САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ХИМИИ

На правах рукописи

УДК 543

ФАЛЬКОВА МАРИНА ТАХИРОВНА

ЦИКЛИЧЕСКИЙ ИНЖЕКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ВСКРЫТИЕМ ПРОБ В УЗ-ПОЛЕ

02.00.02 – аналитическая химия

Д И С С Е Р Т А Ц И Я

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., доц. А.В. Булатов

Санкт-Петербург – 2014

Содержание

Стр.

Введение……..... 5

Глава 1. Обзор литературы……..... 9

1.1. Автоматизация фармацевтического анализа на принципах проточных методов……..... 9

1.2. Фармакологические и биологические свойства флавоноидов, антрахинонов и аскорбиновой кислоты…… 28

1.3. Методы определения флавоноидов в лекарственных препаратах и лекарственном растительном сырье…….....…… 32

1.4. Методы определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье…… 35

1.5. Методы определения антрахинонов в лекарственном растительном сырье…… 38

1.6. Заключение…… 40

Глава 2. Аэрогидравлическая схема циклического инжекционного анализа лекарственного растительного сырья с вскрытием проб в УЗ-поле, и ее обоснование…… 41

Глава 3. Методика экспериментальных исследований…… 45

3.1. Средства измерений…….…… 45

3.2. Вспомогательные устройства и оборудование…….…… 46

3.3. Реактивы и материалы…….…… 47

3.4. Приготовление растворов…….…….. 48

3.5. Изготовление картриджей с пористыми ПТФЭ фильтрами…… 50

3.6. Проботбор и пробоподготовка ЛРС……... 50

Глава 4. Разработка методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье…… 52

4.1. Влияние ПАВ на образование комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III)……..... 52

4.2. Выбор условий спектрофотометрического определения флавоноидов…… 55

4.3. Оптимизация процесса извлечения флавоноидов из лекарственного растительного сырья…… 56

4.4. Методика ЦИ-определения флавоноидов в ЛРС с извлечением аналитов в УЗ-поле……. 59

4.5. Мешающее влияние примесных компонентов ……..... 62

4.6. Испытание методики на реальных объектах анализа……... 63

Глава 5. Разработка методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания ……... 66

5.1. Выбор условий спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты …..……. 66

5.2. Оптимизация процесса извлечения аскорбиновой кислоты из лекарственного растительного сырья……... 70

5.3. Методика ЦИ-определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и продуктах питания…… 72

5.4. Мешающее влияние примесных компонентов……. 74

5.5. Испытание методики на реальных объектах анализа…….. 75

Глава 6. Разработка методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье……. 79

6.1. Оптимизация условий извлечения антрахинонов из лекарственного растительного сырья ……. 79

6.2. Методика ЦИ-определения общего содержания антрахинонов в ЛРС…….. 84

6.3. Мешающее влияние примесных компонентов……..... 86

6.4. Испытание методики на реальных объектах анализа……... 87

Выводы……..... 91

Принятые условные сокращения и обозначения…… 92

Список литературы…… 93

Приложения…… 108

Введение

Среди большого ассортимента лекарственных средств, производимых в мире, доля препаратов растительного происхождения составляет 25–30 %, а в некоторых фармакотерапевтических группах достигает 70 % [1]. Повышенное внимание к лекарственному растительному сырью (**ЛРС**) отражает мировую тенденцию к увеличению числа лекарственных препаратов (**ЛП**) на растительной основе.

Постоянно возрастающие требования к контролю качества растительного сырья вызывают необходимость разработки оперативных методов оценки содержания в нем биологически активных веществ (**БАВ**). При необходимости выполнения массовых анализов важнейшими критериями выбора аналитических методов являются: минимизация трудовых затрат на их выполнение, а также радикальное сокращение расходов проб, реагентов и образующихся отходов. Общим решением всех перечисленных проблем является автоматизация и миниатюризация аналитических процедур на принципах проточных методов анализа, удовлетворяющих основным принципам «зеленой аналитической химии» [2–4].

Проточные методы, как правило, предполагают анализ растворов, поэтому твердые образцы различного происхождения, в том числе ЛРС, требуют предварительной пробоподготовки в условиях гидравлической схемы (растворение легкорастворимых твердофазных проб или извлечение аналитов), чтобы сформировать жидкую пробу аналита [5, 6]. Дальнейшее образование его аналитической формы в ранее предложенных схемах проточного анализа происходит при смешении зон раствора пробы и растворов реагентов в процессе их перемещения в потоке носителя через смесительную спираль в детектор. В этом случае не обеспечивается эффективное смешение этих зон, а соответственно и установление термодинамического равновесия в аналитической реакции. Кроме того, в процессе перемещения зоны пробы в потоке носителя по гидравлическим трассам происходит ее дисперсия. Эти явления приводят к снижению чувствительности анализа.

Актуальной задачей является поиск новых инструментальных методических решений, которые позволяли бы обеспечить полную автоматизацию анализа ЛРС с сохранением чувствительности применяемых методик.

Обеспечить полноту протекания аналитических реакций и устранить дисперсию пробы в потоке носителя позволяют проточные методы, включающие стадию конвективного перемешивания зон пробы и растворов реагентов в смесительных камерах. В этих проточных методах специально создаются условия для достижения равновесия в реакциях образования аналитических форм, что обеспечивает возможность сохранения чувствительности автоматизированных методик анализа на уровне их стационарных аналогов. К числу таких проточных методов относится циклический инжекционный анализ (**ЦИА**) [7–10], унифицированная аэрогидравлическая схема которого позволяет осуществлять различные операции пробоподготовки. Новые эффективные методические приемы призваны расширить аналитические возможности ЦИА.

Цель работы

Цель данного исследования – разработка общей схемы автоматизации анализа лекарственного растительного сырья на принципах циклического инжекционного анализа с извлечением аналитов в раствор в ультразвуковом поле и подтверждение ее аналитических возможностей на методиках определения биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- разработать общую аэрогидравлическую схему ЦИА для автоматизированного анализа лекарственного растительного сырья с извлечением аналитов в раствор в ультразвуковом (**УЗ**) поле;
- установить и оптимизировать условия извлечения флавоноидов, аскорбиновой кислоты (**АК**) и антрахинонов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ;

– установить возможность применения растворов поверхностно-активных веществ в качестве катализаторов спектрофотометрической реакции флавоноидов с ионами алюминия (III);

– проиллюстрировать возможности циклического инжекционного анализа с вскрытием проб в УЗ-поле на примерах автоматизированного спектрофотометрического определения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов в лекарственном растительном сырье;

– апробировать разработанные методики на реальных объектах и подтвердить правильность получаемых результатов референтными методами.

Научная новизна работы

Разработана общая аэрогидравлическая схема циклического инжекционного анализа лекарственного растительного сырья, включающая извлечение аналитов из нерастворимых твердофазных проб в раствор в УЗ-поле для их последующего спектрофотометрического определения.

Исследованы реакции образования комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III) в растворах цетилпиридиния хлорида (**ЦПХ**), додецилсульфата натрия и Triton X-100 и установлена возможность применения ЦПХ в качестве катализатора данной спектрофотометрической реакции. Получены данные о кинетике реакции комплексообразования рутина с ионами алюминия (III) в присутствии ЦПХ.

Найдены оптимальные условия извлечения антрахинонов, аскорбиновой кислоты и флавоноидов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ для их экспрессного спектрофотометрического определения.

Практическая значимость работы

Разработана схема ЦИА, обеспечивающая полную автоматизацию анализа лекарственного растительного сырья и его максимальную чувствительность.

Разработаны и апробированы на реальных объектах циклические инжекционные спектрофотометрические методики:

– определения общего содержания флавоноидов в лекарственном растительном сырье, обеспечивающая возможность существенного сокращения времени анализа, расходов реагентов и образующихся отходов;

– определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания, обеспечивающая экспрессное выполнение массовых анализов;

– определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье, обеспечивающая замену органических экстрагентов на водные растворы ПАВ.

Положения, выносимые на защиту

1. Общая аэрогидравлическая схема циклического инжекционного анализа лекарственного растительного сырья с ультразвуковым вскрытием проб.
2. Обоснование возможности применения растворов поверхностно-активных веществ в качестве катализаторов спектрофотометрической реакции флавоноидов с ионами алюминия (III) и схема спектрофотометрического анализа на ее основе.
3. Обоснование условий извлечения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ для их экспрессного спектрофотометрического определения.
4. Методика циклического инжекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания, включающая ее автоматизированное извлечение в УЗ-поле, и результаты её испытаний.
5. Методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения общего содержания флавоноидов и антрахинонов в лекарственном растительном сырье, включающие автоматизированное извлечение аналитов в УЗ-поле, и результаты их испытаний.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Автоматизация фармацевтического анализа на принципах проточных методов

Для автоматизации фармацевтического анализа широкое распространение нашли проточные методы, которые позволяют уменьшить время анализа, сократить количество используемых реагентов и образующихся отходов, а также повысить прецизионность.

Для фармацевтического анализа наиболее часто используются неравновесные проточные методы на принципах проточно-инжекционного (**ПИА**), последовательного инжекционного (**SIA**) и перекрестного инжекционного (**CIA**) анализа. В значительно меньшей степени встречаются методики, основанные на принципах равновесных проточных методов – проточно-порционного (**FBA**) и циклического инжекционного анализа (**ЦИА**), что связано с относительно недавней разработкой этих методов.

Метод ПИА предполагает инжекцию пробы в непрерывный поток раствора-носителя, который непосредственно поступает в проточный детектор или смешивается с растворами реагентов, обеспечивающими образование аналитических форм аналитов перед этапом детектирования. ПИА подразумевает использование непрерывного потока реагентов и периодическое введение дискретных порций пробы с помощью крана-дозатора, что обеспечивает высокую производительность анализа, однако в таких условиях наблюдается большой расход реагентов и образование значительного количества отходов. Также недостатком ПИА является отсутствие универсальных схемных решений и снижение чувствительности автоматизируемых аналогов за счет дисперсии зоны пробы в гидравлических трассах [11].

Возможности анализа фармацевтической продукции в условиях ПИА проиллюстрированы на большом количестве аналитов и объектов анализа [12–21].

Как правило, пробы предварительно растворяют с последующим проточно-инжекционным анализом приготовленных растворов.

Авторами [22] была разработана ПИА методика определения кверцетина в растительном сырье с хемилюминесцентным детектированием. Методика основана на взаимодействии кверцетина со смесью H_2O_2, люминола и перманганата калия. Для выполнения анализа образцы сушили на воздухе и экстрагировали аналит 80 % раствором метанола. Кверцетин отделяли от других полифенолов с помощью препаративной тонкослойной хроматографии, после чего выделенный кверцетин растворяли в 0,01 М растворе Na_2CO_3 и проводили его ПИ-определение. Для этого 100 мкл раствора перманганата калия инжектировали в поток пробы и направляли в первую смесительную спираль (Рисунок 1). Во вторую смесительную спираль подавали растворы пероксида водорода и люминола. Затем оба потока смешивали, направляли в проточную ячейку и проводили измерение интенсивности возникающей хемилюминесценции. Производительность анализа составила 80 проб в час.

