2 их компонентах применяли методику количественного определения кислот, описанную в ФС «Плоды

шиповника», ГФ XI (кисотно-основное титрование со смесью индикаторов) [57, 59, 62].

Отбирали 10 мл водного извлечения (настоя и отвара), помещали в колбу вместимостью 500 мл, прибавляли 200 мл свежeproкипячённой воды, 1 мл 1% спиртового раствора фенолфталеина и 2 мл 0,1% раствора метиленового синего и титровали раствором едкого натра в концентрации 0,1 моль/л до появления в пене лилово-красной окраски.

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

$$X = \frac{V \cdot 0.0067 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot V_{\text{настоя}}}, \text{ где}$$

0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах;

K – поправочный коэффициент;

V_a – объем извлечения, взятого на титрование, в миллилитрах;

100 – объем полученного извлечения, в миллилитрах.

Результат количественного определения представлен в таблице 6.3.

Таблица 6.3

Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в настоях витаминных сборов №1 и 2 и их компонентах (алкалиметрия с использованием индикаторов).

n=5; p=0,95

Настои	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины черной	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X, %	0,21±0,01	0,39±0,02	0,49±0,04	0,28±0,01	0,26±0,01

6.3.2. Установление содержания суммы свободных органических кислот потенциометрическим титрованием

Определение содержания суммы органических кислот в настоях из плодов шиповника, рябины и сбора №2 проводили по модифицированной методике на рН-метре [57, 62, 96, 101].

Методика. В мерный стакан с помощью пипетки отмеряют 25 мл водного извлечения, опускают стеклянный электрод, присоединенный к соответствующему входу на рН-метре. Титруют 0,1 М раствора натрия гидроксида из микробюретки при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Фиксируют показания потенциометра и по полученным данным строят кривые потенциометрического титрования в координатах $pH=f(V)$ для определения точки эквивалентности.

Также для более точного определения конечной точки титрования были построены дифференциальные кривые в координатах $pH=f(dV/dpH)$, определен эквивалентный объем.

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

$$X = \frac{V \cdot 0.0067 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot V_{\text{настоя}}}, \text{ где}$$

0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах;

K – поправочный коэффициент;

V_a – объем извлечения, взятого на титрование, в миллилитрах;

100 – объем полученного извлечения, в миллилитрах.

Результаты количественного определения представлены в таблице 6.4 и на рисунке 6.1.

Таблица 6.4

Содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в настоях витаминных сборов №1 и №2 и их компонентах (потенциометрическое титрование)

n=5; p=0,95

Настои	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины черной	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X, %	0,19±0,01	0,32±0,02	0,28±0,01	0,27±0,01	0,23±0,01

Расхождение в данных, полученных потенциометрическим и индикаторным титрованием, наиболее отчетливо прослеживаются для настоя плодов смородины черной. Это связано с интенсивной окраской водного извлечения, и в связи с чем индикаторное титрование дает завышенный результат.

6.3.3. Установление содержания суммы свободных органических кислот кулонометрическим титрованием

Для определения содержания суммы органических кислот в настоях из витаминного сбора №2 и его компонентов методом кулонометрии с помощью прибора «Эксперт-006» [57, 59, 96, 101].

Методика. В мерный стакан отмеривали 50 мл раствора электролита, проводилась генерация гидроксид-ионов, пипеткой вводилась аликвота водного извлечения ($V_a = 0,5$ мл). Титрование проводилось гидроксид-ионами, сгенерированными прибором; результат по содержанию суммы свободных органических кислот получали в пересчете на яблочную кислоту в аликвоте извлечения, в микрограммах.

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

$$X = \frac{x \cdot 10^{-6} \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m_{\text{настоя}}}, \text{ где}$$

x – показания кулонометра, содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту, в микрограммах;

V_a – объем извлечения, взятый на титрование, в миллилитрах;

100 – объем полученного извлечения, в миллилитрах.

Результаты кулонометрического титрования представлены в таблице 6.5 и на рисунке 6.1.

Таблица 6.5

Содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в настоях поливитаминных сборов и их компонентов (кулонометрия)

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

Настои	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины черной	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X%	0,06±0,02	0,08±0,02	0,22±0,02	0,14±0,01	0,07±0,03

Сравнение данных по суммарному содержанию органических кислот (табл.6.6) в витаминных сборах № 1 и № 2, их компонентах и настоях, установленных индикаторным, потенциометрическим и кулонометрическим титрованием, показало, что методики потенциометрического и индикаторного титрования (ГФ) дают сходимые результаты как в анализе ЛРС, так и его настоев. Исключение составляют плоды смородины черной, водные извлечения которых интенсивно окрашены. Кулонометрическое титрование может быть использовано при анализе органических кислот в сырье, однако в случае с настоями дает заниженные результаты, вероятно, в связи с низкими концентрациями БАС в этой лекарственной форма и малым объемом аликвоты.

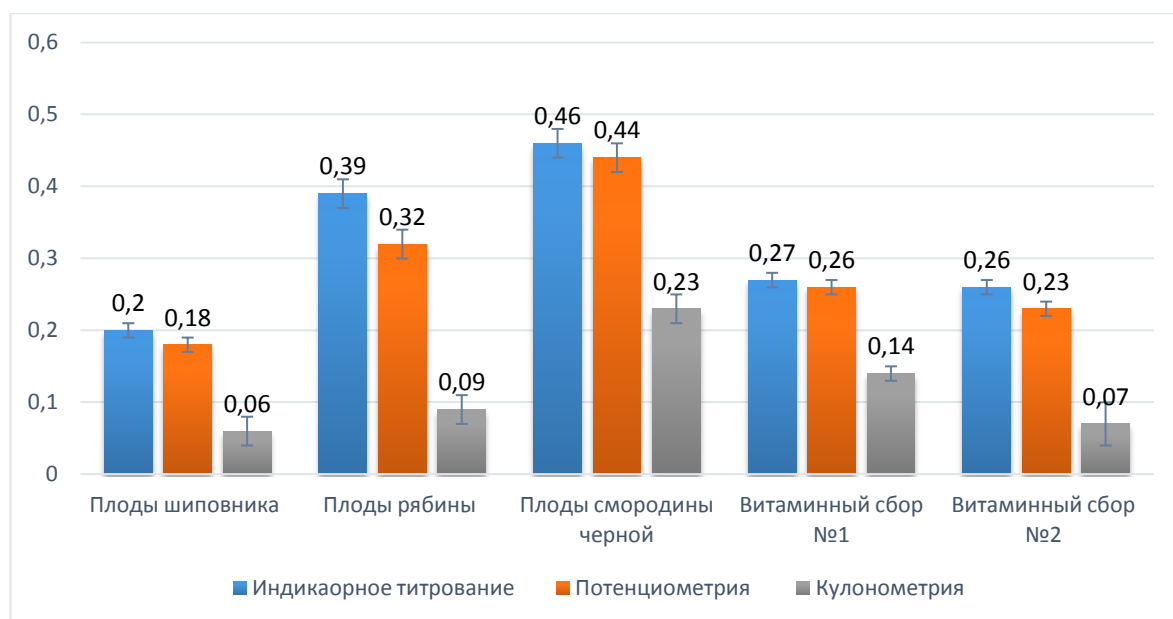


Рис. 6.1. Содержание суммы свободных органических кислот в настоях из витаминных сборов и их компонентов

Таблица 6.6

Сводная таблица по содержанию суммы органических кислот, определенному различными методами

n=5; p=0,95

Метод	Объект исследования	Содержание суммы органических кислот, %	
		Сырье	Настои
Индикаорное титрование	Плоды шиповника	2,87±0,01	0,21±0,01
	Плоды рябины	3,78±0,02	0,39±0,02
	Плоды смородины черной	7,51±0,09	0,49±0,02
	Витаминный сбор №1	4,21±0,07	0,28±0,01
	Витаминный сбор №2	3,06±0,02	0,26±0,01
Потенциометрическое титрование	Плоды шиповника	2,79±0,02	0,19±0,01
	Плоды рябины	3,68±0,08	0,32±0,02
	Плоды смородины черной	6,65±0,09	0,46±0,02
	Витаминный сбор №1	3,63±0,06	0,27±0,01
	Витаминный сбор №2	3,01±0,06	0,23±0,01
Кулонометрия	Плоды шиповника	2,60±0,05	0,06±0,02
	Плоды рябины	2,98±0,07	0,08±0,02
	Плоды смородины черной	8,79±0,03	0,22±0,02
	Витаминный сбор №1	6,31±0,05	0,14±0,01
	Витаминный сбор №2	3,15±0,08	0,07±0,03

6.3.4. Установление содержания дубильных веществ

Определение содержания дубильных веществ в настоях из витаминных сборов №1 и 2, их компонентах проводили по модифицированной методике в соответствии с требованиями ГФ XIII «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [60, 62].

Полученные данные представлены в таблице 6.7 и на рисунке 6.2.

Таблица 6.7

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в настоях витаминных сборов №1 и 2 и их компонентов

n=5; p=0,95

Настои	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины черной	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
X,%	1,39±0,01	0,67±0,03	0,56±0,05	1,17±0,06	1,38±0,01

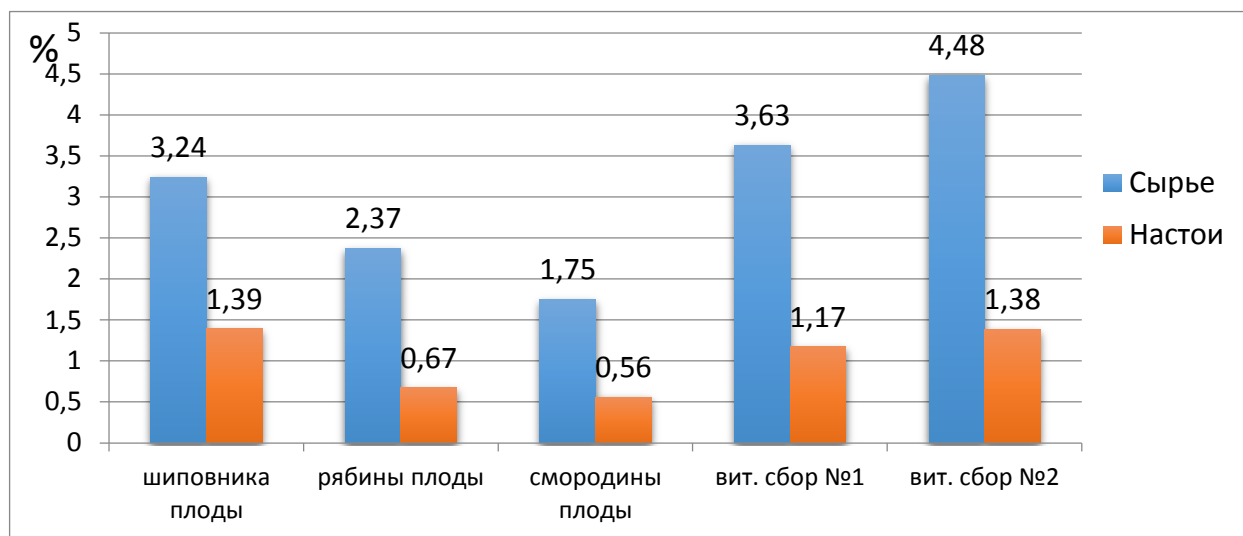


Рис.6.2. Содержание дубильных веществ в витаминных сборах №1 и №2, их компонентах и в настоях

Установлено, что наибольшее количество дубильных веществ содержится в плодах шиповника и в витаминных сборах №1 и №2. Однако все изучаемые объекты не богаты дубильными веществами. В настои из сырья переходит от 15% до 40% дубильных веществ.

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 6

1. Получены настои из витаминных сборов №1 и №2. Установлены их органолептические характеристики. Проведен их качественный и количественный анализ.
2. Установлено содержание органических кислот титриметрическими методами с различной индикацией конечной точки титрования (индикаторной, потенциметрической и кулонометрической).
3. Было показано, что методики потенциметрического и индикаторного титрования (ГФ) дают сходимые результаты как в анализе ЛРС, так и его настоев. Исключение – плоды смородины черной, для которой индикаторное титрование дает завышенные результаты. Кулонометрическое титрование может быть использовано при анализе органических кислот в сырье, однако в случае с настоями дает заниженные результаты, вероятно, в связи с низкими концентрациями БАВ в этой лекарственной форме и малым объемом аликвоты.
4. Установлено содержание аскорбиновой кислоты и дубильных веществ в настоях их витаминных сборов и компонентов. Отмечено, что изучаемые объекты не богаты дубильными веществами, их содержание в среднем колеблется от 0,56 до 1,39 % в пересчете на танин. Показано, что антоцианами и каротиноидами наиболее богаты плоды смородины, кислотой аскорбиновой – плоды смородины и витаминный сбор №1, полисахаридами и дубильными веществами – плоды шиповника, витаминные сборы №1 и №2.

ГЛАВА 7. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАСТОЕК ИЗ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ

Настойки – это лекарственная форма, представляющая собой водно-спиртовые извлечения из лекарственного растительного сырья. Их преимущество перед настоями и отварами заключается в возможности длительного хранения и применения в малых дозах, в связи с большей концентрацией БАВ. В настойки, как и в настои, переходят гидрофильные БАВ: аскорбиновая кислота, дубильные вещества, флавоноиды, органические кислоты и др. Нами была изучена возможность получения настоек на основе витаминных сборов №1 и №2 и проведен анализ основных групп БАВ [61, 64], переходящих в водно-спиртовое извлечение. Также была изучена антимикробная и антимикотическая активность настоек [56].

7.1. Получение настоек из витаминных сборов №1 и №2

Настойки готовили методом перколяции в соответствии с методикой, представленной в общей фармакопейной статье «Настойки» ГФ XIII. В качестве экстрагента применяли этанол с концентрацией 70%, 50% и 40%. Настойки готовили в соотношении сырье : экстрагент – 1:5, продолжительность экстракции составила 48 ч. [61, 64].

Методика. Измельченное сырье витаминного сбора №1 или №2 массой 20 г (точная навеска) помещают в экстрактор. Отмеряют 100 мл 70% (50%, 40%) этанола. Навеску сырья в экстракторе заливают небольшим количеством экстрагента на 1 час для набухания. Переносят содержимое экстрактора в перколятор и заливают экстрагентом «до зеркала», настаивают в течение 24 часов. 1/3 часть извлечения сливают, к содержимому перколятора добавляют оставшееся количество экстрагента «до зеркала», настаивают 24 часа. Извлечение сливают. Вытяжки объединяют и полученное извлечение оставляют на 1 сутки при температуре 8°C. Затем фильтруют через воронку с 3-м слоем марли.

7.2. Установление характеристик настоек из витаминных сборов №1 и №2 как лекарственной формы

Определение органолептических характеристик проводили согласно ОФС.1.2.1.0006.15 и ОФС 42-0051-07: цвет - визуально на белом фоне при дневном свете, прозрачность – при освещении электрической лампой на черном фоне в сравнении с растворителем, вкус – пробуя извлечение.

Результаты определения представлены в таблице 7.1.

Таблица 7.1

Органолептические характеристики настоек

Объект исследования	Концентрация этанола, %	Цвет	Вкус	Прозрачность
Витаминный сбор №1	70	Светло-желтый	Горько-кислый	Прозрачный
	50	Желто-оранжевый	Горько-кислый	Прозрачный
	40	Оранжево-желтый	Горько-кислый	Прозрачный
Витаминный сбор №2	70	Оранжево-коричневый	Кисло-сладкий	Прозрачный
	50	Светло-коричневый	Кисло-сладкий	Прозрачный
	40	Темно-коричневый	Кисло-сладкий	Прозрачный

Определение плотности настоек

Была определена плотность настоек витаминных сборов №1 и №2 в зависимости от концентрации экстрагента, применяемого при изготовлении. Плотность настоек определяли в соответствии с фармакопейной статьей ОФС.1.2.1.0014.15 «Плотность» ГФ XIII (метод 1).

Плотность настоек рассчитывали по формуле:

$$\rho_{20} = \frac{(m_2 - m) * 0,99703}{m_1 - m} + 0,0012$$

где m – масса пустого пикнометра;

m_1 – масса пикнометра с водой;

m_2 – масса пикнометра с извлечением;

0,99703 – значение плотности воды при 20° С;

0,0012 – плотность воздуха при 20° С.

Результаты определения плотности полученных настоек представлены в табл. 7.2.

Таблица 7.2

Плотность настоек, полученных на основе витаминных сборов №1 и №2

Объект исследования	Концентрация этанола, %	Плотность настойки, г/мл
Витаминный сбор №1	70	0,8986
	50	0,9398
	40	0,9648
Витаминный сбор №2	70	0,8999
	50	0,9380
	40	0,9539

7.3. Установление содержания БАВ в настойках из витаминных сборов №1 и №2

7.3.1. Количественное определение суммы свободных органических кислот

Определение содержания суммы органических кислот в настойках (полученных экстракцией водно-спиртовыми смесями с различными концентрациями этанола) из витаминных сборов №1 и №2 проводили по модифицированной методике на рН-метре [61, 64].

Методика. В мерный стакан с помощью пипетки отмеряют 25 мл водного извлечения, опускают стеклянный электрод, присоединенный к соответствующему входу на рН-метре. Титруют 0,1 М раствора натрия гидроксида из микробюретки при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Фиксируют показания рН-метра и по полученным результатам строят кривые титрования в координатах $pH=f(V_{NaOH})$ для

определения точки эквивалентности (кривые потенциометрического титрования представлены на рисунках 7.1А, 7.2А).

Также для более точного определения конечной точки титрования были построены дифференциальные кривые в координатах $pH=f(dV/dpH)$, определен эквивалентный объем (дифференциальные кривые титрования представлены на рисунках 7.1Б, 7.2Б).

Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в процентах (X) в настойках из витаминных сборов вычисляли по формуле:

$$X(\text{мг/мл}) = \frac{V_T \cdot 0.0067 \cdot K \cdot 1000}{V_a}$$

где 0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующей 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах;

V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, мл;

K – поправочный коэффициент;

V_a – объем настойки, взятый на титрование, мл;

Результаты количественного определения представлены в таблице 7.3 и рисунках 7.3 и 7.4.

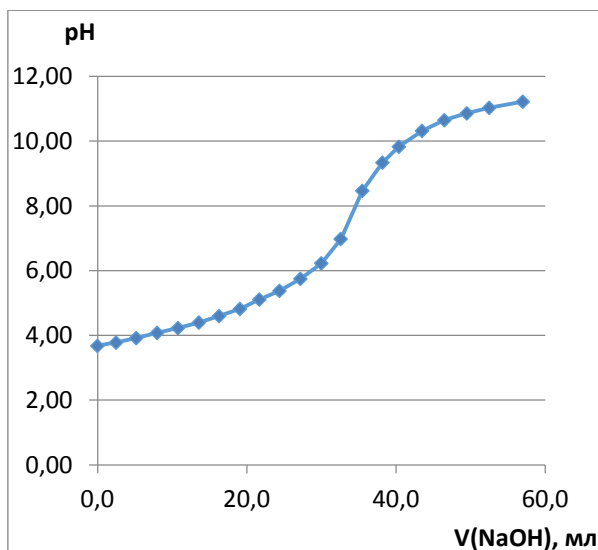


Рис. 7.1А. Интегральная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот раствором натрия гидроксида в 40% настойках из витаминного сбора №1

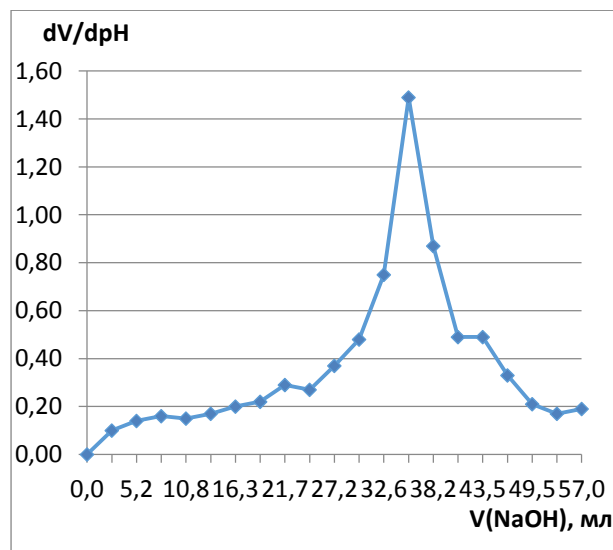


Рис. 7.1Б. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот раствором натрия гидроксида в 40% настойках из витаминного сбора №1

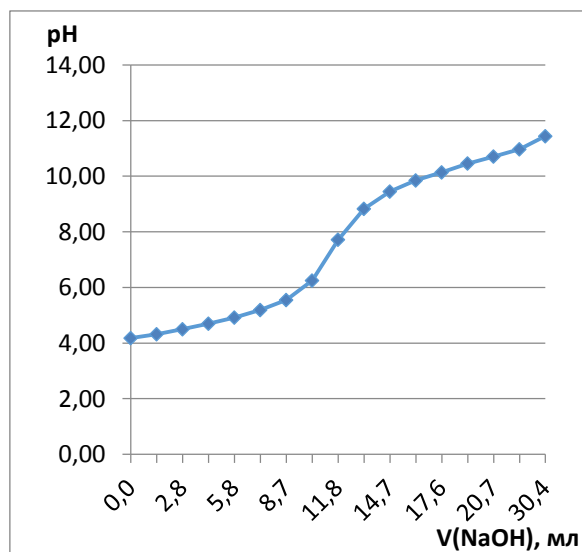


Рис. 7.2А. Интегральная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот раствором натрия гидроксида в 40% настойках из витаминного сбора №2

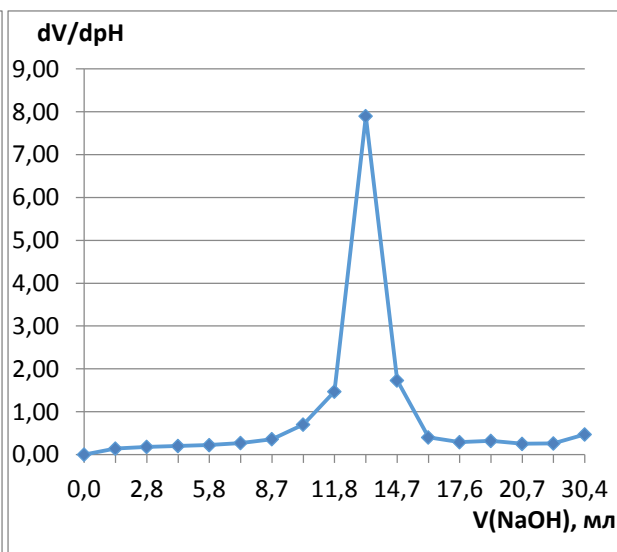


Рис. 7.2Б. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования суммы органических кислот раствором натрия гидроксида в 40% настойках из витаминного сбора №2

В связи с тем, что потенциометрическая индикация к.т.т. показала более точные результаты в анализе окрашенных извлечений, было решено использовать этот метод для определения содержания органических кислот в настойках из витаминных сборов №1 и №2.

Таблица 7.3

Содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в настойках из витаминных сборов №1 и 2, установленное потенциометрическим титрованием

n=5; p=0,95

ЛРС	Концентрация этанола, %	Содержание суммы органических кислот в настойках, мг/мл
Витаминный сбор №1	70	5,15±0,03
	50	7,50±0,04
	40	11,23±0,03
Витаминный сбор №2	70	3,11±0,03
	50	3,50±0,04
	40	4,17±0,04

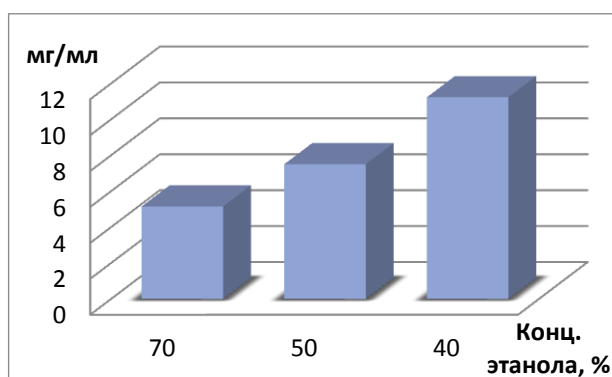


Рис.7.3. Содержание суммы органических кислот в настойках из витаминного сбора №1

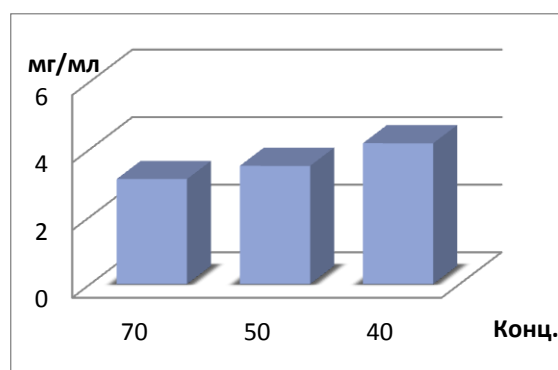


Рис.7.4. Содержание суммы органических кислот в настойках из витаминного сбора №2

В ходе исследования было установлено, что при концентрации этанола 40% экстрагируется наибольшее количество свободных органических кислот. Была показана возможность применения потенциометрического титрования для стандартизации настоек, полученных из витаминных сборов №1 и №2 по содержанию органических кислот.

7.3.2. Количественное определение кислоты аскорбиновой

Для определения содержания кислоты аскорбиновой в настойках из витаминных сборов №1 и №2, полученных на 70, 50, 40% этиловом спирте, применяли титриметрический метод со смесью индикаторов по методике, представленной в частной фармакопейной статье 38 «Плоды шиповника» ГФ XI изд., вып. 2.

Методика. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл настойки, 1 мл 2% раствора хлористоводородной кислоты, 13 мл воды, перемешивают и титруют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30-60 с. Титрование продолжают не более 2 мин. В случае интенсивного окрашивания фильтрата или высоко содержания в нем аскорбиновой кислоты (расход раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) более 2 мл), обнаруженного пробным титрованием, исходное извлечение разбавляют водой в 2 раза или более.

Содержание аскорбиновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X(\text{мг/мл}) = \frac{V_{\text{т}} \cdot 0,000088 \cdot 1000}{V_{\text{а}}}$$

где 0,000088 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), г;

V — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, мл;

V_а — объем настойки, взятой на титрование, мл.

Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты в витаминных сборах №1 и №2 представлены в таблице 7.4 и на рисунках 7.5 и 7.6.

Таблица 7.4

Содержание суммы кислоты аскорбиновой в настойках из витаминных сборов №1 и 2

n=5; p=0,95

Настойка	Концентрация этанола, %	Содержание кислоты аскорбиновой, мг/мл
Витаминный сбор №1	40	0,24±0,01
	50	0,17±0,02
	70	0,13±0,02
Витаминный сбор №2	40	0,11±0,01
	50	0,15±0,01
	70	0,08±0,02

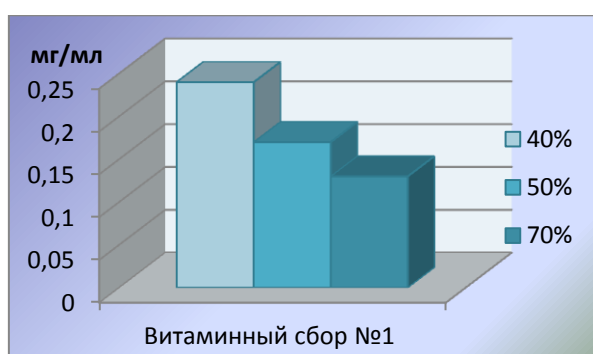


Рис.7.5. Содержание кислоты аскорбиновой в настойках из витаминного сбора №1

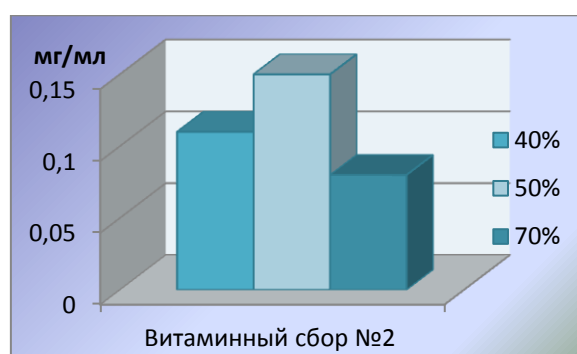


Рис.7.6. Содержание кислоты аскорбиновой в настойках из витаминного сбора №2

В ходе исследования было установлено наибольшее содержание кислоты аскорбиновой в настойке витаминного сбора №1, при экстракции 40% этанолом, в настойке витаминного сбора №2, при экстракции 50% этанолом.