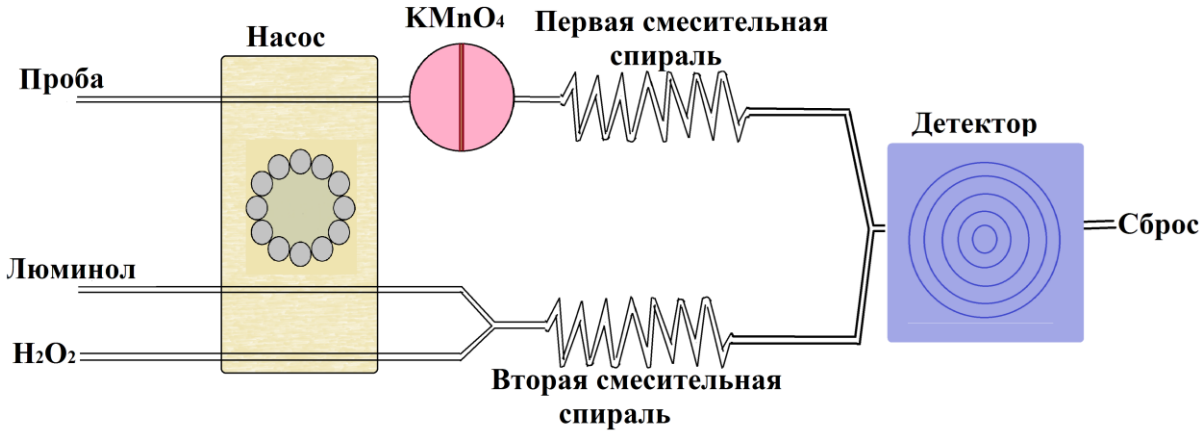


Рисунок 1. Схема ПИА определения кверцетина в растительном сырье [22].

Важнейшим решением унификации гидравлических схем стал SIA [23]. В этом методе вместо «сети» трубок, характерных для ПИА, используется одна жидкостная линия, по которой с помощью реверсивного насоса движется поток растворов попеременно в двух противоположных направлениях, что позволяет существенно сократить расход реагентов.

В данном варианте проточного анализа порции раствора носителя, пробы и растворов реагентов последовательно вводятся в удерживающую спираль. После

переключения многоходового крана-переключателя и реверса насоса происходит образование аналитической формы за счет проникновения зоны пробы в зону реагента в процессе их передвижения через реакционную спираль к детектору. При этом создается концентрационный градиент, в котором зоны пробы и реагента частично перекрываются, формируя область, внутри которой образуется продукт реакции. Недостатком SIA по отношению к ПИА является более низкая производительность.

В качестве примера использования метода SIA в фармацевтическом анализе рассматривается методика определения АК в таблетках витамина С со спектрофотометрическим детектированием [24]. Методика основана на окислительно-восстановительной реакции между АК и перманганатом калия в кислой среде, которая приводит к уменьшению оптической плотности перманганата калия при 525 нм. Для этого в удерживающую спираль отбирали раствор носителя (дистиллированная вода), пробу, растворы серной кислоты, перманганата калия и снова раствор серной кислоты и раствор носителя (Рисунок 2). Затем растворы прокачивались через реакционную спираль, где происходило их перемешивание, к детектору, и измерялся аналитический сигнал. Производительность методики составила 60 проб в час.

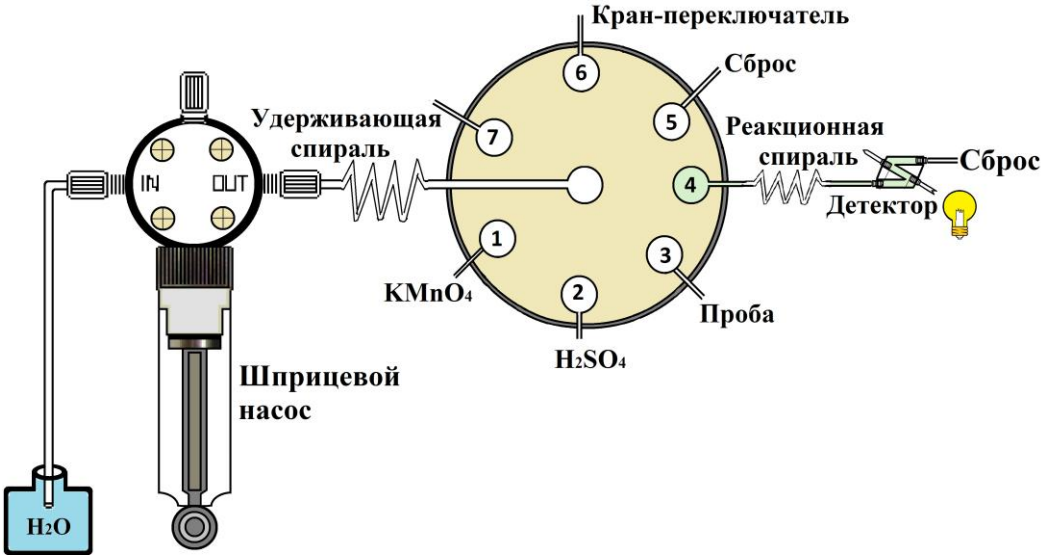


Рисунок 2. Схема SIA определения АК в таблетках витамина С [24].

Авторами [25] разработана методика SIA спектрофотометрического определения АК в ЛП с использованием в качестве фотометрического реагента 11–молибдовисмутофосфорной (11–МВФ) гетерополикислоты:

$$PBi^{III}Mo^{VI}_{11}O_{40}^{6-} + H_2AsA \longrightarrow H_2PBi^{III}Mo_2^{V}Mo_9^{VI}O_{40}^{6-} + AsA$$

В удерживающую спираль при помощи шприцевого насоса последовательно отбирали 800 мкл раствора носителя (раствор серной кислоты pH=1,7), 60 мкл раствора 11–МВФ и 140 мкл раствора пробы (Рисунок 3). Затем растворы прокачивали в реакционную спираль, где происходило их смешение и далее к детектору и на сброс. Цистеин, гидрохинон и гидроксикислоты оказывают существенное мешающее влияние на определение АК. Диапазон SIA определения АК составил (1,06–88)$\cdot 10^{-3}$ г/дм^3. Производительность – 15 проб в час.

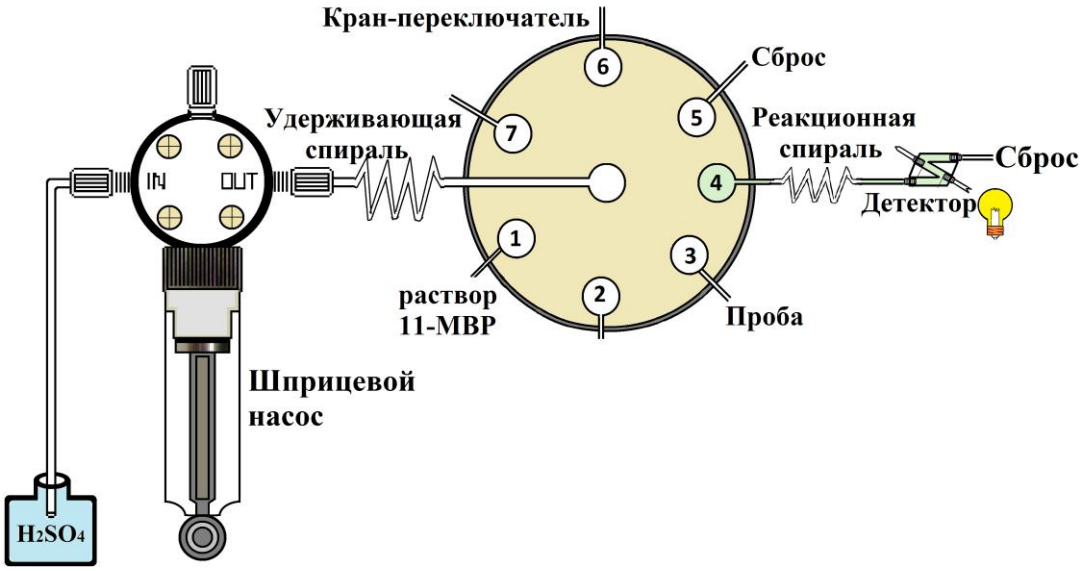


Рисунок 3. Схема SIA определения АК в ЛП [25].

В настоящее время в рамках метода SIA выделено отдельное направление – последовательная инжекционная хроматография (**SIC**) [26]. Метод SIC предполагает сочетание возможностей жидкостной хроматографии и SIA. В данном варианте проточного анализа потоки пробы и растворы элюентов последовательно направляются через хроматографическую колонку схемы SIC с помощью шприцевого насоса и крана-переключателя к детектору, где происходит измерение аналитического сигнала (Рисунок 4).

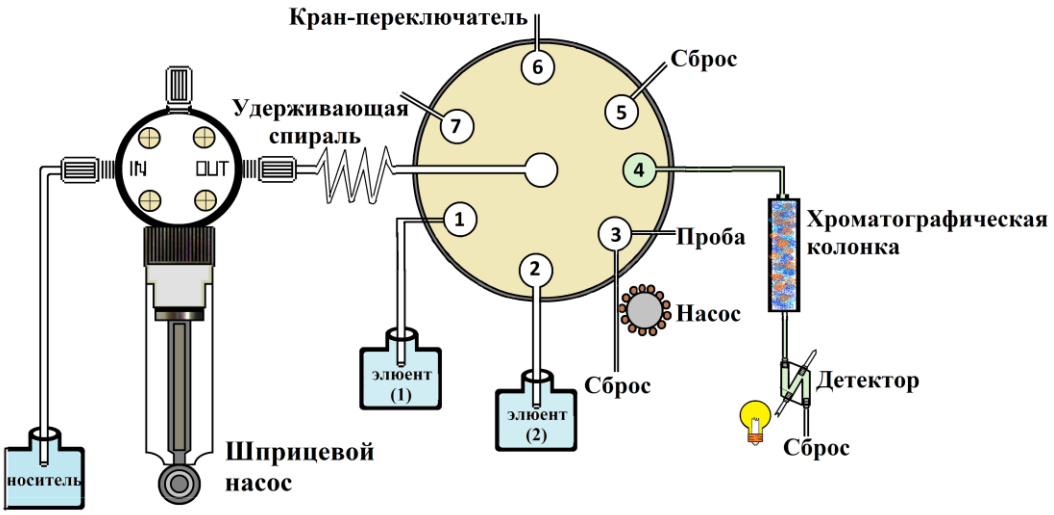


Рисунок 4. Принципиальная схема SIC [26].

В качестве примера использования метода SIC в фармацевтическом анализе рассматривается методика определения аброксола и доксициклина в ЛП [27]. ЛП растворяли в 100 мл метанольного раствора фосфорной кислоты, после чего полученный раствор разбавляли в 25 раз при помощи смеси ацетонитрила и воды (20:80). Полученный раствор анализировали методом SIC, разделение осуществлялось на монолитной пористой колонке Chromolith Flash RP-18e. В качестве раствора носителя и подвижной фазы была выбрана смесь ацетонитрила и воды (20:80). Определение проводили при помощи УФ-детектора при длине волны 213 нм. Производительность методики составила 7 проб в час.

Анализ фармацевтической продукции в условиях CIA представлен в единственной работе по спектрофотометрическому определению содержания Fe (II) и Fe (III) в ЛП по реакции с 1,10-фенантролином [28]. Гидравлическая схема CIA отличается от ПИА и SIA техническими решениями системы ввода проб в поток носителя. В этом методе используется специальная CIA-ячейка с цилиндрическими каналами для подачи потоков растворов пробы и реагентов, перпендикулярно расположенными по отношению к каналу с потоком раствора-носителя (Рисунок 5).