7.3.3. Количественное определение дубильных веществ

Определение содержания дубильных веществ в настойках из витаминных сборов №1 и №2 (с концентрацией этилового спирта 70, 50, 40%) проводили по модифицированной методике в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [61, 64].

Полученные данные представлены в таблице 7.5 и на рисунках 7.7 и 7.8.

Таблица 7.5

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в настойках из витаминных сборов №1 и 2, установленное индикаторным титрованием

n=5; p=0,95

Объект исследования	Концентрация этанола, %	Содержание суммы дубильных веществ в настойках, мг/мл
Витаминный сбор №1	70	1,89±0,09
	50	2,81±0,03
	40	4,15±0,05
Витаминный сбор №2	70	3,78±0,03
	50	3,16±0,04
	40	3,56±0,07



Рис.7.7. Содержание суммы дубильных веществ в настойках из витаминного сбора №1

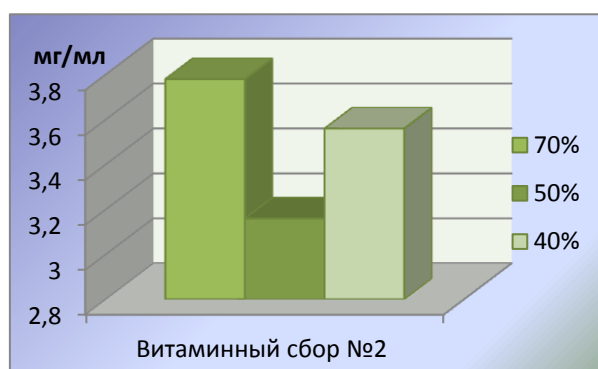


Рис.7.8. Содержание суммы дубильных веществ в настойках из витаминного сбора №2

В ходе исследования было установлено, что оптимальная концентрация этанола для экстракции суммы дубильных веществ составляет 40%. В настойки переходит в среднем в 3 раза больше дубильных веществ, нежели в настои. В связи с существенным содержанием дубильных веществ в настойках можно рассматривать этот показатель для стандартизации этой лекарственной формы.

7.3.4. Определение содержания флавоноидов

Анализ флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии, согласно методу, описанному в ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях. Извлечение готовили согласно методики, описанной в главе 3.4.4 [63]. Анализ содержания флавоноидов проводили на спектрофотометре «Lambda-950» Perkin Elmer, США.

Аликвоту настойки 40%, равную 5 мл помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 8 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 %, 5 мл спиртового раствора алюминия хлорида с концентрацией 2% и доводили объем до метки 95% спиртом этиловым. Через 40 мин снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 350-700 нм на фоне раствора сравнения. Параллельно измеряли оптическую плотность комплексов рутина с алюминия хлоридом.

Приготовление раствора сравнения: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 8 мл раствора А, добавляли 5 мл уксусной кислоты с концентрацией 30 % и доводили объем до метки 95% спиртом этиловым.

Анализ длин волн, соответствующих максимумам поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом и комплексов стандартных образцов флавоноидов с алюминия хлоридом, позволяет проводить пересчет суммы флавоноидов в настойках витаминных сборов №1 и №2 на рутин (рис. 7.9 и 7.10).

Получение комплексов стандартных образцов флавоноидов с алюминия хлоридом. Около 0,05 г (точная навеска) предварительно высушенного до постоянной массы ГСО рутина растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл в 95% спирте этиловым (раствор Б). Аликвоту раствора Б, равную 1 мл, помещали в мерную колбу объемом 25 мл, добавляли 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной 30% и доводили до метки 96% спиртом этиловым. В качестве раствора сравнения использовали 1 мл раствора Б и 0,5 мл кислоты уксусной 30%, которые разбавляли 96%

спиртом этиловым в мерной колбе вместимостью 25 мл.

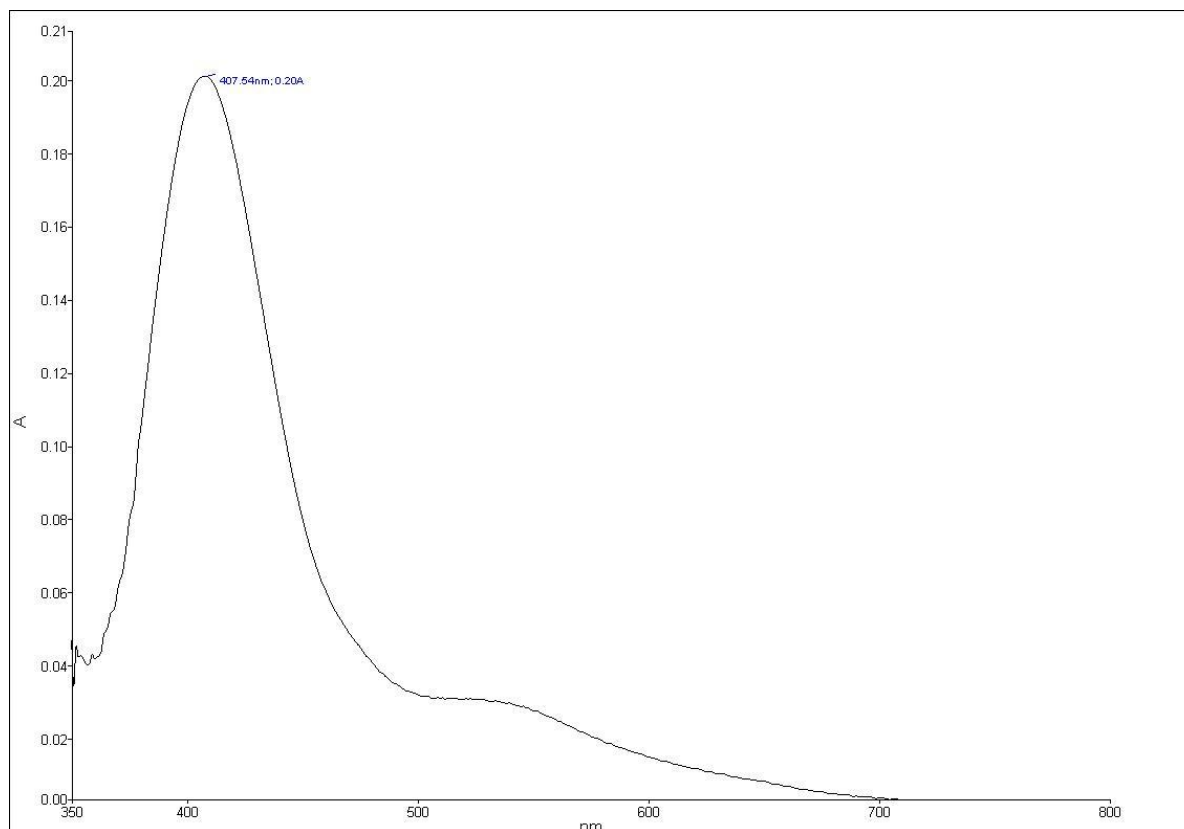


Рис.7.9. Абсорбционный дифференциальный спектр флавоноидов 40% настойки на основе витаминного сбора №1 с алюминия хлоридом

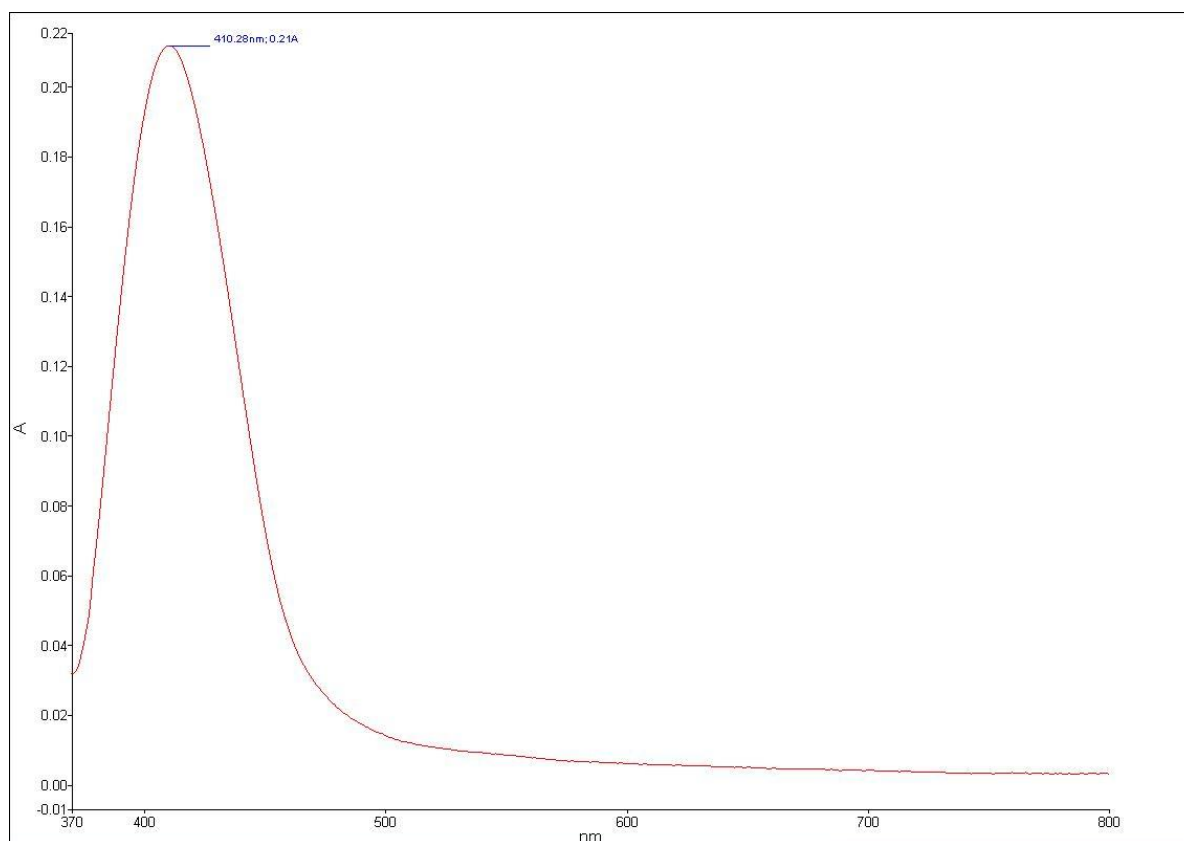


Рис.7.10. Абсорбционный дифференциальный спектр флавоноидов 40% настойки на основе витаминного сбора №2 с алюминия хлоридом

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин вычисляли по формуле:

$$X(\%) = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot V_a \cdot 100}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

V_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца;

m - масса навески сырья, г;

V_a – аликвота анализируемого раствора, мл;

W - потеря сырья в массе при высушивании, %.

Таблица 7.6

Содержание флавоноидов в витаминных сборах в пересчете на абсолютно сухое сырье

n=5; p=0,95

Объект исследования	Содержание флавоноидов, %
Витаминный сбор №1	0,119±0,001
Витаминный сбор №2	0,125±0,002

7.4. Определение токсичности, противомикробной и антимикотической активности настоев и настоек из витаминных сборов №1 и №2

Определение противомикробной и антимикотической активности настоев и настоек

В настоящее время для лечения бактериальных инфекций используют антибиотики, применение которых сопряжено с широким спектром побочных эффектов, ограничением применения у детей и беременных. Решением проблемы повышения эффективности лечения бактериальных инфекций может стать применение средств на основе растительных БАВ. Часто БАВ комплексно влияют на патологию, устраняя не один, а сразу несколько симптомов, например, оказывают дополнительно противовоспалительное, витаминное, иммуномодулирующее действие [180]. Растительные средства, богатые различными группами противомикробных соединений, в меньшей мере не позволяют бактериям приобрести

резистентность, так как фармакологическую активность имеет не одно соединение, а их комплекс, потенцирующий действие основных компонентов.

Авторами было установлено, что настойки на основе витаминных сборов №1 и №2 содержат фенольные соединения, для которых известны антимикробные свойства.

При изучении антимикробной и антимикотической активности [156, 157, 216] препаратов на основе витаминных сборов № 1 и № 2 использовали штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и дрожжевых грибов *Candida albicans*. Посев производили «газоном». Антимикробную и антимикотическую активность растительных препаратов определяли методом Кирби-Бауэра, диффузией пропитанных препаратами дисков фильтровальной бумаги в твердые питательные среды.

Определение антимикробной активности настоев и настоек витаминных сборов № 1 и № 2, в отношении штамма *Staphylococcus aureus*, осуществляли по следующей методике. На пластину мясопептонного агара толщиной 5 мм с помощью шпателя высевали «газоном» штамм *Staphylococcus aureus*, затем диффундировали в агар диски, пропитанные настояками с различной концентрацией экстрагента. По такому же принципу диффундировали в агар диски, пропитанные настоями витаминных сборов. В качестве сравнения на агар с этой же культурой микроорганизмов помещали диски, пропитанные антибиотиком бензилпенициллином.

Антимикробную активность препаратов на основе витаминных сборов, в отношении штамма *Escherichia coli*, определяли на твердой питательной среде «Эндо». На пластину «Эндо» толщиной 5 мм с помощью шпателя высевали «газоном» штамм *Escherichia coli*, затем диффундировали в агар диски, пропитанные настояками с различной концентрацией экстрагента, и диски, пропитанные настоями витаминных сборов № 1 и № 2.

Антимикотическую активность анализируемых фитопрепаратов, в отношении штамма *Candida albicans*, определяли на твердой питательной

среде «Сабуро». Для этого на пластину среды «Сабуро» толщиной 5 мм с помощью шпателя высевали «газоном» *Candida albicans*, затем помещали в среду диски, пропитанные настойками с различной концентрацией экстрагента. Также диффундировали диски, пропитанные настоями витаминных сборов.

Чашки Петри со средами ставили в термостат при температуре 37 °С. Через 24 часа определяли антимикробную и антимикотическую активность по зоне задержки роста тест- культур в миллиметрах. Единицы действия (ЕД) анализируемых настоев и настоек в пересчете на бензилпенициллин определяли по калибровочному графику действия бензилпенициллина на *Staphylococcus aureus*, на котором по оси абсцисс отмечали диаметр зоны задержки роста микроорганизмов, по оси ординат - единицы действия бензилпенициллина (табл. 7.7).

В качестве сравнения была установлена ингибирующая активность экстрагента, спирта этилового разной концентрации, в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Escherichia coli* (табл. 7.10).

Экспериментально было установлено [56], что настои и предлагаемые нами настойки на основе витаминных сборов № 1 и № 2 обладают ингибирующей активностью по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Данные по антимикробной и антимикотической активности представлены в таблицах 7.7 и 7.8, соответственно.

Таблица 7.7

Антимикробная активность препаратов витаминных сборов по отношению к штамму *Staphylococcus aureus*

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>St. aur.</i> , мм	ЕД настойки, в пересчете на бензилпенициллин
Витаминный сбор №1	настой	15	375
	настойка 40 %	15	375
	настойка 50 %	15	375
	настойка 70 %	15	375
Витаминный сбор №2	настой	12	280
	настойка 40 %	12	280
	настойка 50 %	12	280
	настойка 70 %	12	280

Таблица 7.8

Антимикотическая активность препаратов витаминных сборов по отношению к штамму *Candida albicans*

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>C. alb.</i> , мм
Витаминный сбор № 1	настой	9
	настойка 40 %	9
	настойка 50 %	10
	настойка 70 %	10
Витаминный сбор № 2	настой	9
	настойка 40 %	9
	настойка 50 %	10
	настойка 70 %	10

В ходе исследования было установлено, что водные и спиртовые извлечения сборов витаминных № 1 и № 2 оказывают антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и антимикотическую активность в отношении *Candida albicans*. Активность настоя и настоек витаминного сбора № 1 вне зависимости от концентрации спирта этилового в пересчете на бензилпенициллин составила 375 единиц действия. Активность настоя и настоек витаминного сбора № 2, также не зависела от концентрации спирта этилового и составила 280 единиц действия в пересчете на бензилпенициллин.

Таблица 7.9

Антимикробная активность препаратов витаминных сборов по отношению к штамму *Escherichia coli*

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>E.coli</i> , мм
Витаминный сбор №1	настой	0
	настойка 40 %	15
	настойка 50 %	16
	настойка 70 %	19
Витаминный сбор №2	настой	0
	настойка 40 %	15
	настойка 50 %	16
	настойка 70 %	19

В ходе эксперимента было установлено, что ингибирующие действие настоек витаминных сборов № 1 и № 2 по отношению к штамму *Escherichia coli* проявляется за счет действия этилового спирта. Этот вывод был сделан

на основе анализа зависимости увеличения диаметра зоны задержки роста микроорганизма с ростом концентрации спирта этилового. Данные представлены в таблицах 7.9 и 7.10.

Таблица 7.10

Ингибирующая активность экстрагента по отношению к штаммам тест-культур

Объект исследования	Концентрация	Зона задержки роста <i>St. aur.</i> , мм	Зона задержки роста <i>C. alb.</i> , мм	Зона задержки роста <i>E.coli</i> , мм
Спирт этиловый	40 %	7	6	10
	50 %	8	7	11
	70 %	8	7	13

Полученные данные подтверждают активность БАВ компонентов сборов витаминных против штаммов *St. aureus* и *C. albicans*. В отношении *Echerichia coli* ингибирующую активность проявляют только спиртовые извлечения, причем наблюдается прямая зависимость между диаметром зоны задержки роста микроорганизма и увеличением концентрации спирта этилового. Это позволяет сделать вывод о том, что задержка роста кишечной палочки обусловлена действием спирта этилового.

Определение токсичности водных извлечений

Определение токсичности в отношении штамма бактерий *Echerichia coli* проводили для водных извлечений. Для водно-спиртовых извлечений данное определение не проводили, поскольку, как видно из предыдущих исследований на антимикробную и антимикотическую активность, настойки токсичны по отношению к штамму *E. Coli* за счет экстрагента, этанола.

Определение токсичности настоев проводили в отношении штамма бактерий *Echerichia coli* по методу оценки токсичности показателей с помощью люминесцентного теста с использованием препарата «Эколюм» ТУ 6-09-20-236-01. Пробоподготовка для биотестирования на приборе «Биотокс-10М» проведена в условиях: моделируемая среда – дистиллированная вода, разведение не проводилось, температура – 37° С, экспозиция – 25 мин.

Методика. Для получения исходной суспензии биопрепарата вскрывали флакон с лиофилизированным биосенсором, добавляли 10 мл дистиллированной воды (рН=6,8–7,4). Выдерживали суспензию биопрепарата в течение 30 мин., периодически помешивая. Аликвоту 0,1 мл исходной суспензии помещали в кювету люминометра, добавляли 0,9 мл воды очищенной. Кювету помещали в прибор и фиксировали величину интенсивности биолюминесценции.

Затем 0,1 мл рабочей суспензии биосенсора добавляли в 3 контрольные и 3 рабочие кюветы. В контрольные кюветы добавляли по 0,9 мл воды очищенной, в рабочие кюветы добавляли по 0,9 мл анализируемого водного извлечения. Фиксировали время экспозиции и интенсивность биолюминесценции (табл.7.11).

Таблица 7.11

Исследования по определению токсичности настоев витаминных сборов

Определяемый показатель	Результат испытания	Величина допустимого уровня	НД на методы исследования
Общетоксическое действие определяемое in vivo	Отсутствие (индекс токсичности T=0)	Отсутствие (индекс токсичности T не более 20)	ГОСТ 32893-2014

Полученные данные подтверждают, что настои из витаминных сборов №1 и №2 в отношении бактерий *Echerichia coli* токсичностью не обладают, индекс токсичности T=0.

ВЫВОДЫ ИЗ ГЛАВЫ 7

1. Получены настойки из витаминных сборов №1 и №2 методом перколяции с различной концентрацией экстрагента 40% ,50% и 70%. Установлены их характеристики, такие как органолептические свойства и плотность настоек.
2. Показано, что оптимальная концентрация этанола для экстракции суммы свободных органических кислот, кислоты аскорбиновой и дубильных веществ составляет 40%. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот обнаруживается в настойке из витаминного сбора №1, по содержанию флавоноидов и дубильных веществ настойки отличаются незначительно.
3. Установлено количественное содержание суммы органических кислот, кислоты аскорбиновой, дубильных веществ и флавоноидов в настойках витаминных сборов №1 и №2, которое в среднем соответствует 7.7, 0.18, 3.86 и 0.122 соответственно.
4. Доказано, что настои и предлагаемые нами настойки на основе витаминных сборов № 1 и № 2 обладают ингибирующей активностью по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Установлено отсутствие ингибирующего действия настоек витаминных сборов № 1 и № 2 по отношению к штамму *Escherichia coli*.
5. При помощи прибора «Биотокс-М», было установлено, что настои из витаминных сборов не обладают токсичностью в отношении бактерий *Escherichia coli* (индекс токсичности T=0).

По результатам исследований (Главы 7) по изучению антимикробной и антимикотической активности было получено два патента РФ на изобретение (патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведены информационно-аналитические исследования по химическому составу компонентов витаминных сборов №1 и №2 и методов их качественного и количественного анализа.
2. Проведено углубленное морфолого-анатомическое изучение сборов и индивидуальных компонентов, показана возможность применения 3D-лазерного сканирующего микроскопа для изучения внешних признаков, и возможность диагностики лигнифицированных элементов с применением поляризованного света.
3. Методом ТСХ подтверждено присутствие в витаминных сборах и компонентах яблочной кислоты ($R_f=0,66$), лимонной кислоты ($R_f=0,1$) и кислоты аскорбиновой ($R_f=0,69$). Методом ВЭЖХ были установлены в качестве маркеров индивидуальные соединения органических кислот и флавоноидов. Разработана методика СФМ для идентификации плодов шиповника и витаминного сбора №1.
4. Установлено количественное содержание основных групп БАВ в витаминных сборах и компонентах: суммы органических кислот, кислоты аскорбиновой и дубильных веществ.
5. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы органических кислот методом потенциометрического титрования.
6. Разработаны методики и установлено содержание антоцианов, флавоноидов и каротиноидов в витаминных сборах и компонентах. Проведена валидация методики СФМ анализа на содержание суммы флавоноидов.
7. Изучен качественный и количественный состав водных (настои) и водно-спиртовых (настойки) извлечений витаминных сборов и их компонентов. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот обнаруживается в настойке из витаминного сбора №1, по содержанию флавоноидов и дубильных веществ настойки отличаются незначительно.

8. Разработаны и поданы в ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ России 3 проекта ФС: «Витаминный сбор №1» и «Витаминный сбор №2» и «Смородины черной плоды». По результатам исследования получено 3 патента на изобретения (патент № 2662059 от 28.12.2017, патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

Практические рекомендации. Подходы к анализу сборов, предложенные в диссертации могут быть использованы при изучении других дву- и многокомпонентных растительных препаратов. При правильном подборе значения pH повышается селективность реакции комплексообразования флавоноидов с $AlCl_3$.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанные и усовершенствованные методики количественного определения флавоноидов, антоцианов и каротиноидов могут быть применены для анализа препаратов, содержащих экстракты плодов шиповника, рябины и смородины. Результаты исследования настоек витаминных сборов могут стать предпосылкой для выпуска данной лекарственной формы.

Изучение токсичности, антимикробной и антимикотической активности в дальнейшем будет актуально в связи с развивающейся тенденцией поиска лекарственных препаратов, альтернативных антибиотикам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛРС – лекарственное растительное сырье

БАВ – биологически активные вещества

БАД – биологически активная добавка

ГФ – государственная фармакопея

НД – нормативный документ

ОФС – общая фармакопейная статья

ФС – фармакопейная статья

ФСП - фармакопейная статья предприятия

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором.

ГЖХ – газожидкостная хроматография

СО - стандартный образец

УФ - ультрафиолетовый

Rf – расстояние от линии старта до середины пятна, отнесенное к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулин, И.Ф. Потенциометрическое определение аскорбиновой кислоты. Оценка ее вклада в интегральную антиоксидантную способность растительного материала / И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Зиятдинова [и др.] // Журнал аналитической химии, 2002. – Т. 52. – №4. – С. 418-421.
2. Абдуллина, С.Г. Кулонометрический анализ лекарственных средств и лекарственного растительного сырья / С.Г. Абдуллина, О.А. Ли́ра, Н.М. Агапова [и др.] // Фармация. - 2014. - № 3. – С. 3-5.
3. Абдуллина, С.Г. Кулонометрическое определение содержания суммы органических кислот в плодах шиповника / С.Г. Абдуллина, О.А. Ли́ра, Р.Ш. Хазиев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45. – №5. – С.25-27.
4. Аврач, А. С. Изучение состава органических кислот плодов рябины обыкновенной различными способами консервации / А.С. Аврач, И.А. Самылина, Е.В. Сергунова // Сборник научных трудов научно-методической конференции «II Гаммермановские чтения». – Спб., 2014. – С. 14 – 15.
5. Аврач, А.С. Сравнительное изучение биологически активных веществ плодов (боярышника, рябины, шиповника, малины) различными способами консервации и лекарственных препаратов на их основе: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Александра Сергеевна Аврач; Первый МГМУ им. Сеченова. – М., 2015. – 145 с.
6. Агапова, Н.М. Кулонометрическое определение содержания аскорбиновой кислоты в плодах шиповника / Н.М. Агапова, С.Г. Абдуллина, Р.Ш. Хазиев // Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI Веке». – 2010. – Т.12. – №2.
7. Аксенова, Э.Н. Фармацевтический анализ препаратов из группы водорастворимых витаминов современными физико-химическими методами: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. / Э.Н. Аксенова. – М., 1969. – 23 с.
8. Аладышева, Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляев, В.А. Береговых // Фармация. – 2008. – №7. – С. 9-13.
9. Альмяшева, Н.Р. Антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов и этанольных экстрактов мицелия ксилотрофных базидиальных грибов / Н.Р. Альмяшева, М.С. Ярина, А.В. Голышкин [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – № 7-8. – С. 8-12.
10. Антоцианы Белгородской флоры – для профилактики ретинопатии / Саенко И.И. [и др.] // «Современный наукоемкие лечебные и фармацевтические технологии для офтальмологии» для молодых

ученых/Сборник материалов Всероссийской школы-семинара. – 2009. – Т. 2009. – С. 114.