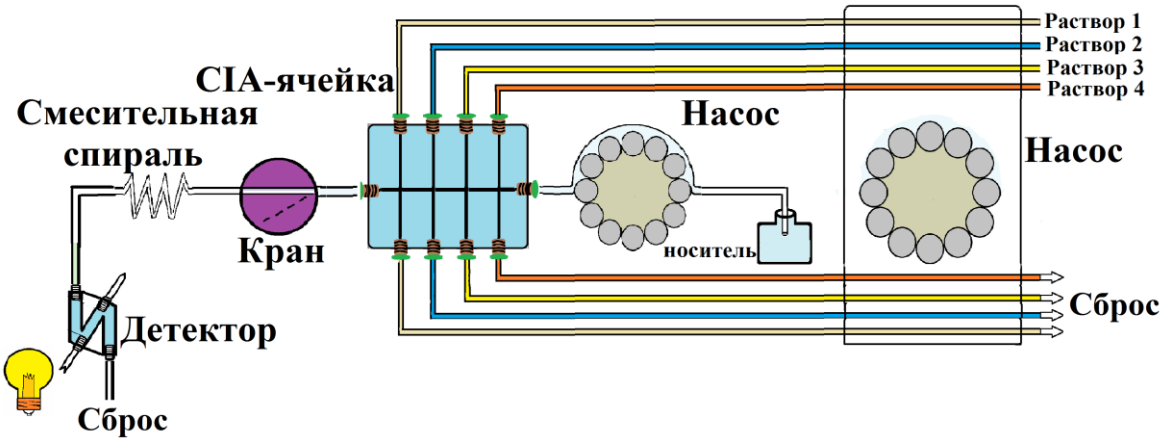


Рисунок 5. Принципиальная схема CIA [28].

Для проведения автоматизированного анализа в вертикальные каналы CIA-ячейки подавали растворы пробы и 1,10-фенантролина. Затем с помощью перистальтического насоса в горизонтальный канал CIA-ячейки подавали раствор носителя – ацетатный буферный раствор (pH=5,2) для перенесения зон пробы и раствора 1,10-фенантролина в смесительную спираль, в которой происходило смешение растворов и образование ферроина. После этого раствор окрашенного комплекса прокачивали в проточный детектор, где происходило измерение аналитического сигнала, который представлял собой концентрационный пик, высота которого пропорциональна содержанию Fe (II). После этого проводили определение содержания общего железа: в вертикальные каналы подавали порции анализируемого раствора, гидроксиламина (восстановитель) и 1,10-фенантролина, после этого насос останавливали и в CIA ячейку с помощью перистальтического насоса подавали раствор носителя – ацетатный буферный раствор (pH=5,2) для перенесения порции пробы и растворов реагентов в смесительную спираль, в которой происходило восстановление ионов Fe (III) и образование ферроина. После этого раствор аналитической формы прокачивали в проточный детектор, где происходило измерение аналитического сигнала, высота которого зависит от содержания ионов Fe (II, III). По разности двух определений устанавливают содержание ионов Fe (III) в пробе. CIA обеспечил производительность – 60 проб в час.

Концепция CIA позволяет устранить необходимость применения кранов и снизить расход реагентов по сравнению с ПИА. Однако существует необходимость

создания индивидуальной топологии СІА-ячейки для решения каждой конкретной аналитической задачи.

Оригинальным вариантом проточных методов, используемым для фармацевтического анализа, является последовательный инжекционный анализ с возобновляемыми колонками (с инжекцией частиц) (**BIA**). В методе BIA (Рисунок 6) суспензия модифицированных частиц инжектируется в поток носителя, которым частицы переносятся в удерживающую спираль, затем инжектируется проба, которая проникает сквозь частицы, в результате чего аналит реагирует с функциональными группами микрочастиц. После этого в систему направляется порция раствора хромогенного реагента, в результате чего происходит образование аналитической формы непосредственно на поверхности модифицированных частиц. На заключительном этапе частицы направляются в проточный детектор, где происходит измерение аналитического сигнала.

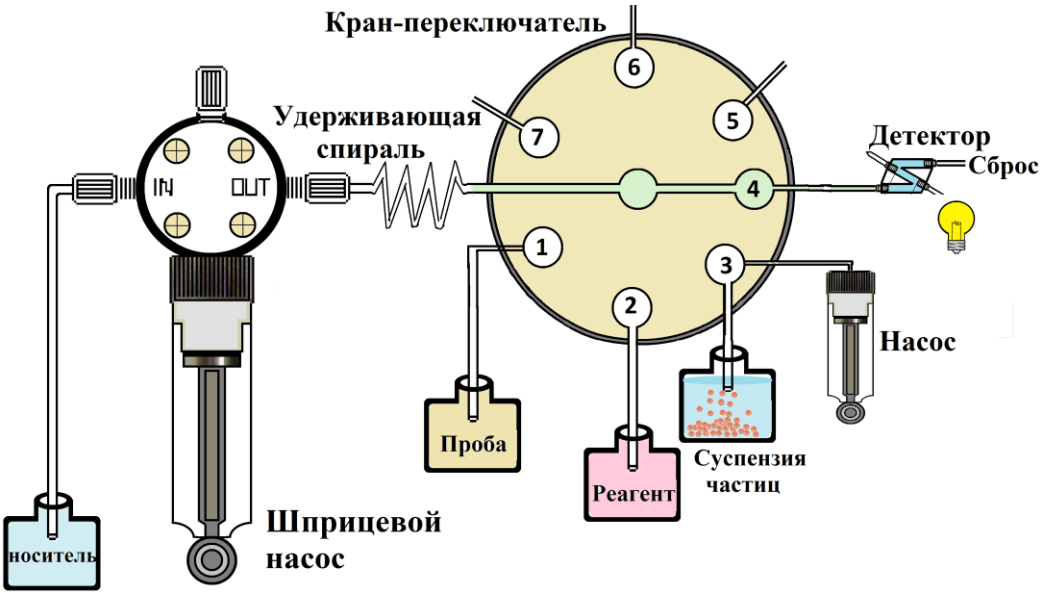


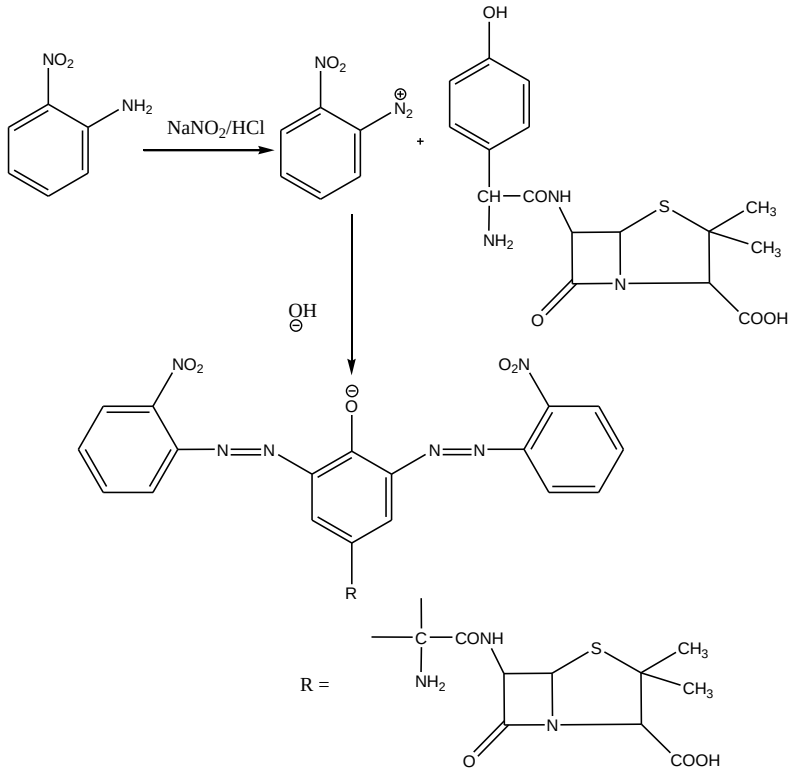
Рисунок 6. Принципиальная схема BIA.

Анализ фармацевтических препаратов в условиях BIA представлен в работе по определению прометазина [29]. Определение основано на окислении прометазина ионами Fe (III). Полученные ионы Fe (II) образуют окрашенный комплекс с реагентом феррозином (Fz). В целях повышения селективности и чувствительности анионный комплекс [Fe (II) Fz_3] $^{4-}$ образуется на поверхности модифицированных частиц Sephadex QAE A-25, размещенных в зоне удерживания. Разработанная методика обеспечила производительность – 12 проб в час.

В методе BIA реализуется эффективное взаимодействие молекул аналита с реагентом на поверхности большого количества модифицированных частиц. Таким образом, происходит значительное повышение эффективности образования аналитической формы, что особенно важно при автоматизации кинетически замедленных реакций. Однако данный метод имеет существенный недостаток, который состоит в необходимости замены удерживающих частиц для каждого последующего анализа вследствие того, что поверхность частиц трудно поддается регенерации.

Проточный фармацевтический анализ с созданием равновесных условий образования аналитических форм аналитов реализован в FBA [30, 31]. Отличием данной разновидности проточных методов является наличие смесительной камеры, объединенной с кюветой проточного детектора соответствующего типа. В этих камерах, снабженных магнитной мешалкой, происходит эффективное перемешивание пробы и растворов реагентов, за счет чего достигаются равновесные условия измерения аналитического сигнала. Однако включение в схему FBA специальных устройств для перемешивания растворов усложняет конструкцию анализатора. При автоматизации спектрофотометрических методик совмещение смесительной камеры с кюветой детектора ограничивает возможности варьирования объема пробы и увеличения длины оптического пути при измерении аналитического сигнала.

В качестве иллюстрации возможностей FBA приводится методика определения амоксициклина в таблетках и капсулах [32]. Методика FBA основана на реакции диазотирования о-нитроанилина с амоксициклином в щелочной среде с образованием окрашенного соединения, имеющего максимум поглощения при длине волны 435 нм:



В предложенной схеме FBA смесительная камера совмещена с фотометрической кюветой, электромагнитное излучение через которую подается посредством двух оптоволоконных кабелей (Рисунок 7).

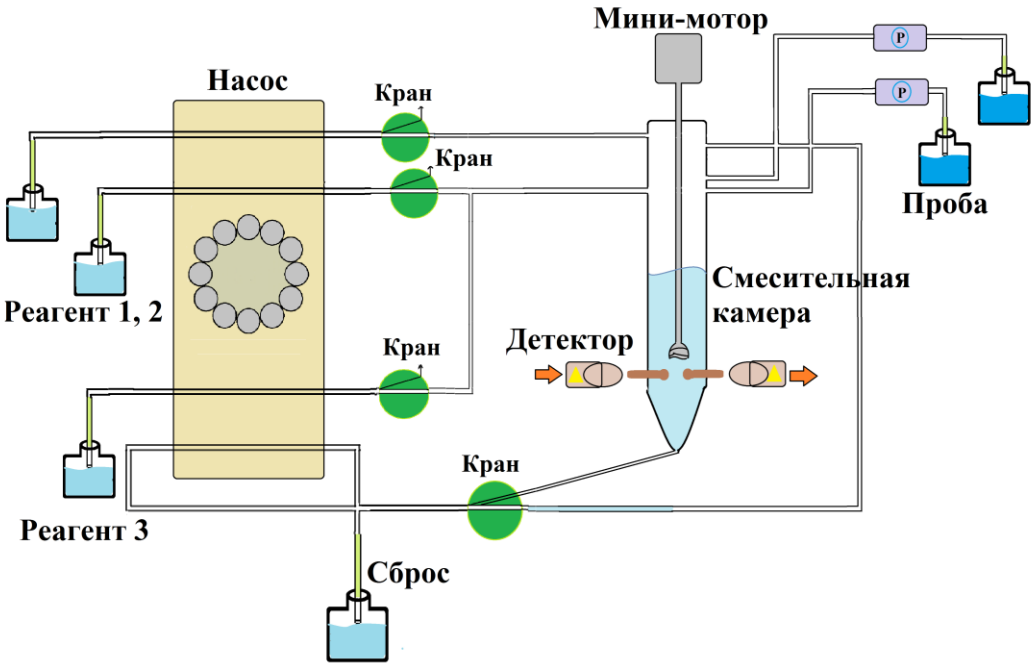


Рисунок 7. Схема FBA для определения амоксициклина в ЛП [32].

В соответствии с разработанной FBA методикой раствор нитрита натрия инжектировали в поток о-нитроанилина и направляли в смесительную камеру. Также в смесительную камеру подавали аликвоты пробы и раствора гидроксида

натрия. В смесительной камере с помощью вкладыша магнитной мешалки происходило перемешивание раствора, образование продукта реакции и измерение аналитического сигнала при длине волны 435 нм. Производительность методики – 50 проб в час. Методика показала хорошую воспроизводимость (СКО=3,7 %) и была использована для анализа различных ЛП.

Последним вариантом из равновесных проточных методов, предложенным для фармацевтического анализа, является ЦИА [33, 34]. В отличие от аналогов в схему ЦИА для обеспечения равновесных условий образования аналитической формы включена реакционная емкость (**РЕ**), перемешивание растворов в которой осуществляется потоком газа, как правило, воздухом. Основная концепция ЦИА предполагает строгое воспроизведение всех стадий анализа, характерных для статических методик, что значительно упрощает их автоматизацию и адаптацию методик ЦИА в лабораториях. Принципиальная схема ЦИА для автоматизации методик анализа жидких, газообразных и легкорастворимых твердофазных проб независимо от применяемых методов детектирования представлена на рисунке 8. Несомненным преимуществом метода ЦИА явилась унификация гидравлических схем, исключившая необходимость их перекомпоновки при переходе от одной методики анализа к другой.

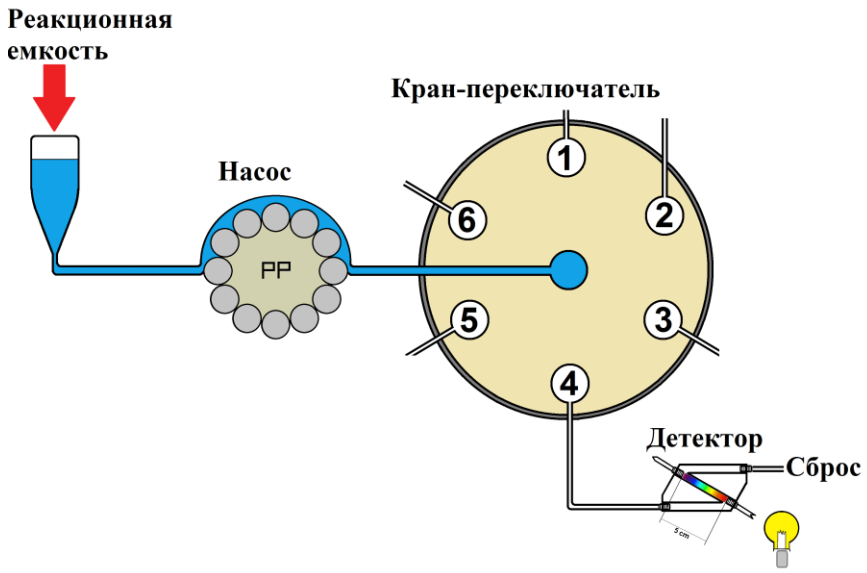


Рисунок 8. Принципиальная схема ЦИА [33].

Анализ фармацевтических препаратов в условиях ЦИА проиллюстрирован в работе по спектрофотометрическому определению аскорбиновой кислоты в ЛП

[35]. В ее основе лежит экспрессная реакция АК с реагентом – гуанидиниевой солью 11-молибдовисмутофосфорной гетерополикислоты (МВФК). Для этого через кран-переключатель с помощью реверсивного насоса в РЕ подавали 0,3 мл раствора ЛП, 0,1 мл раствора МВФК, 0,1 мл H_2SO_4 и поток азота, обеспечивающий перемешивание растворов в РЕ (Рисунок 9). После этого раствор аналитической формы из РЕ при переключении крана-переключателя и реверса насоса перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора, измеряли оптическую плотность раствора и раствор сбрасывали. Предел обнаружения АК методом ЦИА составил $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ г/л, производительность – 12 проб/час.

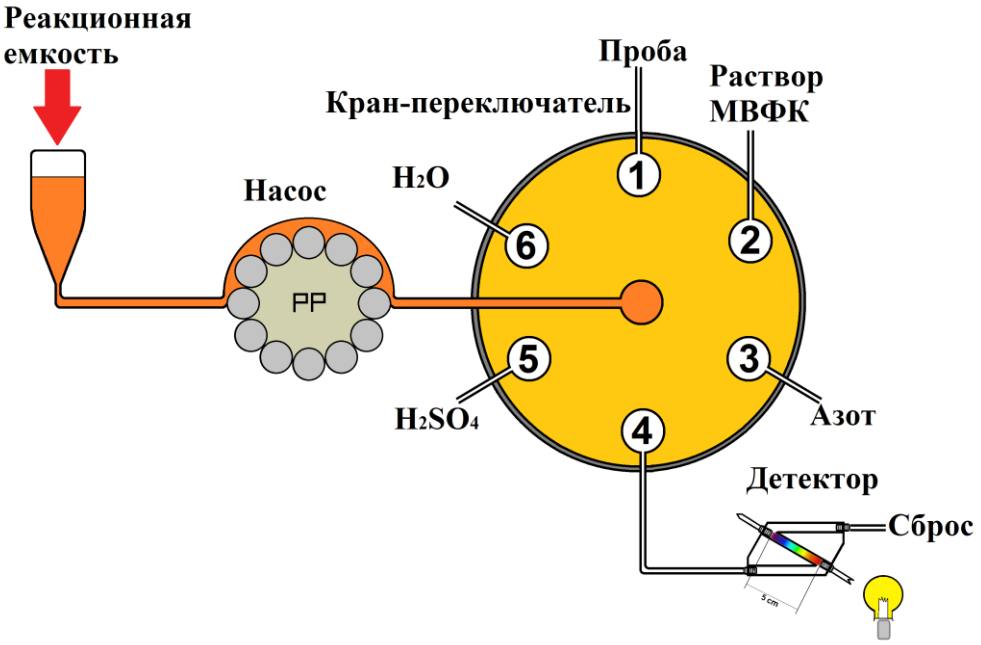


Рисунок 9. Схема определения АК в условиях ЦИА по реакции с МВФК [35].

Все проточные методы анализа преимущественно ориентированы на анализ растворов. Как правило, твердые пробы требуют предварительной пробоподготовки, чтобы сформировать жидкую пробу аналита, и в этом случае основные этапы пробоподготовки проводятся в статическом режиме [36–38]. В случае анализа легкорастворимых твердофазных проб ЛП, стадия растворения может быть включена в общую схему проточного анализа.

В работе [39] показана возможность автоматизации растворения лекарственного препарата «Лендормин» в условиях ПИА с последующим анализом приготовленного раствора на содержание в нем активного компонента –

бротизолама. Для этого 6 точно взвешенных таблеток помещали в специальное устройство – систему для автоматизированного растворения (Рисунок 10). При помощи ПИА системы автоматически с помощью насосов в сосуды подавали порции растворителя (по 500 мкл дистиллированной воды) и в течение 30 минут при постоянном перемешивании и температуре 37 ^{o}C происходило растворение таблетированных проб. Затем аликвоту пробы объемом 100 мкл при помощи крана-дозатора помещали в непрерывный поток носителя – 0,2 М раствор соляной кислоты. Растворы через реакционную спираль проходили к флуориметрическому детектору и далее на сброс. Длина волны возбуждения – 300 нм, длина волны испускания – 480 нм. Производительность составила 200 проб в час.

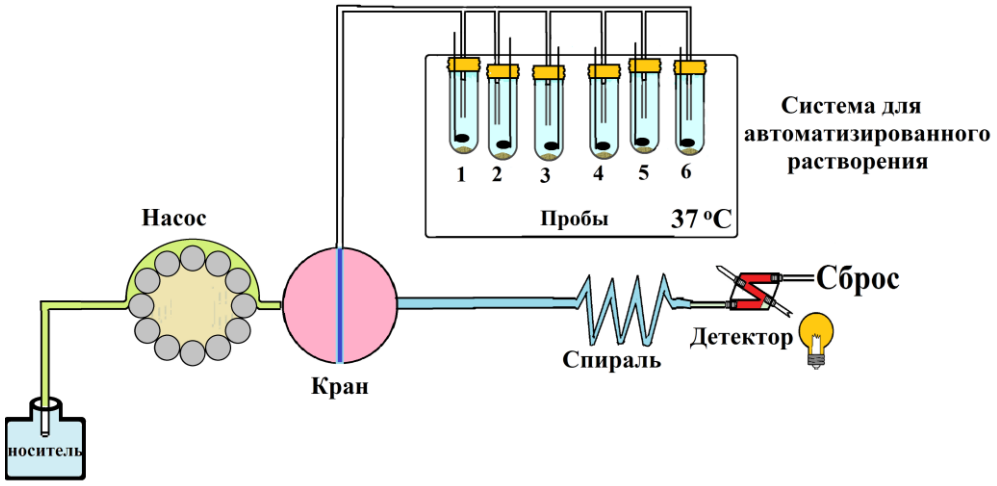


Рисунок 10. Схема ПИА с автоматизированным растворением твердофазных проб [39].

Возможность автоматизации растворения и анализа твердофазных образцов в условиях SIA проиллюстрирована в работе [40] на примере анализа таблеток ибупрофена. Шесть из десяти портов крана-переключателя были подключенных к шести сосудам (Рисунок 11). В них помещали образцы и порции растворителя (фосфатный буферный раствор). На концах шести кранов располагались мембранные фильтры. В течение 30 минут при постоянном перемешивании и термостатировании (t = 37,0±0,5 ^{o}C) проводили растворение проб. Затем с помощью шприцевого насоса в удерживающую спираль подавали раствор носителя – 200 мкл дистиллированной воды. Далее при помощи крана-переключателя и насоса в удерживающую спираль подавали 600 мкл растворенной

пробы. Затем 400 мкл пробы подавали обратно в сосуд для промывки мембранного фильтра. Раствор из спирали прокачивали в детектор, где происходило измерение его оптической плотности при λ=222 нм. После этого проводили промывку спирали раствором носителя и измерение оптической плотности стандартного раствора ибупрофена. Производительность составила 42 пробы в час.