11. Асташкина, А.П. Микроскопические исследования частиц в лекарственных субстанциях: учебное пособие / А.П. Асташкина, Е.В. Плотников, Т.М. Гиндуллина. – Издательство Томского политехнического университета, 2015.
12. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР [отв. ред. П.С. Чиков]. – М., 1976. – 248 с.
13. Ахмедов, Р.Б. Растения – твои друзья и недруги / Р.Б. Ахмедов. – Китап, Уфа, – 2006. – 313 с.
14. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. – М.: Наука, 1965. – 176 с.
15. Бакин, И.А. Изучение химического состава ягод черной смородины в процессе переработки / И.А. Бакин, А.С. Мустафина, П.Н. Лунин // Вестник КрасГАУ. – 2015. – №6. – С.159-162.
16. Барашков, Г.К. Основы медицинской бионеорганики / Г.К. Барашков. – М.: Издательство «ЧеРо», 2007. – 516 с.
17. Белоногова, В.Д. Изучение компонентного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае / В.Д. Белоногова, И.В. Коротков, П.С. Мащенко [и др.] // Фармация. - 2015. - № 6. - С. 14-16.
18. Березовская, Н.Н. Влияние биофлавоноидов на ферментативное окисление аскорбиновой кислоты и адреналина в животных тканях / Н.Н. Березовская // Биохимия. – 1964. – Т. 29. – № 1. – С. 30.
19. Березовская, Н.Н. Витамины / Под ред. МИ Смирнова // М.: Медицина, 1974. – 495 с.
20. Березовский, В.М. Химия витаминов / В.М. Березовский. – М.: Пищепромиздат, 1973. – 631 с.
21. Беседнова, Н.Н. Антивирусное действие и патогенетические мишени сульфатированных полисахаридов морских водорослей при герпесвирусных инфекциях / Н.Н. Беседнова, И.Д. Макаренкова, Т.Н. Звягинцева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2016. – № 3. – С. 217-227.
22. Биологически активные вещества, входящие в состав лекарственного растительного сырья / И.М. Коренская [и др.]. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр ВГУ, 2010. – 66 с.
23. Бобкова, Н.В. Изучение влияния измельченности на анатомо-диагностические признаки лекарственного растительного сырья / Н.В. Бобкова, В.А. Ермакова, И.А. Самылина // Фармация на современном этапе, проблемы и достижения: научные труды ВНИИФ. – М., 2000. – Т. XXXIX. – Ч. 2. – С. 204-209.

24. Бобкова, Н.В. Исследования по контролю качества растительных порошков в лекарственных средствах: дисс. ...канд. фарм. наук: 15.00.02 / Бобкова Наталья Владимировна. – Москва, 1998. – 300 с.
25. Ботанико-фармакогностический словарь: справ. пособие / под ред. К.Ф. Блиновой. – М.: Высш. шк., 1990. – 272 с.
26. Вадова, В.А. Об изменчивости химического состава шиповника / В.А. Вадова, В.Н. Меньшиков, М.В. Янишевская // Витамины в теории и практике. – Л.: Медицина. – 1941. – С. 119-121.
27. Валиева Н.Г. Лекарственные растения – источник биологически активных веществ // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2010. - Т. 203. - С. 44-48.
28. Вальшев, А.В. Антимикробная активность пектинов и их производных / А. В. Вальшев // Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН. - 2013. - № 3. - С. 1-6.
29. Витаминный сбор №2: ФСП 42-0426382103 ЗАО «Техмедсервис». – Введ. 2004-05-25.
30. Вишневский, О.В. К вопросу разработки методов определения качества настоев и отваров в условиях межбольничных аптек / О.В. Вишневский, Н.Л. Флейн, Д.В. Прошунина // Тезисы докладов 5-го съезда фармацевтов БССР. – Ч. 1. – Минск. – 1989. – С. 188-189.
31. Галимова, Д. Ф. Изучение полифенольных соединений рябины обыкновенной флоры Башкортостана / Д. Ф. Галимова, Г. М. Латыпова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5(3). – С. 33 – 35.
32. Галимова, Д.Ф. Изучение состава органических кислот рябины обыкновенной флоры Башкортостана / Д.Ф. Галимова [и др.] // Традиционная медицина. – 2011. – № 5(28). – С. 177 – 180.
33. Гаммерман, А.Ф. Курс фармакогнозии: учебник / А.Ф. Гаммерман. – Л.: Медицина, 1967. – 729 с.
34. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. - Новосибирск: Наука, 1990. – 156 с.
35. Голубева, И.С. Количественная характеристика анатомо-диагностических признаков корней алтея / И.С. Голубева, О.Г. Потанина, А.А. Сорокина // Фармация. - 2008. - № 3. - С. - 25-26.
36. ГОСТ 21450-75. Плоды черной смородины. - Введ. 1977-07-01. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 1977. – 3 с.
37. ГОСТ 32771-2014. Продукция соковая. Определение органических кислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. - Введ. 2016-01-01. – М.: Стандартинформ, 2014. – 3 с.

38. Гостищев, А.И. Каротиноиды, хлорогеновые кислоты и другие природные соединения плодов рябины / А. И. Гостищев [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. – 2010. - № 3(74), вып. 10. – С. 83 – 92.
39. Государственная фармакопея РФ XIII издания. Минздрав РФ. М., 2015. [Офиц. сайт]. URL: <http://www.femb.ru/feml>.
40. Государственная фармакопея СССР. X-е изд. М.: Медицина, 1968. - 1078с.
41. Государственная фармакопея СССР: Вып.1 / МЗ СССР. XI-е изд. М.: Медицина, 1968. - 1078 с.
42. Государственная фармакопея СССР: Вып.2 / МЗ СССР. XI-е изд. М.: Медицина, 1968. - 1065 с.
43. Государственный реестр лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению. Минздрав РФ. М., 2018. [Офиц. сайт]. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
44. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронович. – М.: Высш. шк., 1983. – 133 с.
45. Гринько, Е.Н. Изучение вариабельности диагностических признаков корневищ бадана (*Rhizomata bergeniae*) при измельчении / Е.Н. Гринько. – Здоровье и образование в XXI веке. – 2010. - № 1. – Т. 12. – С. 79-81.
46. Губен-Вейль. Методы органической химии, Т. 2 / Губен-Вейль. – М.: Химия, 1967. – 1032 с.
47. Гуляев, Д.К. Водорастворимые полисахариды корней ели сибирской / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, И.П. Рудакова // Фармация. – 2017. – № 7. – С. 39-41.
48. Гуляев, Д.К. Изучение противовоспалительной активности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, Н.В. Лялина, И.П. Рудакова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - № 6. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19958>.
49. Гуляев, Д.К. Состав и биологическая активность полисахаридов побегов и листьев малины обыкновенной (*Rubusidaeus L.*) / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, И.П. Рудакова // Традиционная медицина. – 2017. – № 4. – С. 39-42.
50. Даванков, В.А. Лигандообменная хроматография / В.А. Даванков, Дж. Навратил, Х. Уолтан. – М: Мир, 1989. – 296 с.
51. Дэгли, С. Метаболические пути / С. Дэгли, Д. Никольсон; пер. с англ. – М.: Мир, 1973. – 312 с.

52. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пастушьей сумки / О.В. Евдокимова // Традиционная медицина. – 2011. – № 1 (24). – С. 50–53.
53. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного содержания свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в плодах рябины / О.В. Евдокимова // Достижения, проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики: Материалы региональной научно-практической конференции, посвященной 40-летию фармацевтического факультета КГМУ/ Под ред. А.И. Лазарева. - Курск: КГМУ, 2006. - 496 с. - С. 205-207.
54. Егорова, А.В. Анатомо-морфологическое исследование плодов *Ribes nigrum* (*Grossulariaceae*) / А.В. Егорова, В.А. Куркин, Г.Н. Суворова [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – Т. 12. – № 1(18). – С. 2027-2031.
55. Ермакова, В.А. Фармакогностическое изучение и стандартизация сборов, брикетов и растительных порошков: дис. ... док. фарм. наук. : 15.00.02 / Валентина Алексеевна Ермакова; ММА им. И.М. Сеченова. – М., 1999. – 313 с.
56. Жилкина, В.Ю. Изучение антимикробной и антимикотической активности витаминных сборов и препаратов на их основе / В.Ю. Жилкина, Н.П. Сачивкина, А.И. Марахова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. – С. 124 – 131.
57. Жилкина, В.Ю. Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в сборе витаминном / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №1(14). – С. 156 – 159.
58. Жилкина, В.Ю. Изучение качественного и количественного содержания биологически активных веществ в витаминном сборе крапивы и рябины (обзорная статья) / В.Ю. Жилкина, И.А. Ефимова, А.И. Марахова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №2(19). – С. 108 – 115.
59. Жилкина, В.Ю. Исследования по стандартизации витаминных сборов из лекарственного растительного сырья: тезисы научно-практической конференции «Лекарственные растения ботанического сада», посвященной 70-летию Ботанического сада Первого МГМУ имени И.М. Сеченова / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // Издательство Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. – М., 2016. – С. 44 – 46.
60. Жилкина, В.Ю. Количественное определение дубильных веществ в витаминных сборах: тезисы IV Международной научно-практической конференции «Научно-технический прогресс: актуальные и

перспективные направления будущего» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Кемерово. – 2016. – Т.2. – С. 93 – 94.

61. Жилкина, В.Ю. Получение настоек из витаминных сборов и исследования по их стандартизации: тезисы V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский [и др.] // Москва. – 2017. – С. 78 – 81.
62. Жилкина, В.Ю. Применение титриметрических методов для стандартизации витаминных сборов и препаратов, получаемых из них: материалы XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Москва. – 2017. – С. 95 – 96.
63. Жилкина, В.Ю. Содержание флавоноидов в витаминных сборах / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, А.А. Сорокина [и др.] // Фармация. – 2018. – т.67. – №1. – С.14-18.
64. Жилкина, В.Ю. Стандартизация настоек из витаминных сборов по основным группам действующих веществ: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения химии и химической технологии растительного сырья» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Барнаул. – 2017. – С. 255 – 257.
65. Зеликсон, Ю.И. Изготовление настоев и отваров / Ю.И. Зеликсон, Т.С. Кондратьев // Фармация. - 1997. - Т. 46. - № 6. - С. 42-43.
66. Злобин, А. А. Общая химическая характеристика водорастворимых полисахаридов плодов шиповника морщинистого *Rosa Rugosa* / А.А. Злобин, Р.Г. Оводова, С.В. Попов // Химия растительного сырья. – 2003. – № 2. – С. 39 – 44.
67. Злобин, А.А. Пектиновые полисахариды рябины обыкновенной *Sorbus aucuparia* L. / А.А. Злобин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2011. – № 1. – С. 39 – 44.
68. Зологина, В.Г. Технология комплексной переработки плодов рябины обыкновенной: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 05.21.03 / Зологина Вероника Геннадьевна. – Красноярск, 2005. – 23 с.
69. Иванова, С.В. Микроэлементный состав плодов рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.) / С.В. Иванова, О.В. Шелепова, Е.Б. Кириченко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2005. - № 2. - С. 9-10.
70. Игнатьев, Б.Д. Шиповник и его использование / Б.Д. Игнатьев. – Новосибирск: Наука, 1964. – 322 с.
71. Исламова, Ж.И. Сравнительная оценка пребиотической активности некоторых пектиновых полисахаридов / Ж.И. Исламова, Д.К. Огай, О.И.

- Абраменко [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – № 4. – С. 41-44.
72. Карпова, Е.А. Флавоноиды и аскорбиновая кислота у некоторых представителей рода *Begonia* L. / Е.А. Карпова, Е.П. Храмова, Т.Д. Фершалова // Химия растительного сырья. - 2009. - № 2. - С. 105–110.
73. Кемертелидзе, Э.П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения / Э.П. Кемертелидзе, В.П. Георгиевский // Тбилиси: Мецниереба. - 1976. - С. 224-227.
74. Киселева, Т. А. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах боярышника / Т. А. Киселева, И. А. Самылина // Фармация. – 1987. – Т. 36. - №5. – С. 30 – 32.
75. Колпакова, М.В. К вопросу пересмотра фармакопейной статьи «настои и отвары» / М.В. Колпакова, Е.А. Приступа, Д.М. Попов // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Научные труды НИИФ. - Т. XXXVIII. - Ч.1. М. – 1999. - С. 206-217.
76. Кольцова, М.А. Содержание микроэлементов в плодах различных видов рябины / М.А. Кольцова // Биологический журнал Армении. — 1980.— Т. 33.— № 1.— С. 95–99.
77. Кондрашова, М.Н. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращения янтарной кислоты / М.Н.Кондрашова, Е.И. Маевский, Г.В. Бабаян [и др.] // Митохондрии. Биохимия и ультраструктура, 1973. – С. 112-129.
78. Коренская, И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырьё, содержащие витамины, полисахариды, жирные масла: учеб.-метод. пособ. для сам. раб. студентов фарм. фак-та / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, О.А. Колосова // ИПЦ Воронежского государственного университета, 2008. – 88 с.
79. Курегян, А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов / А.Г. Курегян // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2 (часть 23) – С. 5166-5172.
80. Куркин, В.А. Определение флавоноидов в траве чистотела большого / В.А. Куркин, Е.С. Артамонова // Фармация. - 2007. - № 5. - С. 10-12.
81. Куркина, А.В. Методика определения суммы флавоноидов в цветках пижмы / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // Фармация. - 2010. – № 3. – С. 21-24.
82. Куркина, А.В. Перспективные направления в области стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды / А.В. Куркина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов 67-ой

- межрегиональной конференции по фармации и фармакологии. – Пятигорск, 2012. - Вып. 67. – С. 60-62.
83. Кушманова, О.Д. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / О.Д. Кушманова, Г.М. Ивченко. – М.: Медицина, 1974. – 424 с.
84. Кьосев, П.А. Полный справочник лекарственных растений / П.А. Кьосев. – М.: Эксмо-пресс, 2011. – 944с.
85. Ладыгина, Е.Я. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов. / Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова [и др.] – М.: Высш. Школа, 1983. – 176 с., ил.
86. Лежнева, Л.П. Фармакотехнические исследования по расширению области применения крапивы двудомной в медицине: автореферат дисс. ... канд. фарм. наук. : 15.00.02 / Лариса Петровна Лежнева; КГМУ АЗСР – Пятигорск, 1986. – 23 с.
87. Лекарственные растения государственной фармакопеи / под ред. И. А. Самылиной, В.А. Северцева. - М.: Анми, 2003.- 538 с.
88. Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты: учебное пособие: Часть I / В.Н. Тихонов, Г.И. Калинкина, Е.Н. Сальникова; под ред. проф. С.Е. Дмитрука. - Томск, 2004. – 116 с.
89. Лисовская, С.Б. Изучение флавоноидного состава водного извлечения травы мелиссы лекарственной методом ВЭЖХ / С.Б. Лисовская, А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский [и др.] // Современные вопросы теории и практики лекарствоведения: тезисы докладов. - Ярославль, 2007. - С. 191 - 193.
90. Листов, С.А. О содержании тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье / С.А. Листов, Н.В. Петров, А.П. Арзамасцев // Фармация. – 1990. - № 2. – С. 19 – 25.
91. Листов, С.А. Содержание тяжелых металлов в настоях и отварах из лекарственного растительного сырья / С.А. Листов, Г.А. Непесов, Э.С. Сахатов // Фармация. – 1992. - № 4. – С. 37 – 41.
92. Lupinskaya, S.M. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе / С.М. Lupinskaya, С.В. Орехова, О.Г. Васильева // Химия растительного сырья. - 2010. - № 3. – С. 143-145.
93. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. — М.: Химия, 1971. - 367 с.
94. Мазнев, Н.И. Энциклопедия лекарственных растений / Н.И. Мазнев. – М.: Мартин, 2004. - 496 с.