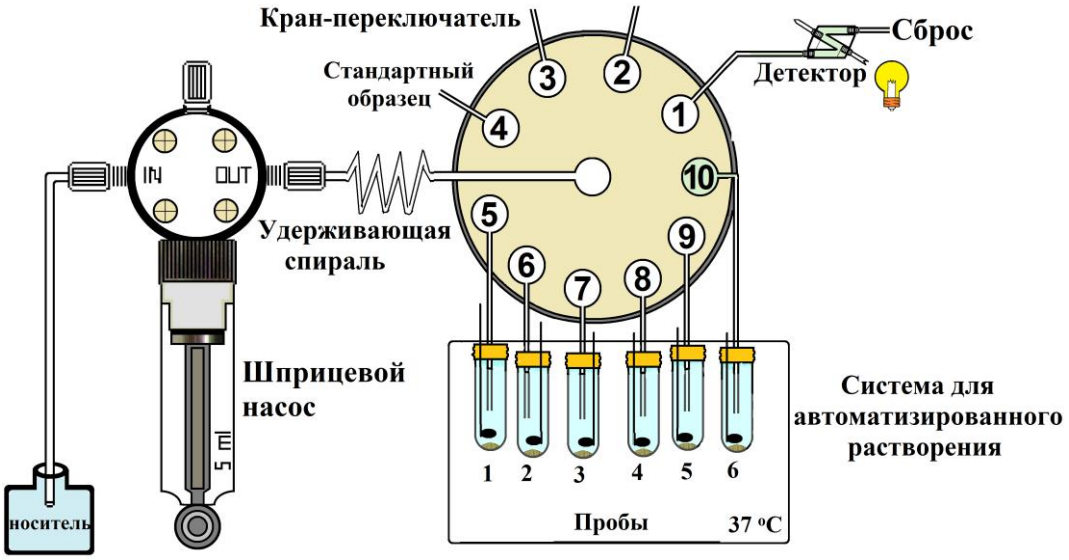


Рисунок 11. Схема SIA с автоматизированным растворением твердофазных проб [40].

Однако в случае определения АК, флавоноидов или антрахинонов в ЛРС или ЛП стадия растворения или извлечения аналитов из твердофазных проб не включена в общую схему проточного анализа (Таблица 1).

Таблица 1. Сравнительная таблица проточных методов определения АК, флавноидов и антрахинонов в ЛРС и ЛП.

Аналит	**Полнота автоматизации**	**Производительность, проб/час**	**Предел обнаружения**	**Метод определения**	**Литература**
Аскорбиновая кислота	Нет	15	$0{,}4\cdot10^{-3}$ г/дм^3	SIA с спектрофотометрическим детектированием	[25]
	Нет	60	$0{,}15\cdot10^{-3}$ г/дм^3	SIA с спектрофотометрическим детектированием	[24]

	Нет	180	$0,5 \cdot 10^{-3}$ г/дм^3	ПИА с спектрофотометрическим детектированием	[135]
	Нет	12	$1,5 \cdot 10^{-2}$ г/дм^3	ЦИА с спектрофотометрическим детектированием	[35]
Флавоноиды	Нет	80	$2 \cdot 10^{-3}$ г/дм^3	ПИА с хемилюминесцентным детектированием	[22]
	Нет	30	До 10^{-8} г/дм^3	ПИА с электрохимическим детектированием	[57]
Антрахиноны	Частично	2	-	Проточное извлечение с спектрофотометрическим детектированием	[99]

В таблице 2 приведены аналитические характеристики некоторых автоматизированных методик анализа фармацевтической продукции. Из представленных данных видно, что максимальная производительность фармацевтического анализа обеспечивается в условиях ПИА и SIA и может достигать до 200 проб в час. Кроме того, все проточные методы можно разделить по способу детектирования аналита в анализируемой пробе. В проточных методах встречаются спектральные, электрохимические и гибридные методы определения веществ.

Таблица 2. Аналитические характеристики проточных методик анализа фармацевтической продукции.

Определяемое вещество	**Матрица**	**Метод определения**	**Производительность, определений/час**	**Диапазон определяемых концентраций**	**Литература**
Диазепам	Таблетки	ПИА с	100	$(2–110) \cdot 10^{-3}$	[12]

		спектрофотометрическим детектированием в УФ-области		г/дм^3	
Венлафаксин	Таблетки	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в УФ-области	30	(30–150)·10^{-3} г/дм^3	[13]
Кетопрофен	Гели и ампулы	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в УФ-области	85	(7,5–75)·10^{-3} г/дм^3	[14]
Катехоламины	Таблетки	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	180	Метилдопа: (1–50)·10^{-3} г/дм^3 Допамин: (2–50)·10^{-3} г/дм^3 Адреналин: (5–70)·10^{-3} г/дм^3	[15]
Леводопа	Таблетки	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	130	(4,1–20,3)·10^{-4} моль/дм^3	[16]
Бенсеразид	Таблетки	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	21	(0,85–4,25)·10^{-4} моль/дм^3	[16]
Дифенилгидрамин	Капсулы, сироп	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	100	Капсулы: (5–21)·10^{-3} г/дм^3 Сироп: (75–188)·10^{-3} г/дм^3	[17]
Лимонная кислота	Сиропы, соки, фрукты, порошки	ПИА с потенциометрическим детектированием	65	(3,84–91,2)·10^{-6} моль/дм^3	[18]
Парацетамол	Таблетки	ПИА с	-	2,5·10^{-6}–1·10^{-3}	[19]

		амперометрическим детектированием		моль/дм^3	
Мелатонин	Таблетки	ПИА с амперометрическим детектированием	135	$1\cdot10^{-8}$–$1\cdot10^{-5}$ моль/дм^3	[20]
Аскорбиновая кислота	Таблетки	ПИА с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	40	$(0,8–3,52)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[21]
Кверцетин	ЛРС	ПИА с хемилюминесцентным детектированием	80	$(6–12)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[22]
Бромазепам	Таблетки	SIA с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	20	(0,1–8) г/дм^3	[41]
Триметоприм	Таблетки	SIA с хемилюминесцентным детектированием в видимой области	120	$(0,5–100)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[42]
Прометазин	Таблетки, сиропы	SIA с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	200	$(5–40)\cdot10^{-5}$ моль/дм^3	[43]
Рибофлавин	Мультивитаминные таблетки	SIA с вольтамперометрическим детектированием	40	$(0,01–0,8)\cdot10^{-6}$ моль/дм^3	[44]
Каптоприл	Таблетки	SIA с потенциометрическим детектированием	140	$2\cdot10^{-4}$–$1,4\cdot10^{-3}$ моль/дм^3	[45]
Диклофенак	Таблетки	SIA с потенциометрическим детектированием	32	$1\cdot10^{-6}$–$1\cdot10^{-4}$ моль/дм^3	[46]

Витамин B_6	Таблетки	SIA с потенциометрическим детектированием	-	$(6,5–31)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[47]
Аскорбиновая кислота	Таблетки	SIA с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	60	0,4–1,2 г/дм^3	[48]
Амброксол	Мультивитамины	SIC с спектрофотометрическим детектированием в УФ-области	7	$(2–100)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[27]
Доксициклин	Мультивитамины	SIC с спектрофотометрическим детектированием в УФ-области	7	$(2–100)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[27]
Fe (II), Fe (III)	Витамины	CIA с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	60	$(5–20)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[28]
Амоксициклин	Таблетки	FB с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	50	$(25–400)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[32]
Протемазин	Таблетки	BIA с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	12	$(0,5–8)\cdot10^{-3}$ г/дм^3	[29]
Аскорбиновая кислота	Таблетки	ЦИА с спектрофотометрическим детектированием в видимой области	12	0,05–0,3 г/дм^3	[35]

Наиболее часто для проточного фармацевтического анализа используют спектральные методы детектирования, в т.ч. спектрофотометрию [15–17, 49–52]. Это связано с тем, что спектральные детекторы обеспечивают высокую

воспроизводимость и чувствительность анализа, что позволяет достигать низких пределов обнаружения, а также высокую точность получаемых результатов. Кроме того, данные методы детектирования отличаются экспрессностью, доступностью и простотой эксплуатации оборудования. Однако недостатком является ограниченная селективность методик в связи с отсутствием в большинстве случаев специфических реагентов.

При проточном анализе фармацевтической продукции с электрохимическим способом детектирования обычно применяются потенциометрические [18], амперометрические [19, 20] и вольтамперометрические детекторы [53–56]. Электрохимические детекторы характеризуются высокой чувствительностью, возможностью достигать низкие пределы обнаружения, высокой селективностью, особенно при использовании био- и иммуносенсоров. В целом, однако, электрохимическое детектирование в условиях проточного анализа встречается реже, чем спектральное. Это связано с проблемой использования электродов в массовых анализах вследствие того, что либо необходимо обновлять поверхность электрода, что приводит к плохой воспроизводимости результатов в сравнении со спектральными методами, либо использовать для анализа электроды одноразового использования, такие как screen-printed электроды, что не всегда выгодно с экономической точки зрения.

Возможность инверсионно-вольтамперометрического детектирования в условиях ПИА была рассмотрена на примере определения двенадцати флавоноидов (физетина, галангина, гесперетина, гесперидина, кемпферола, морина, мирицетина, нарингина, кверцетина, кверцитрина, рутина, рамнетина) в поливитаминах [57]. В качестве рабочих электродов использовались углеродно-пастовые электроды на основе смесей нуйол – графит и дифениловый эфир – графит (Рисунок 12).

Анализируемые капсулы разрезали на две части. Масляные составные части капсулы, включая оболочку, растворяли в 50 % растворе этанола путем нагревания при температуре 45 °С в УЗ-поле в течение 15 мин. Отфильтрованные 4 мл аликвоты раствора в дальнейшем разбавляли этанолом и буферным раствором

(pH=5,0). Раствор анализируемого образца инжектировали в поток носителя ПИА-анализатора и направляли в проточную ячейку, где снимали вольтамперограмму. Производительность разработанной методики составила 30 проб в час.

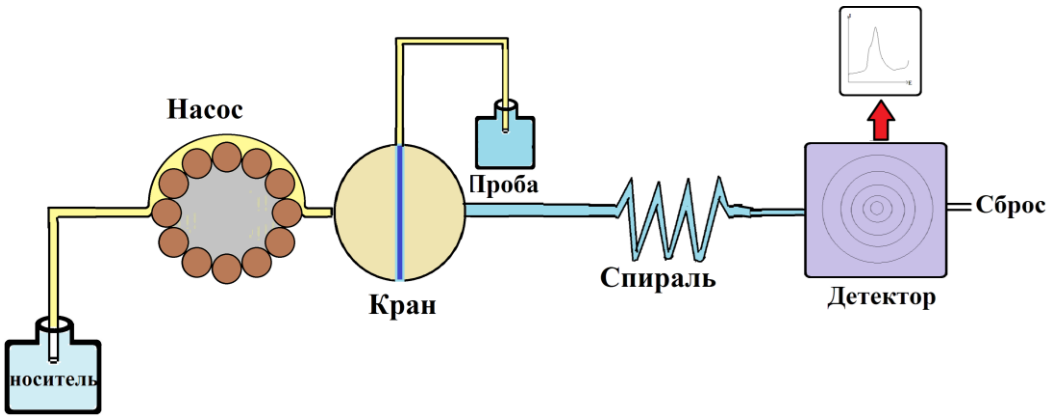


Рисунок 12. Схема ПИА определения флавоноидов в сочетании с инверсионной вольтамперометрией [57].

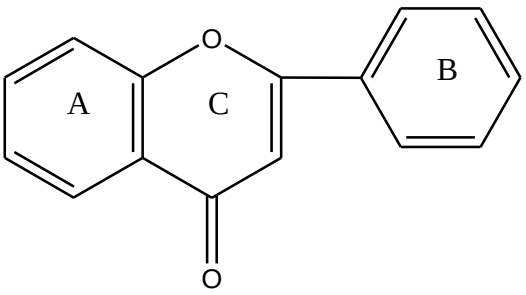
В последнее время появились работы, в которых показана возможность сочетания проточного фармацевтического анализа с методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) [58], газовой хроматографии (**ГХ**) [59] и капиллярного электрофореза (**КЭ**) [60]. Чаще всего для анализа фармацевтической продукции используется ВЭЖХ. В сравнении с ГХ данный метод детектирования более подходит для анализа ЛП, вследствие недостаточной термической устойчивости или низкой летучести большинства определяемых соединений, что делает непригодным детектирование методом ГХ. В сравнении с ВЭЖХ КЭ имеет более высокую эффективность, а также является менее длительным методом анализа. Главным достоинством гибридных методов является высокая селективность, что позволяет определять соединения со схожей структурой, в том числе изомеры. Также гибридные методы характеризуются высокой чувствительностью, использованием небольших объемов проб и реагентов. Однако в сравнении со спектральными и электрохимическими методами гибридные обладают рядом недостатков, такими как длительность анализа, использование дорогостоящих приборов, сложность в эксплуатации и в автоматизации оборудования. К тому же к недостаткам гибридных методов стоит отнести необходимость предварительного отделения некоторых вспомогательных веществ,

в частности суспендирующих агентов, быстро выводящих из строя хроматографические колонки.

Возможность сочетания ВЭЖХ и проточных методов была проиллюстрирована в работе по определению 4 хинонов в ЛП [61]. Пробоподготовка основана на УФ-облучении хинонов, при котором образуются пероксид водорода и 3,6-дигидроксифталевая кислота. Предполагаемый механизм реакции основан на дальнейшем взаимодействии 3,6-дигидроксифталевой кислоты с продуктом реакции пероксида водорода и бис-(2,4,6-трихлорфенил) оксалата, 1,2-диоксэтандионом с высокой энергией. 1,2-диоксэтандион передает свою энергию 3,6-дигидроксифталевой кислоте, в результате чего наблюдается испускание света возбужденным флуорофором при его возвращении в основное состояние. Время разделения хинонов составило 25 минут. В качестве раствора носителя использовали смесь имидазолового буферного раствора (pH=7,5) и ацетонитрила (95:5). Скорость потока – 0,56 мл/мин. Пределы обнаружения составили $6{,}0\cdot10^{-9}$ моль/дм^3, $4{,}4\cdot10^{-9}$ моль/дм^3, $0{,}2\cdot10^{-9}$ моль/дм^3 и $0{,}45\cdot10^{-9}$ моль/дм^3 для 1,2-нафтохинона, 1,4-нафтохинона, 9,10-антрахинона и 9,10-фенантренхинона соответственно.

1.2. Фармакологические и биологические свойства флавоноидов, антрахинонов и аскорбиновой кислоты

Флавоноидами называется группа природных веществ – производных бензо-γ-пирона, в основе которых лежит скелет, состоящий из двух бензольных колец (А и В), соединенных между собой трехуглеродной цепочкой (пропановый скелет), т.е. состоящий из C_6-C_3-C_6 углеродных единиц. Это гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце [62]. Флавоноиды входят в состав многих препаратов растительного происхождения, к которым в настоящее время проявляется пристальное внимание, как к наиболее безопасным лекарственным средствам [63–65].



Флавон

Фармакотерапевтические действия флавоноидов:

– повышают прочность стенок капилляров (Р-витаминная активность) за счет антиоксидантного действия, что важно при лечении хронической венозной недостаточности, гипертонии и других сердечно-сосудистых заболеваниях, связанных с увеличением проницаемости кровеносных капилляров;

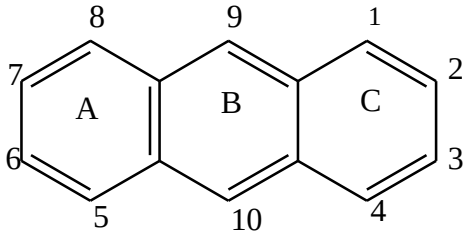
– усиливают действие аскорбиновой кислоты;

– седативное действие;

– противовоспалительное и противоязвенное действия;

– кровоостанавливающее действие [66, 67].

Антрахиноны – большая группа природных соединений, в основе которых лежит ядро антрацена (окисленное по среднему кольцу В).



Антрацен

Фармакотерапевтическое действие антрахинонов в большой степени зависит от их химического строения:

– слабительное действие антрахиноны проявляют только в толстом кишечнике, где они гидролизуются под действием кишечной флоры. Образовавшиеся агликоны раздражают стенки прямой кишки и усиливают ее перистальтику. Послабляющее действие развивается медленно и длительно (в течение 8–10 часов). В качестве слабительных антрахиноны используются в пожилом возрасте, когда замедляется подвижность кишечника;

– диуретическое и нефролитическое действие проявляется в разрыхлении камней в почках (фосфаты, карбонаты и ураты кальция и магния) с последующим выведением их из организма. Применяют при почечнокаменной болезни для уменьшения спазмов и облегчения отхождения мелких камней;

– антибактериальное и противовоспалительное действие;

– стимулирующее и регенерирующее действие;

– желчегонное действие [68].

Аскорбиновая кислота (АК) – g-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты. АК является водорастворимым витамином [69].

Фармакологические и биологические свойства АК:

– антиоксидантная функция (окислительно-восстановительные свойства), т.е. способность обратимо окисляться и восстанавливаться. Это обуславливает ведущую роль АК в тканевом метаболизме, связанную с процессами транспорта электронов. АК нейтрализует супероксид-анион радикал до пероксида водорода;

– АК активизирует ряд ферментов, участвующих в метаболизме фолиевой кислоты, синтезе стероидных гормонов и катехоламинов, ингибирует ферменты, содержащие медь;

– АК, наряду с АТФ, необходима для осуществления транспорта железа плазмы и включения его в состав тканевого ферритина (переводит трёхвалентное железо в двухвалентное, тем самым способствует его всасыванию);

– предупреждает образование липопротеинов, вызывающих закупорку артерий, следовательно, АК необходима при сердечно-сосудистых патологиях;

– общеукрепляющее и стимулирующее иммунную систему средство при различных болезнях (простудных, онкологических и т. д.);

Также АК регулирует свертываемость крови, нормализует проницаемость капилляров, необходима для кроветворения, оказывает противовоспалительное и противоаллергическое действие [70]. Недостаток АК в организме проявляется в потере аппетита, анемии, быстрой утомляемости, неясных болях в различных частях тела, склонности к кровотечениям и инфекционным заболеваниям дыхательных путей.

Применение АК для медицинских целей дает исключительно большой эффект при лечении различных заболеваний; в частности, АК способствует заживлению ран, сращению переломов, а также рекомендуется при артериосклерозе, остром инфекционном гепатите, стоматите и тромбозах [71]. Существуют данные, показывающие профилактическую роль АК в отношении рака толстой кишки, пищевода, мочевого пузыря и эндометрия [72].

В таблице 3 приведена информация о содержании флавоноидов, антрахинонов и АК в различном ЛРС [73].

Таблица 3. ЛРС, содержащее флавоноиды, антрахиноны и аскорбиновую кислоту.

БАВ	**Лекарственное растительное сырье**	**Содержание БАВ, %**
Флавоноиды	Цветки бессмертника песчаного	>6 (в пересчете на изосалипурпозид)
	Цветки пижмы	>2,5 (в пересчете на лютеолин)
	Листья вахты трехлистной	>1 (в пересчете на рутин)
	Плоды боярышника	>0,06 (в пересчете на гиперозид)
	Трава сушеницы топяной	>0,2 (в пересчете на гнафалозид А)
	Трава зверобоя	>1,5 (в пересчете на рутин)
	Трава горца птичьего	>0,5 (в пересчете на авикулярин)
	Трава горца перечного	>0,5 (в пересчете на кверцетин)
Антрахиноны	Кора крушины	>4,5 (в пересчете на истизин)
	Листья сенны	>1,35 (в пересчете на хризофановую кислоту)
	Корни ревеня	>2 (в пересчете на истизин)
	Корневища и корни марены	>3 (в пересчете на ализарин)
Аскорбиновая	Плоды шиповника	>0,2

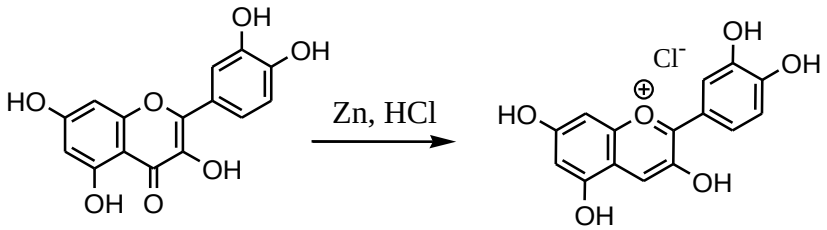
кислота	Плоды калины	>0,03
	Плоды рябины	>0,02

1.3. Методы определения флавоноидов в лекарственных препаратах и лекарственном растительном сырье

Все методы определения флавоноидов можно разделить на две группы: методы, которые подразумевают определение общего содержания флавоноидов (спектрофотометрические и электрохимические методы) и методы, направленные на определение индивидуальных веществ (хроматографические методы).

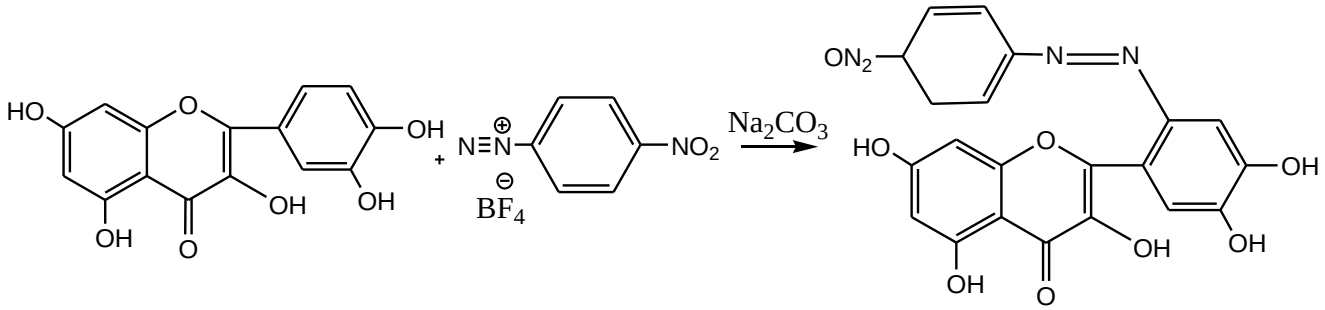
Классической схемой определения суммы флавоноидов в фармацевтическом анализе является методика, основанная на образовании окрашенных комплексов при их взаимодействии с ионами алюминия (III) в спиртовой среде [73, 74, 75]. Процесс извлечения флавоноидов из ЛРС проводят с использованием 50 % раствора этанола на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Эта методика широко используется для анализа различного лекарственного сырья. Содержание флавоноидов в ЛРС пересчитывают на рутин.

Предложена высокоселективная спектрофотометрическая методика определения дигидрокверцетина в ЛРС [76], в основе которой лежит реакция образования цианидинхлорида из дигидрокверцетина при обработке реакционной смеси цинковой пылью в присутствии соляной кислоты:



Оптимальная длина волны $\lambda_{макс}$= 550 нм. Диапазон определяемых концентраций дигидрокверцетина составляет $(2{,}46–16{,}38)\cdot 10^{-5}$ моль/дм^3. Предложенная методика использована для определения содержания дигидрокверцетина в образцах древесины лиственницы сибирской.