95. Марахова, А.И. Потенциометрия в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / А.И. Марахова // Фармация. - 2013. - № 3. - С. 53-55.
96. Марахова, А.И. Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в сборах витаминных разными физико-химическими методами / А.И. Марахова, В.Ю. Жилкина, Е.В. Сергунова [и др.] // Известия академии наук. Серия химическая. – М., 2016. - № 11. – С. 2779 - 2782.
97. Марахова, А.И. Методологические аспекты разработки методик количественного анализа при стандартизации лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова // Успехи современного естествознания. - 2015. - № 11 (1). - С. 58-61.
98. Марахова, А.И. Определение флавоноидов травы мелиссы лекарственной / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина // Фармация. - 2007. - № 3. - С. 10-11.
99. Марахова, А.И. Разработка методики потенциометрического определения суммы органических кислот в плодах шиповника / А.И. Марахова, О.А. Супакова, Н.Н. Федоровский [и др.] // Фармация. - 2013. - № 1. - С. 24 - 27.
100. Марахова, А.И. Теоретические и экспериментальные подходы к разработке спектрофотометрических методик анализа фенольных соединений в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе / А.И. Марахова // Известия академии наук. Серия химическая. - 2015. - № 6.- С. 1251-1254.
101. Марахова, А.И. Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе: монография / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, В.Ю. Жилкина. – М.: Типография «Ваш формат», 2017. – 308 с.
102. Маркова, О.М. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения / О.М. Маркова, В.А. Карпенко, А.С. Саушкина [и др.] // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. - 2003. - № 1. - С. 99-100.
103. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: т. 1. –14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна, 2000. – Т. 1. – 540 с.
104. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 560 с.
105. Муравьева, Д.А. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего / Д.А. Муравьева, В.Н. Бубенчикова, В.В. Беликов // Фармакология. - 1987. - Т. 36. - С. 28-29.

106. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / под ред. В.Л. Багировой, В.А. Северцева. – СПб.: Спец Лит, 2001. – 223 с.
107. Новрузов, А.П. Содержание и динамика накопления аскорбиновой кислоты в плодах *ROSA CANINA L.* / А.П. Новрузов // Химия растительного сырья. - 2014. - №3. - С. 221–226.
108. Носаль, М.А. Лекарственные растения и способы их применения в народе / М.А. Носаль, И.М. Носаль. – Л.: Наука, 1991. - 162 с.
109. Олейников, Д.И. Методика количественного определения суммарного содержания органических кислот в растительном сырье / Д.И. Олейников, Л.М. Танхаева, Г.Г. Николаева [и др.] // Растительные ресурсы. - 2004. - №3. — С. 112.
110. Определение аскорбиновой кислоты, тиамин, рибофлавина, никотинамида и пиридоксина в лекарственном препарате «Гексавит» методом ВЭЖХ / С.Ю. Гармонов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2011. - Т. 45. - № 7. - С. 48-51.
111. Определение органических кислот в плодах рябины обыкновенной / Абдуллина С.Г. [и др.] // Фармация. - 2011. - Т. №2. – С. 17-19.
112. Орлов, В.И. Жидкостная хроматография. Теоретические основы / В.И. Орлов, А.А. Аратсков. - Дзержинск: Научно-технологическая компания Синтеко, 1997. - 41 с.
113. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / под ред. проф. Береговых В.В. – М.: Издательский дом Русский врач, 2005. – С. 73–97.
114. Остроумов, Л.А. Исследование химического состава плодов рябины обыкновенной (*Sorbus Aucuparia*), произрастающей в Кемеровской области / Л.А. Остроумов, О.В. Кригер, К.В. Карчин [и др.] // Техника и технология пищевых производств. - 2014. - № 4. – С. 38 - 42.
115. Патудин, А.В. Гомеопатические лекарственные средства, разрешенные в Российской Федерации для применения в здравоохранении и ветеринарии. 6е издание, исправленное и дополненное / А.В. Патудин, В.С. Мищенко, Л.И. Ильенко [и др.]. – М.: Знак, 2011. – 352 с.
116. Пектиновые полисахариды рябины обыкновенной *Sorbus aucuparia L.* / А.А. Злобин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2011. – № 1. – С. 39 – 44.
117. Петрова, С.Н. Состав плодов и листьев смородины черной *ribes nigrum* (обзор) / С.Н. Петрова, А.А. Кузнецова // Химия растительного сырья. – 2014. - № 14. - С. 43-50.
118. Петрова, С.Н. Химический состав и антиоксидантные свойства видов рода *Rosa L.* / С.Н. Петрова, А.В. Ивкова // Химия растительного сырья. - 2014. - №2. - С. 13–19.

119. Писарев, Д.И. Изучение состава антоцианов ирги ольхолистной-*Amelanchier alnifolia* Nutt с использованием матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI) / Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Н.А. Писарева [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – Т. 16. – №. 22 (117).
120. Плешков, Б.П. Практикум по биохимии растений / Б.П. Плешков. – М.: Колос, 1976. – 256 с.
121. Позднякова, Т.А. Изучение каротиноидов травы астрагала белостебельного / Т.А. Позднякова, Р.А. Бубенчиков // Современная медицина: актуальные вопросы: сб. ст. по матер. LVIII междунар. науч.-практ. Конф. – Новосибирск: СибАК, 2016. - № 8(50). – С. 90-95.
122. Позняковский, В.М. Экспертиза свежих плодов и овощей. Качество и безопасность: учебно-справочное пособие / В.М. Позняковский, Т.В. Плотникова, Т.В. Ларина [и др.]. Сибирское университетское издательство, 2009. - 312 с.
123. Полюдек-Фабини, Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрил. – Л.: Химия, 1981. - 622 с.
124. Попова, Н.В. Лекарственные растения мировой флоры / Н.В. Попова, В.И. Литвененко. – Харьков, 2008. – 510 с.
125. Потанина, О.Г. К вопросу совершенствования стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него / О.Г. Потанина, И.А. Самылина // Материалы V Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». - СПб., 2001. - С. 357-360.
126. Приказ № 308 МЗ РФ от 21.10.97. «Об утверждении инструкции по изготовлению в аптеке жидких лекарственных форм».
127. Проекты фармакопейных статей и общих фармакопейных статей. Минздрав РФ [Офиц. сайт]. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/proekty-farmakopeynyh-i-obschiy-farmakopeynyh-statey> (Дата доступа: 19.06.17).
128. Пронченко, Г.Е. Лекарственные растительные средства / под ред. А.П. Арзамасцева, И.А. Самылиной. - М: ГЭОТАР – МЕД, 2002. - 171с.
129. Рассохина, О.И. Опыт применения гетерополисахаридов с целью восстановления барьерной функции кожи у пациентов с хронической реакцией «трансплантат против хозяина» / О.И. Рассохина, П.Е. Трахтман, Н.Н. Потекаев // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2018. - № 2. - С.76-83.

130. Редико Е.Э. Анализ и стандартизация полифенольного комплекса листьев и плодов черной смородины : дис. ... канд. фарм. наук :15.00.02 / Елена Эдуардовна Редико; ММА им. И.М. Сеченова. – М., 2009. – 133 с.
131. Редченкова, В.Н. Анализ требований некоторых фармакопей, предъявляемых к экстрактам / В.Н. Редченкова, О.М. Хишова // Хим.-фармац. журн. - 2006. - Т.40. - №1. - С.37-40.
132. Решетова, В.О. Разработка и стандартизация сбора витаминного и экстракта сухого на его основе: автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 14.0402 / Решетова Валентина Олеговна; Первый МГМУ им И.М. Сеченова. - Улан-Удэ, 2013г. – 21 с.
133. Розенблум, Ю.Н. Изучение химического состава веществ, выделенных из рябины / Ю.Н. Розенблум, Л.А. Левина // Мед. пром-сть СССР. - 1948. - № 1. - С. 26-28.
134. Рукавицына, Н.П. Современные подходы к составлению фармакопейных стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения: дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Рукавицына Надежда Петровна; НЦЭСМП. – М.: НЦЭСМП, 2017. –168 с.
135. Рыжова, Г.Л. Получение сухого экстракта из плодов рябины Сибирской и изучение его химического состава / Г.Л. Рыжова, С. А. Матасова, С. Г. Башуров // Химия растительного сырья. - 1997. - № 1. – С. 37-41.
136. Самылина, И.А. Лекарственное растительное сырье, проблемы стандартизации / И.А. Самылина // Тезисы докладов Медико-фармацевтического Форума. - М., 2002. - С. 133-134.
137. Самылина, И.А. Научные основы разработки и стандартизации лекарственных растительных средств / И.А. Самылина, В.А. Куркин, Г.П. Яковлев // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. –2016. – № 1. – С. 41-44.
138. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас в 3-х томах/ И.А. Самылина, В.А. Ермакова, Н.В. Бобкова, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – Т.1. – 192 с.
139. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас в 3-х томах/ И.А. Самылина, В.А. Ермакова, Н.В. Бобкова, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – Т. 2. – 384 с.
140. Самылина, И.А. Лекарственные растительные сборы / И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская // Фарматека. - 2010. - № 10. - С. 4-5.
141. Сафонова, И.А. Рябина обыкновенная. Химический состав и аспекты применения в медицине и народном хозяйстве: труды 4-й международной научной конференции «Актуальные проблемы регионоведения» / И.А. Сафонова, А.В. Ботов, О.В. Максименко // ООО «Издательский дом VIP». – Курск, 2009. – С. 183-188.

142. Сергунова Е. В. Исследования по стандартизации плодов шиповника и лекарственных форм на его основе: автореф. дисс. ... канд. фарм. наук. : 14.04.02 / Сергунова Екатерина Вячеславовна; ММА им. И.М. Сеченова. - М. - 2002. - 56 с.
143. Сергунова Е.В. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях / Е.В. Сергунова, А.С. Аврач // Фармация. - 2013. - № 4. - С.8-11.
144. Сергунова, Е.В. Исследования по стандартизации растительных сборов с плодами шиповника / Е.В. Сергунова, И.А. Самылина, А.А. Сорокина // Фармация. - 2004. - С. 16-17.
145. Скалозубова, Т.А. Изучение фенольных соединений листьев крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Прикладная аналитическая химия. - 2011. - Т. 2. - № 5. - С. 20 - 24.
146. Скалозубова, Т.А. Содержание суммы флавоноидов в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.М. Марахова, А.А. Сорокина // XXI Московская Международная Гомеопатическая конференция «Развитие гомеопатического метода в современной медицине»: тезисы докладов (Москва, 2011 г.). - М.: Изд-во ГЦ «Здоровье и реабилитация». - 2011. - С. 196 - 198.
147. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия) / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: Недра, 1987. – 464 с.
148. Сорокина, А.А. Изучение вопросов стандартизации водных извлечений / А.А. Сорокина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы II Международного съезда: сборник научных трудов. - СПб., 1998. - С. 34-38.
149. Сорокина, А.А. Изучение физико-химических характеристик настоев и отваров из лекарственного растительного сырья / А.А. Сорокина, И.А. Самылина // Фармация на современном этапе: Труды НИИФ. - Т. XXXIX. - Ч. 2. - М., 2000. - С. 272-275.
150. Сорокина, А.А. Определение кальция и магния в листьях и настое крапивы двудомной / А.А. Сорокина, Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова // Фармация. - 2013. - № 2. - С. 5-8.
151. Сорокина, А.А. Потенциометрия как метод контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества, и препаратов на его основе / А.А. Сорокина, А.И. Марахова // Фармация. - 2014. - №2. - С. 49 - 53.
152. Сорокина, А.А. Содержание дубильных веществ в двух видах диоскореи / А.А. Сорокина, Бу Вэй, А.И. Марахова // Фармация. - 2014. - № 1. - С. 14-16.

153. Сорокина, А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев и отваров и сухих экстрактов из ЛРС: дисс. ... д-ра фарм. наук. : 15.00.02 / Алла Анатольевна Сорокина; ММА им И.М. Сеченова. – М., 2002. – 236 с.
154. Сошникова, О.В. Изучение химического состава и биологической активности растений рода крапива: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. : 15.00.02 / Ольга Викторовна Сошникова; КГМУ. – Курск, 2006. – 202 с.
155. Способ спектральной идентификации плодов шиповника и витаминного сбора: пат. 2662059 РФ: МПК G01N33/00 / Жилкина В.Ю. [и др.]; заявитель и патентообладатель РУДН. – заявл. 28.12.2017; опубл. 23.07.2018. – 8 с.
156. Средство, обладающее антимикробным и антимикотическим действием: пат. 2674334 РФ: МПК A61K 36/738, A61P 31/04, A61P 31/10 / Жилкина В.Ю. [и др.]; заявитель и патентообладатель РУДН. – заявл. 28.12.2017; опубл. 07.12.2018. – 8 с.
157. Средство, обладающее антимикробным и антимикотическим действием: пат. 2677331 РФ: МПК A61K 36/73; A61K 31/375; A61P 31/04 / Жилкина В.Ю. [и др.]; заявитель и патентообладатель РУДН. – заявл. 28.12.2017; опубл. 16.01.2019. – 8 с.
158. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Браузе. – М.: Химия, 1968. – 312 с.
159. Токтоналиев, И.У. Использование фитопрепаратов в кыргызстане: реалии и перспективы / И.У. Токтоналиев, А.З. Зурдинов // Вестник КРСУ. – 2017. – Том 17. – № 10.
160. Тринеева, О.В. Исследования по разработке проектов фармакопейных статей на плоды и масло облепихи крушиновидной / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, И.А. Самылина // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 3. – С. 126-133.
161. Тринеева, О.В. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica Dioica* L.) / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, Е.Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. - 2015. - № 3. - С. 105-110.
162. Тринеева, О.В. Определение органических кислот в листьях крапивы двудомной / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, С.С. Воропаева // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013. - № 2.
163. Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. – 3-е изд. перераб. и доп. / А.Д. Турова, Э.Н. Сапожникова. – М.: Медицина, 1982.- С. 245 - 246.