Авторами [77] в качестве фотометрического реагента для определения флавоноидов предложен тетрафторборат 4-нитрофенилдиазония (4-НФД). Показано, что в щелочной среде 4-НФД вступает в реакцию азосочетания с кверцетином, нарингенином, хризином, морином, рутином и нарингином с образованием окрашенных в желто-оранжевый цвет продуктов реакции:



Максимумы поглощения спектров азосоединений флавоноидов находятся при 425–435 нм в зависимости от природы флавоноида. Пределы обнаружения разработанной методики составили $(1{,}5–3{,}9)\cdot10^{-7}$ М. С помощью разработанной методики проведено определение кверцетина в лекарственных препаратах «Липофлавон», «Корвитин» и «Кверцетин».

Авторами [78] разработана методика одновременного определения катехина, кверцетина и нарингенина по реакции восстановления ионов Cu (II) молекулами флавоноидов с дальнейшим спектрофотометрическим детектированием комплекса ионов Cu (I) с неокупроином. Предложено использование хемометрических методов для обработки кинетических зависимостей, полученных для указанных флавоноидов. Пределы обнаружения составили $(7{,}5,\ 5{,}7,\ 6{,}3)\cdot10^{-5}$ г/дм^3 для катехина, кверцетина и нарингенина соответственно.

В основу высокочувствительной полярографической методики определения флавоноидов положено их восстановление на ртутном капающем электроде. Флавоноиды определяют при потенциале полуволны 1,5 В. К недостаткам методики можно отнести её низкую селективность из-за близких величин потенциалов полуволн примесных компонентов [79].

Разработана методика электрохимического определения кемпферола с помощью пиролитического графитового электрода и гемоглобин/полисорб-20 модифицированного электрода. Диапазон линейности разработанной методики от

$4 \cdot 10^{-7}$ до $4 \cdot 10^{-5}$ М, предел обнаружения $1 \cdot 10^{-7}$ М. Относительное стандартное отклонение составило 3,3 % [80].

Авторами [81] была разработана методика определения кверцетина при помощи дифференциальной импульсной вольтамперометрии с использованием модифицированного электрода с полимерной пленкой из полипиррола. Диапазон линейности от $6{,}0 \cdot 10^{-7}$ до $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ М, предел обнаружения $4{,}8 \cdot 10^{-8}$ М.

В работе [82] предложен новый метод твердофазной флуоресценции для определения кверцетина в луке. Комплекс кверцетин – Al (III) образуется непосредственно в микропорах полипропиленовой мембраны. Данная мембрана является селективной, стабильной и чувствительной по отношению к кверцетину даже в присутствии структурно подобных соединений. Диапазон определяемых концентраций разработанной методики составил $(0{,}02–0{,}80) \cdot 10^{-3}$ г/дм^3 с пределом обнаружения – $5 \cdot 10^{-6}$ г/дм^3. Относительное стандартное отклонение 4,1 %.

Разработана флуориметрическая методика [83] тест-определения кверцетина, рутина и морина в экстрактах и настоях лекарственных растений по реакции образования комплексов с лантаноидами (III). Также была показана возможность повышения интенсивности флуоресценции в присутствии лаурилсульфата натрия и альбумина.

Разработана методика ВЭЖХ с УФ-детектированием определения витексина-2-рамнозида, рутина, гиперозида и проведена оптимизация пробоподготовки сухого экстракта боярышника в виде таблеток для рассасывания. Извлечение аналитов проводили метанолом при 60 ^{o}С. Максимумы поглощения витексина-2-рамнозида, рутина и гиперозида фиксировали при 341, 358, 354 нм соответственно. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила, метанола и фосфатного буферного раствора. Разделение проводили на обращенно-фазовой колонке С 18. Время анализа 12 минут. Пределы обнаружения составляют для витексина-2-рамнозида, рутина и гиперозида 0,5; 0,5; 0,3 мг/дм^3 соответственно [84].

Авторами [85] представлена ВЭЖХ методика количественного определения флавоноидов в соцветиях лабазника вязолистного. Для экстракции аналитов

использовали 40 % этанол. Определение флавоноидов проводили на обращенно-фазовой колонке (С 18) в изократическом режиме элюирования. В качестве подвижной фазы использовали смесь раствора KH_2PO_4 (pH=3,0) и ацетонитрила. Методика позволила достигнуть диапазонов определяемых концентраций от $1 \cdot 10^{-2}$ до 2,5 г/дм^3 и от $5{,}6 \cdot 10^{-3}$ до 0,5 мг/дм^3 для растворов спиреозида и кверцетина соответственно.

Разработана ВЭЖХ методика определения флавоноидов в зверобое пятнистом [86]. В работе использовали водно-спиртовое извлечение, полученное из травы зверобоя пятнистого с использованием 70 % этилового спирта. Анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме. Подвижной фазой в анализе служила смесь ацетонитрила и воды с добавлением уксусной кислоты. Скорость потока при анализе составляла 0,1 мл/мин. Детектирование флавоноидов проводили при длине волны λ_{max}=360 нм. Пределы обнаружения составили $(3–10) \cdot 10^{-6}$ г/дм^3 для различных флавоноидов.

Разработана методика одновременного определения девяти флавоноидов методом капиллярного электрофореза в ЛРС Анафалиса жемчужного [87]. Разделение флавоноидов проводили при использовании 25 мМ раствора $Na_2B_4O_7$ и 10 мМ фосфатного буферного раствора (pH=9,6), при напряжении 20 кВ и при λ_{max}=245 нм. Пределы обнаружения составили $(1–7) \cdot 10^{-4}$ г/дм^3.

1.4. Методы определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье

На сегодняшний день разработано большое количество методик определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье. Каждая из методик, несомненно, имеет свои преимущества и может быть использована для определения АК в том или ином объекте анализа [72].

Классическим является окислительно-восстановительное титрование водных растворов АК или водных растворов с добавлением органических растворителей (хлороформа, дихлорэтана, толуола, ксилола) раствором 2,6–

дихлорфенолиндофенола (**2,6-ДФИФ**). Принцип методики основан на способности АК восстанавливать окрашенный 2,6-ДФИФ, до бесцветной лейкоформы 2,6-ДФИФ. Количественное определение АК проводят, титруя исследуемый раствор, солянокислым раствором 2,6-ДФИФ. В конечной точке титрования наблюдается появление розового цвета, обусловленного окраской 2,6-ДФИФ в кислой среде [73, 88].

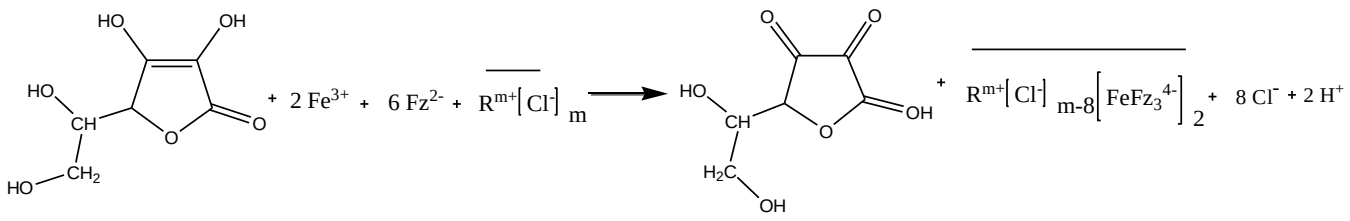
Спектрофотометрические методы определения АК могут быть разделены на две группы: методы, основанные на измерении оптической плотности непосредственно растворов АК и методы, основанные на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся в результате восстановления различных реагентов АК.

Предложена методика УФ-спектрофотометричекого определения АК и тиамина [89], в которой используют первую производную спектральных пиков при λ = 215 нм для АК и 254 нм для гидрохлорида тиамина. Градуировочный график линеен в диапазоне $(1,5–3,0)\cdot10^{-3}$ г/дм^3 для АК и $(0,9–2,4)\cdot10^{-3}$ г/дм^3 для тиамина.

В работе [90] в качестве аналитического сигнала использовали поглощение при 245 нм для АК и 250 нм для гидрохлорида тиамина. Матричные эффекты устранялись при кипячении проб с 1 М раствором NaOH для АК или с раствором боратного буфера при pH=10 для гидрохлорида тиамина. Градуировочный график линеен в диапазоне $(2–50)\cdot10^{-3}$ г/дм^3 для АК и $(3–30)\cdot10^{-3}$ г/дм^3 для гидрохлорида тиамина.

Авторами [91] была разработана методика определения АК, основанная на взаимодействии АК с ионами железа (III) с последующим образованием железа (II) и его детектированием в форме комплекса с 2-(5-бромо-2-пиридилазо)-5-диэтиламинофенолом (ε_{560} = $1,3\cdot10^5$ л·моль$^{-1}$·см$^{-1}$). Разработанная методика является высокочувствительной (предел обнаружения $0,2\cdot10^{-4}$ г/дм^3) и селективной для определения АК в ЛП.

Методика [92] основана на восстановлении ионов Fe (III) АК с последующим образованием хелатного комплекса Fe (II) с феррозином и его спектрофотометрическим определением:



Аскорбиновая Кислота	Анионнообменная смола (бесцветный)	Дегидроаскорбиновая кислота	Анионнообменная смола с комплексом (пурпурный)

Особенность данной методики состоит в том, что образованный хелатный комплекс количественно сорбируется на анионнообменные смолы, что позволяет достичь предела обнаружения 0,91 мкг/дм^3. В методике [93] осуществляют экстракцию комплекса Fe (II) с пиколиновой кислотой пиридином. Градуировочный график линеен в диапазоне (0,4–5,6) $\cdot 10^{-3}$ г/дм^3.

Разработана флуориметрическая методика [94] определения АК в ЛРС. В этой методике определяют интенсивность флуоресценции продукта конденсации дегидроаскорбиновой кислоты (**ДАК**) с о-фенилендиамином. При этом для проведения реакции окисления АК в ДАК в качестве катализатора использовали ионы меди (II).

Разработана кулонометрическая методика определения АК в ЛРС и фитопрепарате «Сироп из плодов шиповника» с помощью электрогенерированного йода с биамперометрической индикацией конечной точки титрования [95].

Авторами [88] разработана методика определения АК в плодах эмблики, гуавы, зеленом чили и листьях амаранта методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

Методика определения АК [96] в плодах шиповника основана на использовании ВЭЖХ с применением УФ-детектора (245 нм). Извлечение АК из ЛРС проводили при 10 ^{o}C в течение 4 часов. Для хроматографического анализа использовали колонку С 18, элюент – смесь растворов NaH_2PO_4 (pH=2,25) и ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы составляла 1,2 мл /мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Предел обнаружения – 0,5$\cdot 10^{-4}$ г/дм^3.

1.5. Методы определения антрахинонов в лекарственном растительном сырье

Все методики определения антрахинонов направлены либо на определение общего содержания антрахинонов, либо на определение конкретных веществ.

В Государственной фармакопее XI издания [73] принят спектрофотометрический метод, основанный на способности антрахинонов реагировать со щелочью. По этой методике предварительно проводят кислотный гидролиз при помощи ледяной уксусной и хлороводородной кислот, выделившийся агликон экстрагируют органическим растворителем (диэтиловым эфиром), а далее антрахиноны переэкстрагируют в водный щелочной раствор. Оптическую плотность окрашенных растворов определяют при длине волны 530 нм в пересчете на истизин. Концентрацию антрахинонов определяют по калибровочному графику, построенному с помощью растворов хлорида кобальта [73]. В другом варианте данной методики общее содержание антрахинонов в коре крушины проводят в пересчете на франгулин А, спектр поглощения которого также совпадает со спектром поглощения лекарственного сырья [97].