164. Тутельян, В.А. Биологически активные добавки к пище: современные подходы к обеспечению качества и безопасности / В.А. Тутельян, Б.П. Суханов // Вопросы питания. - 2008. - № 4. - С. 4-15.
165. Ульянова, С.В. Использование физико-химических методов в анализе поливитаминных препаратов, содержащих водорастворимые витамины В1, В2, В6, С и никотинамид / С.В. Ульянова, А.И. Щавлинский, С.Н. Морев [и др.] // Фармация. - 1993. - № 3. - С. 60-62.
166. Фармакогнозия. Лекарственное сырьё растительного и животного происхождения : учебное пособие / под ред. Г. П. Яковлева. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб. : СпецЛит, 2013. — 848 с.
167. Фармацевтический online справочник [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://pharmspravka.ru/>
168. Федоровский, Н.Н. Потенциометрическое титрование в анализе водных извлечений / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.А. Сорокина [и др.] // Фармация. - 2008. - №2. - С. 15-16.
169. Федоровский, Н.Н. Теоретическая и экспериментальная разработка методик определения органических кислот в растворах и настоях из лекарственного растительного сырья / Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Прикладная аналитическая химия. - 2011. - Т. 2.-№ 4. - С. 9 - 15.
170. Филиппова, И. Рынок растительных средств: проблемы, перспективы, приоритеты / И. Филиппова // Ремедиум. - 2016. - С. 15-16.
171. Филиппович, Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович. - М.: Просвещение, 1982. - 305 с.
172. Шмук, А. Ягоды рябины как сырьё для получения каротина и каротиновых препаратов / А. Шмук, А. Замыслов // Докл. ВАСХНИЛ, 1945. - Вып. 4-5. - С. 7-10.
173. Шнайдман, Л.О. Биологически активные вещества плодов рябины обыкновенной и перспективы их промышленного использования / Л.О. Шнайдман, И.Н. Кущинская, М.К. Мительман // Растительные ресурсы. - 1971. - Т. 7. - Вып. 1. - С. 68-71.
174. Яцюк, В.Я. Биологически активные вещества травы крапивы двудомной / В.Я. Яцюк, Г.А. Чалый, О.В. Сошникова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2006. - № 1.
175. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / Куркин, В.А. - 2-е изд., перераб. и доп. - Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. - 1239 с.

176. Aldasoro J. J. et al. The genus *Sorbus* (Maloideae, Rosaceae) in Europe and in North Africa: morphological analysis and systematics // Systematic Botany. – 1998. – C. 189-212.
177. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries / A.T. Hukkanen [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – № 54(1). – P. 112 – 119.
178. Benson, Y.R. Some recent advances in amino acid sequence analysis: [Text] / Y.R. Benson // Instrumentation in amino acid sequence analysis. – London; New-York; San-Francisco, 1975. – P. 1-40
179. Bishayee, T. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats / T. Bishayee, R. Mbimba, J. Thoppil [et al.] // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2011. – V. 22. - N 11. – P. 1035–1046.
180. Bonarska-Kujawa, D. Biological Activity of Blackcurrant Extracts (*Ribes nigrum* L.) in Relation to Erythrocyte Membranes / D. Bonarska-Kujawa, S. Cyboran, R. Żyłka et al. // BioMed Research International. - (2014). – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/783059/>.
181. Foltá, K.M. Plant genetics and genomics: vol.6: Genetics and genomics of Rosaceae / K.M. Foltá, S.E. Gardiner. – New York: Springer science + business media, 2009. – 654 p.
182. Garbacki, N. Effects of prodelphinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity / N. Garbacki, L. Angenot, C. Bassleer [et al.] // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 2002. - V 365(6). – P. 434-341.
183. Gemmotherapy by Unda. Homeopathy by Unda. *Ribes Nigrum*. - Режим доступа: <http://www.rockwellnutrition.com/ribes-nigrum-gemmotherapy-byunda.html>. <http://www.pharmspravka.ru/entsiklopediya-lekarstvennyih-rasteniy/lekarstvennyie-rasteniya-r/ryabina.html>
184. Ghaemi, Y. Hydrophobic chromatography with dynamically coated stationary phases / Y. Ghaemi, R.A. Wall // J. Chromatogr. - 1979. - Vol. 174. – N 1. - P. 51-59.
185. Hudhes Davi Emlyn. Titrometric determination of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenol indophenyl in commercial liquid diets / Hudhes Davi Emlyn // J. Pharm. Sci. - 1983. - Vol. 72. - P. 29-34.
186. Jia, N. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage / N. Jia, B. Kong, Q. Liu // Meat Science. – 2012. – V. 91. - N 4. – P. 533– 539.
187. Kapasakalidis, P.G. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues / P.G. Kapasakalidis, R.A. Rastall, M.H. Gordon //

Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. V. 54 (11). – P. 4016–4021.

188. Kavtaradze N.S. Chemical components of *Urtica dioica* growing in Georgia / N.S. Kavtaradze, M.D. Alaniya, J.N. Aneli // Chemistry of natural compounds. – 2001. – V. 37. – №. 3. – P. 287 - 287.
189. Kavtaradze N.S. Flavonoid glycosides from *Astragalus galegiformis* leaves / N.S. Kavtaradze, M.D. Alaniya [et al.] // Chemistry of Natural compounds. – 2006. – V. 42. – №. 6. – P. 681-685.
190. Krisch, J.L. Anticandidal effect of berry juices and extracts from *Ribes* species,|| / J. Krisch, L. Ördögh, L. Galgóczy [et al.] // Central European Journal of Biology. - 2009. - V. 4. - N 1. – P. 86–89.
191. Kulevanova S., Stafilov T., Ristov T. Spectrophotometric determination of total flavonoids in taxa of genus *Thymus* L. (Lamiaceae) // Farmacija. – 1995. – T. 4. – C. 16 - 22.
192. Kylli, P. Rowanberry phenolics: compositional analysis and bioactivities / P. Kylli, L. Nohynek, R. Puupponen-Pimiä [et al.] // J. Agricultural and Food Chemistry. - 2010. - Vol. 58. – N 22.
193. Mammen D., Daniel M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids // Food chemistry. – 2012. – V. 135. – №. 3. – P. 1365-1368.
194. Matsumoto, H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. / H. Matsumoto, Y. Nakamura, H. Iida [et al.] // Experimental Eye Research. – 2006. – V. 83. - N 2. – P. 348 – 356.
195. Matsumoto, H. Delphinidin-3-rutinoside relaxes the bovine ciliary smooth muscle through activation of ETB receptor and NO/cGMP pathway. / H. Matsumoto, K.E. Kamm, J.T. Stull // Experimental Eye Research. – 2005. - V. 80. - N 3. – P. 313–322.
196. Meléndez-Hevia E. The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution / E. Meléndez-Hevia, T. Waddell, M. Cascante // J Mol Evol. - 1996. - 43 (3). - P. 293–303.
197. Mulleder, U. Urinary excretion of cyanidin glycosides / U. Mulleder, M. Murkovic, W. Pfannhauser // J. Biochem Biophys Methods. – 2002. – 53(1-3). – P. 61-66.
198. Neugebaur, M. High performance liquid chromatography method for quantitative and qualitative determination of ascorbic acid mixture / M. Neugebaur, M. El-Sadek [et al.] // Indian j. Rharm. Sci. - 1990. - Vol. 52. - № 4. - P. 182-185.

199. Nikolaeva-Glomb, L. In vitro antiviral activity of a series of wild berry fruit extracts against representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae / L. Nikolaeva-Glomb [et al.] // Natural product communications. – 2014. – № 9(1). – P. 51 – 54.
200. Nohynek, L.J. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens / L.J. Nohynek [et al.] // Nutrition and cancer. – 2006. – № 54(1). – P. 18 – 32.
201. Olszewska P. Michel. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three sorbus species in relation to their polyphenolic composition / Olszewska P. Michel // Natural Product Research. - 2009. - Vol. 23. № 16. - pp. 1507–1521.
202. Pekal, A. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay / A. Pekal, K. Pyrzynska // Food Analytical Methods. – 2014. – V. 7. – №. 9. – P. 1776-1782.
203. Phytochemical study of phenolic compounds from Helichrysi Flos by LC-DAD-MS / E. Czinner [et al.] // In: Proceedings of the Phytochemical Society Of Europe. – 2002. – 47. – p. 99 – 109.
204. Porter, L.J. The aluminium (III) complexes of hydroxyflavones in absolute methanol. Part I. Ligands containing more than one chelating site / L.J. Porter, K.R. Markham // Journal of the Chemical Society C: Organic. – 1970. – №. 9. – P. 344-349.
205. Ribes nigrum for homoeopathic preparations / French Pharmacopoeia. – 2003.
Режим доступа http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7b2e751b3330cd173f62d6acf901aa90.pdf
206. Roman, I. Bioactive compounds and antioxidant activity of Rosa canina L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania [электронный ресурс] / I. Roman, A. Stanila, S. Stanila // Chemistry central jornal. – 2013. – № 7(1). – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3668991/>.
207. Saakov, S.G. Roses / S.G. Saakov, D.A. Rieksta // Zinatne, Riga (in Russian). – 1973. – T. 1. – C. 102 - 130.
208. Sampson, L. Flavonol and flavone intakes in US health professionals / L. Sampson, E. Rimm, P.C. Hollman [et al.] // J. Am. Diet. Assoc. – 2002. - Vol. 102. – P. 1414-1420.
209. Schwinn K.E. Flavonoids / K.E. Schwinn, K.M. Davies // Annual Plant Reviews. – 2018. – C. 92 - 149.
210. Skaper, S.D. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion cooperative effects of ascorbic acid / S.D. Skaper, M. Fabris, V.

- Ferrari [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. - 1997. - V. 22. - №4. - P. 669–678.
211. Sies, H. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants / H. Sies, W. Stahl // The American journal of clinical nutrition. – 1995. – V. 62. – №. 6. – P. 1315S-1321S.
212. Tabart, J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Ribes nigrum extracts / J. Tabart, T. Franck, C. Kevers [et al.] // Food Chemistry. – 2012. – V. 131. – N 4. – P. 1116–1122.
213. Tillmans J. Das Reduktionsvermögen pflanzlicher Lebensmittel und seine Beziehung zum Vitamin C / J. Tillmans, P. Hirsch, R. Vaubel // Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel. – 1933. – V. 65. – №. 2. – P. 145-167.
214. Vitamins, nutrition and cancer / Ed. K.N. Prasad. - Basel. New York: Karger, 1984. - 307 p.
215. Wichtl, M. Plantes thérapeutiques - Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique / M. Wichtl, R. Anton // Paris, Éditions Tec & Doc. – 2003. – p. 692.
216. Zhilkina, V. Screening study of medicinal plant raw materials for antimicrobial and antimycotic activity / V. Zhilkina, S. Panov, Z. Velikhanova [et al.] // FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1). FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd., 2018. – pp.236 – 236.

ПРИЛОЖЕНИЕ.
Акты внедрения результатов работы

Приложение 1. Акт внедрения в работу ООО «Фирма «Здоровье» результатов диссертационного исследования



ООО Фирма «Здоровье»
143430 Россия, Московская область,
пос. Нахабино, ул. Советская, д. 20 А
Тел. (495) 566-00-14; 566-42-91
www.lektrava.ru,
email: sales@lektrava.ru

Утверждаю
Заместитель генерального
директора по качеству
ООО Фирма «Здоровье»
Смирнова М.А. Смирнова
« 23 » *мая* 2018 г

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Авторы: аспирант Института биохимической технологии и нанотехнологии
РУДН Жилкина В.Ю.
профессор Института биохимической технологии и
нанотехнологии РУДН Марахова А.И.

Объект внедрения: разделы «Внешние признаки», «Микроскопия», «Испытания»
нормативных документов по контролю качества лекарственного растительного
сырья.

Источник информации: Проекты ФС: «Плоды смородины черной»,
«Витаминный сбор №1», «Витаминный сбор №2».

Место разработки: ФГАОУ ВО Российского университета дружбы народов,
Институт биохимической технологии и нанотехнологии.

Где и кем проведено внедрение: ОКК ООО Фирма «Здоровье».

Цель внедрения: Определение характеристик подлинности по показателям
«Внешние признаки», «Микроскопия» и стандартизация витаминных сборов №1
и №2, а также их компонентов (плодов шиповника, плодов смородины черной,
плодов рябины обыкновенной) по показателю «сумма органических кислот»
методом потенциометрического титрования.

Результат внедрения: Описание внешних признаков и анатомо-диагностические
характеристики позволяют достоверно определять качество сырья при его
анализе. Предложенная методика потенциометрического титрования для
количественного определения суммы органических кислот дает
воспроизводимые результаты и проста в исполнении.

Начальник ОКК

Белоус Т.А.

Приложение 2. Акт внедрения в учебный процесс кафедры фармации Медицинского университета «Реавиз» результатов диссертационного исследования



ЧАСТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Медицинский университет «Реавиз»
филиал г. Москва

443001, г. Самара, ул. Чапаевская, 227
Тел: 8 (846) 333-54-51, (846) 333-50-56
Факс: (846) 270-49-47
107564, г. Москва,
ул. Краснобогатyrская, д.2, стр.2
тел.8(495)642-30-66
e-mail: msk@reaviz.ru, www.mosreaviz.ru

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
в учебный процесс
результатов диссертационной работы
Жилкиной Веры Юрьевны
на тему: «Фармакогностическое изучение витаминных сборов из
лекарственного растительного сырья»**

Настоящий акт подтверждает, что результаты по разработке методик подтверждения подлинности витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов: плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной, предложенные в диссертационной работе Жилкиной Веры Юрьевны, используются при обучении слушателей факультета непрерывного образования по специальности фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Декан факультета непрерывного
образования Частного учреждения
образовательной организации высшего образования
«Медицинский университет «Реавиз», филиал г. Москва,
г. Москва, ул. Краснобогатyrская, д.2, к.2,
к.ф.н.



О.И. Слюсар

Приложение 3. Акт внедрения в учебный процесс кафедры биотехнологии и промышленной фармации ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет» результатов диссертационного исследования

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
в учебный процесс
результатов диссертационной работы
Жилкиной Веры Юрьевны
на тему: «Фармакогностическое изучение витаминных сборов из
лекарственного растительного сырья»**

Настоящий акт подтверждает, что результаты по разработке методик количественного анализа суммы флавоноидов, каротиноидов и антоцианов в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентов, предложенные в диссертационной работе Жилкиной Веры Юрьевны, аспиранта Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО РУДН, используются в учебном процессе кафедры Биотехнологии и промышленной фармации ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет».

Заведующий кафедрой Биотехнологии и
промышленной фармации
ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский
технологический университет»
д.т.н., проф.



С.А. Кедик

г. Москва, проспект Вернадского, дом 86

Подпись Кедика С.А. заверяю
первый проректор, ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский
технологический университет»

д.х.н., профессор

«22» февраля 2018 г.



Прокопов Н.И.

Приложение 4. Акт внедрения в учебный процесс института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» результатов диссертационного исследования

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Российский университет
дружбы народов (РУДН)

**ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И НАНОТЕХНОЛОГИИ
(ИБХТН)**

Ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2, Москва, Россия, 117198. Телефон / факс +7(499) 936 85 99;
<http://nano.rudn.ru>; nanotechnology-rudn@yandex.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый проректор – проректор
по научной работе



ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов»

проф. Н.С.Кирабаев
_____ 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в учебный процесс

Института биохимической технологии и нанотехнологии
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
результатов диссертационной работы

Жилкиной Веры Юрьевны

на тему: «Фармакогностическое изучение витаминных сборов из лекарственного
растительного сырья»

Настоящий акт удостоверяет факт внедрения результатов научной работы Жилкиной Веры Юрьевны в учебный процесс Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО РУДН. Результаты, подтверждающие антимикробную и антимикотическую активность водных и водно-спиртовых извлечений из витаминных сборов №1 и №2 используются при обучении студентов в магистратуре в лекционно-практическом курсе дисциплин «Основы фитохимии и технология фитопрепаратов» и «Биотехнология и бионанотехнология».

Директор Института
биохимической технологии и
нанотехнологии, д.х.н.

Я.М. Станишевский

Приложение 5. Направление проекта ФС «Смородины черной плоды» в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Российский университет
дружбы народов (РУДН)



ИНСТИТУТ
БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
И НАНОТЕХНОЛОГИИ (ИБХТН)

ул. Миклухо-Маклая, д. 10н2, Москва, Россия, 117198
ОГРН 1027739189323; ОКПО 02066463; ИНН 7728073720

Телефон: +7495 936-85-99
nano.rudn.ru; nanorudn@pochta.rudn.ru

03 августа 2018
№ 2020/427

Генеральному директору ФГБУ
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
Минздрава России, д.м.н., Олефиру
Ю.В. 127051, г. Москва, Петровский
бульвар, д.8

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам проект ФС «Смородины черной плоды», разработанный сотрудниками института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, ассистентом Жилкиной Веры Юрьевны и д.фарм.н. профессором Мараховой Анной Игоревной, и доцентом кафедры фармацевтического естествознания Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ Бобковой Натальей Владимировной, для рассмотрения вопроса о включении в Государственную Фармакопею РФ XIV издания.

Приложения:

1. Проект ФС «Смородины черной плоды» - 14 стр. - 1 экземпляр;
2. Пояснительная записка к проекту фармакопейной статьи «Смородины черной плоды» - 24 стр. - 1 экземпляр;
3. Акт внедрения методики потенциометрического титрования для стандартизации по показателю «сумма органических кислот» - 1 стр. - 1 экземпляр.

Директор Института биохимической
технологии и нанотехнологии
ФГАОУ ВО РУДН,
профессор, д.х.н.

 Я.М. Станишевский

исп. Жилкина В.Ю. (8-962-967-31-29),
Марахова А.И. (8-926-600-65-95),
Бобкова Н.В. (8-916-076-38-66)



Приложение 6. Направление проекта ФС «Витаминный сбор №1» в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



**Российский университет
дружбы народов (РУДН)**



**ИНСТИТУТ
БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
И НАНОТЕХНОЛОГИИ (ИБХТН)**

ул. Миклухо-Маклая, д. 10к2, Москва, Россия, 117198
ОГРН 1027739189323; ОКПО 02066463; ИНН 7728073720

Телефон: +7495 936-85-99
nano.rudn.ru; nanorudn@pochta.rudn.ru

03 августа 20 18
№ 2020/428

Генеральному директору ФГБУ
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
Минздрава России, д.м.н., Олефиру
Ю.В. 127051, г. Москва, Петровский
бульвар, д.8

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам проект ФС «Витаминный сбор №1», разработанный сотрудниками института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, ассистентом Жилкиной Веры Юрьевны и д.фарм.н. профессором Мараховой Анной Игоревной, и доцентом кафедры фармацевтического естествознания Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ Бобковой Натальей Владимировной, для рассмотрения вопроса о включении в Государственную Фармакопею РФ XIV издания.

Приложения:

1. Проект ФС «Витаминный сбор №1» - 18 стр. - 1 экземпляр;
2. Пояснительная записка к проекту фармакопейной статьи «Витаминный сбор №1» - 26 стр. - 1 экземпляр;
3. Акт внедрения методики потенциометрического титрования для стандартизации по показателю «сумма органических кислот» - 1 стр. - 1 экземпляр.

Директор Института биохимической
технологии и нанотехнологии
ФГАОУ ВО РУДН,
профессор, д.х.н.

Я.М. Станишевский

исп. Жилкина В.Ю. (8-962-967-31-29),
Марахова А.И. (8-926-600-65-95),
Бобкова Н.В. (8-916-076-38-66)



Приложение 7. Направление проекта ФС «Витаминный сбор №2» в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Российский университет
дружбы народов (РУДН)



ИНСТИТУТ
БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
И НАНОТЕХНОЛОГИИ (ИБХТН)

ул. Миклухо-Маклая, д. 10к2, Москва, Россия, 117198
ОГРН 1027739189323; ОКПО 02066463; ИНН 7728073720

Телефон: +7495 936-85-99
nano.rudn.ru; nanorudn@pochta.rudn.ru

03 августа 20 18
№ 2020/429

Генеральному директору ФГБУ
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
Минздрава России, д.м.н., Олефиру
Ю.В. 127051, г. Москва, Петровский
бульвар, д.8

Глубокоуважаемый Юрий Витальевич!

Направляем Вам проект ФС «Витаминный сбор №2», разработанный сотрудниками института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, ассистентом Жилкиной Веры Юрьевны и д.фарм.н. профессором Мараховой Анной Игоревной, и доцентом кафедры фармацевтического естествознания Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ Бобковой Натальей Владимировной, для рассмотрения вопроса о включении в Государственную Фармакопею РФ XIV издания.

Приложения:

1. Проект ФС «Витаминный сбор №2» - 15 стр. - 1 экземпляр;
2. Пояснительная записка к проекту фармакопейной статьи «Витаминный сбор №2» - 24 стр. - 1 экземпляр;
3. Акт внедрения методики потенциометрического титрования для стандартизации по показателю «сумма органических кислот» - 1 стр. - 1 экземпляр.

Директор Института биохимической
технологии и нанотехнологии
ФГАОУ ВО РУДН,
профессор, д.х.н.

Я.М. Станишевский

исп. Жилкина В.Ю. (8-962-967-31-29),
Марахова А.И. (8-926-600-65-95),
Бобкова Н.В. (8-916-076-38-66)





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2674334

**Средство, обладающее антимикробным и
антимикотическим действием**

Патентообладатель: *Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
"Российский университет дружбы народов" (РУДН) (RU)*

Авторы: *Жилкина Вера Юрьевна (RU), Сачивкина Надежда
Павловна (RU), Марахова Анна Игоревна (RU), Жилкина
Валентина Ивановна (RU), Романова Елена Валерьевна (RU),
Шацких Елена Николаевна (RU)*

Заявка № 2017146560

Приоритет изобретения 28 декабря 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 07 декабря 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 28 декабря 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2677331

**Средство, обладающее антимикробным и
антимикотическим действием**

Патентообладатель: *Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
"Российский университет дружбы народов" (РУДН) (RU)*

Авторы: *Жилкина Вера Юрьевна (RU), Сачивкина Надежда
Павловна (RU), Марахова Анна Игоревна (RU), Жилкина
Валентина Ивановна (RU), Романова Елена Валерьевна (RU),
Шацких Елена Николаевна (RU)*

Заявка № 2017146558

Приоритет изобретения 28 декабря 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 16 января 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 28 декабря 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

Приложение 9. Протокол лабораторных испытаний на токсичность настоя витаминного сбора №1

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Российский университет
дружбы народов (РУДН)

ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И НАНОТЕХНОЛОГИИ (ИБХТН)

Ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2, Москва, Россия, 117198. Телефон / факс +7(499) 936 85 99;
<http://nano.rudn.ru>; nanotechnology-rudn@yandex.ru

23 мая 2018
№ 0002

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Наименование образца (пробы):** настой (водное извлечение) из витаминного сбора 1 - плодов шиповника и плодов смородины черной 1:1; настой готовился 1:10 сырье-экстракт.
- Цель исследований:** определение токсичности по методу оценки токсикологических показателей с помощью люминесцентного теста с использованием Препарата «Эколюм» ТУ 6-09-20-236-01
- Наименование предприятия, организации (заявитель):** РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ, Жилкина Вера Юрьевна, Ассистент Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН
- Юридический адрес:** 117198, город Москва, Миклухо-Маклая улица, дом 10, корп.2
- Место отбора пробы:** Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН (ИБХТН)
- Пробоподготовка** для биотестирования на приборе «Биотокс-10М» проведена в моделируемых условиях: модельная среда - дистиллированная вода; разведение - не проводилось; температура - 37 град. Цельсия; экспозиция - 1 ч. Время и дата отбора: 23.04.2018 13:00
- Средства измерений:**

№п/п	Тип прибора	Заводской номер	№ свидетельства о поверке	Срок действия
1	Весы электронные Adventurer AR3130	1121241419	СП 1805251 от 09.10.2017	08.10.2018
2	Люминометр "Биотокс-10М"	180X	СП 1503560 от 21.12.2017	21.12.2018
3	pH метр МАРК-902	993421	СП 5644390 от 17.12.2017	16.12.2018

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определяемые показатели	Единицы измерения	Результаты испытаний	Величина допустимого уровня	НД на методы исследований
Общетоксическое действие, определяемое альтернативными методами in vitro	-	Отсутствие (индекс токсичности T=0)	Отсутствие (индекс токсичности T- не более 20)	ГОСТ 32893-2014

Ф.И.О., должность лица, ответственного за оформление протокола: к.б.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии медицинского факультета РУДН Н.П. Сачивкина

Директор ИБХТН РУДН, д.х.н., профессор Я.М. Станишевский

Приложение 10. Протокол лабораторных испытаний на токсичность настоя витаминного сбора №2

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Российский университет
дружбы народов (РУДН)

ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ И НАНОТЕХНОЛОГИИ (ИБХТН)

Ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2, Москва, Россия, 117198. Телефон / факс +7(499) 936 85 99;
<http://nano.rudn.ru>; nanotechnology-rudn@yandex.ru

23 мая 2018
№ 0003

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Наименование образца (пробы):** настой (водное извлечение) из витаминного сбора 2 - плодов шиповника и лимонной рябины обыкновенной 1:1; настой готовился 1:10 сырье-экстракт.
- Цель исследований:** определение токсичности по методу оценки токсикологических показателей с помощью люминесцентного теста с использованием Препарата «Эколом» ТУ 6-09-20-236-01
- Наименование предприятия, организации (заявитель):** РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ, Жилкина Вера Юрьевна, Ассистент Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН
- Юридический адрес:** 117198, город Москва, Миклухо-Маклая улица, дом 10, корп.2
- Место отбора пробы:** Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН (ИБХТН)
- Пробоподготовка** для биотестирования на приборе «Биотокс-10М» проведена в моделируемых условиях: модельная среда - дистиллированная вода; разведение - не проводилось; температура - 37 град. Цельсия; экспозиция - 1 ч. Время и дата отбора: 23.04.2018 13:00
- Средства измерений:**

№п/п	Тип прибора	Заводской номер	№ свидетельства о поверке	Срок действия
1	Весы электронные Adventurer AR3130	1121241419	СП 1805251 от 09.10.2017	08.10.2018
2	Люминометр "Биотокс-10М"	180X	СП 1503560 от 21.12.2017	21.12.2018
3	pH метр МАРК-902	993421	СП 5644390 от 17.12.2017	16.12.2018

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определяемые показатели	Единицы измерения	Результаты испытаний	Величина допустимого уровня	НД на методы исследований
Общетоксическое действие, определяемое альтернативными методами in vitro	-	Отсутствие (индекс токсичности T=0)	Отсутствие (индекс токсичности T- не более 20)	ГОСТ 32893-2014

Ф.И.О., должность лица, ответственного за оформление протокола: к.б.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии медицинского факультета РУДН Н.П. Сачивкина

Директор ИБХТН РУДН, д.х.н., профессор Я.М. Станишевский