Разработана методика для определения общего содержания антрахинонов в пересчете на реин [98]. Методика основана на извлечении антрахинонов в водную фазу в течение одного часа при 95–98 ^{o}C и измерении аналитического сигнала при длине волны 515 нм. Диапазон линейности составил $(1{,}92–9{,}60)\cdot10^{-3}$ г/дм^3. Стандартное отклонение не превышает 5 %.

Разработаны методики [99, 100] определения общего содержания антрахинонов, в пересчете на ализарин, основанные на способности антрахинонов поглощать электромагнитное излучение в видимой области спектра. Измерение аналитического сигнала проводили при длине волны 435 нм. Особенностью методики [99] является получение экстрактов корней *Morinda citrifolia* при помощи МОИ в УЗ-поле. Экстракцию проводили при 80 ^{o}C в 1 % водный раствор Triton X-100 в течение 2 часов. В [100] предложено проводить экстракцию антрахинонов из корней *Morinda citrifolia* в водно-спиртовой раствор в течение 1 часа при 60 ^{o}C в УЗ-поле с последующим их спектрофотометрическим определением.

На сегодняшний день разработано большое количество ВЭЖХ методик определения антрахинонов. Условия ВЭЖХ определения антрахинонов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Характеристики ВЭЖХ методик определения антрахинонов.

Аналит	**Проба**	**Неподвижная фаза**	**Подвижная фаза**	**Предел обнаружения**	**Литература**
Реин, эмодин, хризофановая кислота	Кассия	С 18	Смесь метанола и уксусной кислоты	2,5–15 мг/дм^3	[101]
Реин, алоэ-эмодин, эмодин, хризофанол и фисцион	Корни кассии	С 18	Смесь ацетонитрила, метанола и водного раствора ацетата аммония	(0,23–4,61)·10^{-6} моль/дм^3	[102]
Алоэ-эмодин, эмодин, реин, хризофанол, фисцион	Корень ревеня, горца, ЛП	С 18	Смесь раствора метанола и муравьиной кислоты	(2,20–12,50)·10^{-6} г/дм^3	[103]
Алоэ-эмодин	Экстракты и настойки листьев алоэ	С 18	Смесь воды и метанола	3·10^{-6} г/дм^3	[104]
Псевдопурпурин, пурпурин, ализарин, люцедин, мунжестин, нордамакантал	Корни марены	С 18	Смесь ацетонитрила и ацетатного буферного раствора	–	[105]

Предложена методика определения антрахинонов при помощи капиллярного электрофореза с УФ-детектированием. В качестве фонового электролита была выбрана смесь раствора 60 мМ 1-бутил-3-метилимидазолий тетрафторборат (1B-3mi-TFB) и 4,0 мМ раствора циклодекстрина (pH=10). Анализ проводили при приложенном напряжении 20 кВ, с детектированием при длине волны 254 нм. Время анализа 5 минут. Пределы обнаружения от 0,56·10^{-3} до 3,75·10^{-3} г/дм^3 для

различных определяемых веществ. Методика была использована для анализа экстракта из растения *Paedicalyx attopevensis* [106].

1.6. Заключение

Таким образом, на сегодняшний день автоматизация фармацевтического анализа представлена в условиях ПИА, SIA, SIC, CIA, FBA и BIA в сочетании с различными способами детектирования. Однако данные проточные методы имеют ограничения. Общим ограничением неравновесных проточных методов, таких как ПИА, SIA, SIC и BIA является дисперсия порции пробы в потоке носителя, которая влияет на прецизионность и чувствительность анализа. Для обеспечения воспроизводимости результатов необходимо строго контролировать скорость передвижения потоков по гидравлическим трассам системы, а также время нахождения пробы в проточной системе. Недостаток метода FBA в том, что конструкционные особенности используемых в FBA смесительных камер, оснащенных устройством перемешивания растворов и детектором соответствующего типа, вызывают ограничения по варьированию длины оптического пути, а также перемешиваемых в них объемов проб и растворов реагентов.

Поэтому разработка новых подходов к автоматизации фармацевтического анализа на принципах проточных методов по-прежнему остается актуальной задачей аналитической химии. В качестве одного из альтернативных решений проблемы автоматизации фармацевтического анализа интерес представляет циклический инжекционный анализ, обеспечивающий унификацию проточного анализа и его максимальную чувствительность.

Глава 2. Аэрогидравлическая схема циклического инжекционного анализа лекарственного растительного сырья с вскрытием проб в УЗ-поле, и ее обоснование

Для создания условий полной автоматизации процесса извлечения аналитов из твердофазных проб ЛРС для их последующего определения, в отличие от ранее предложенных схем ЦИА, в разработанной схеме (Рисунок 13) предполагается коммутация нескольких кранов-переключателей и включение в качестве вспомогательных устройств пробоподготовки (**ВУП**) специальных картриджей с политетрафторэтиленовыми (**ПТФЭ**) фильтрами, которые помещены в УЗ-ванну с регулируемыми температурными режимами и коммутируются с каналами одного из кранов. Число картриджей ограничено количеством каналов используемого крана. В картриджах производится экстракционное извлечение аналитов из ЛРС и последующее отделение экстракта от «отработанного» сырья. Второй кран предназначен для автоматизации процесса образования аналитической формы в РЕ при смешении в ней экстракта и растворов реагентов потоком газовой фазы.

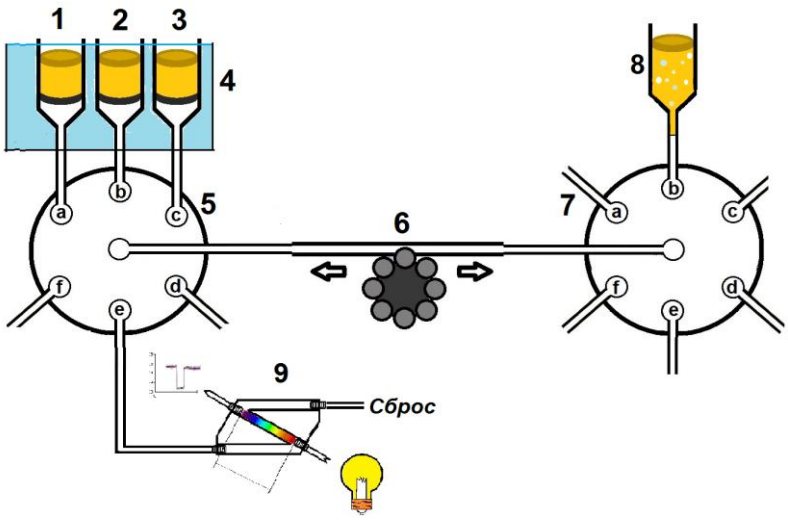


Рисунок 13. Принципиальная схема циклического инжекционного анализа лекарственного растительного сырья с вскрытием проб в УЗ-поле: 1, 2, 3 – картриджи с ПТФЭ фильтрами; 4 – УЗ-ванна; 5, 7 – многоходовые краны-переключатели; 6 – перестальтический реверсивный насос; 8 – реакционная емкость; 9 – проточная кювета, подключенная с помощью оптоволоконных кабелей к источнику света и спектрометру.

В картриджи воронкообразной формы (высота – 50 мм, внутренний диаметр – 5 мм) помещены пористые ПТФЭ фильтры соответствующих размеров, изготовленные из порошка ПТФЭ (Фторопласт-4) двухстадийным спеканием с промежуточным изготовлением ПТФЭ пластины и отборкой фракции частиц с размером 0,45 – 0,9 мм.

Было изучено влияние размера фракций порошка ПТФЭ на воспроизводимость аналитического сигнала, получаемого при определении флавоноидов в ЛРС. Минимальное значение СКО (3 %) наблюдалось при использовании ПТФЭ фильтра, полученного из 0,45 – 0,9 мм ПТФЭ фракции. При использовании 1 – 2 мм фракции не наблюдалась эффективная фильтрация экстракта; при использовании 0,1 – 0,4 мм фракции СКО возрастало до 5 %, что связано с увеличением гидродинамического сопротивления в процессе фильтрации. Таким образом, 0,45 – 0,9 мм ПТФЭ фракция была выбрана в качестве оптимальной для проведения дальнейших экспериментов.

Традиционными способами извлечения БАВ из ЛРС в соответствующий экстрагент являются методы мацерации [107], перколяции [108], циркуляционного экстрагирования [109], противоточной экстракции, холодного и горячего прессования и другие. Однако все они используются в препаративных процессах и имеют ряд недостатков, такие как длительное высокотемпературное воздействие, которое может приводить к потере БАВ, низкая производительность, а также неполнота экстракции действующих веществ и трудоемкость. Для интенсификации процессов гомогенизации и извлечения БАВ из растительного материала используют различные подходы. К ним относят электроплазмолиз и электродиализ [110], а также методы экстракции БАВ при воздействии высоких частот (**ВЧ**), сверхвысоких частот (**СВЧ**), сжиженных газов и УЗ.

Электроимпульсный способ экстрагирования веществ проводится с помощью высоковольтного разряда, образующегося в результате аккумулирования электрической энергии и ее выделения в короткие промежутки времени. Электрические разряды позволяют ускорять течение внутриклеточной диффузии за

счет возникновения конвективной диффузии и частичного разрушения клеточных оболочек [111].

При электромагнитной обработке ЛРС происходит одновременный нагрев всей массы обрабатываемого материала как в макро-, так и микрообъемах. Важным преимуществом данной обработки является то, что в отличие от традиционного тепломассообмена нет необходимости создавать большие градиенты температур и давления [112].

Методы извлечения при помощи СВЧ- и ВЧ-воздействия нашли широкое применение в аналитической практике. Так авторы [113] проводили ВЭЖХ-определение антрахинонов (алоэ-эмодина, эмодина, хризофанола, реина и фисциона) в семенах Кассии с использованием мицеллярно-опосредованного извлечения в СВЧ-печи.

В литературе встречаются публикации, посвященные экстракции аналитов сжиженными газами [114]. Обработка ЛРС сжиженными газами с целью извлечения отдельных компонентов относится к высокоэффективным технологическим процессам, обеспечивающим снижение трудовых затрат, улучшающим качество продукции и способствующим комплексному использованию сырьевых ресурсов и материалов.

В настоящее время особое внимание уделяется извлечению БАВ при помощи УЗ-поля. Особенности извлечения БАВ при помощи УЗ-поля состоят в том, что в среде распространения звуковых волн наблюдается частотное, равнопеременное чередование зон сжатия и разрежения. В колебательное движение вовлекается и экстрагент, и частицы сырья. Также появляются сильные турбулентные течения, которые способствуют растворению и извлечению веществ. При этом происходит интенсивное перемешивание содержимого даже внутри клеток ЛРС, что является главным преимуществом УЗ-воздействия по сравнению с другими методами экстракции. Несомненным достоинством извлечения в УЗ-поле является малая продолжительность экстракции, а значит высокая производительность метода [115–119].

Таким образом, перспективным методом пробоподготовки в том числе для ЦИ-определения БАВ в ЛРС является экстракция в УЗ-поле с регулируемыми температурными режимами.

В этом случае обеспечивается возможность полной автоматизации процесса извлечения аналитов из твердофазных проб ЛРС и их последовательное детектирование в равновесных условиях. Для этого в съемные картриджи (1, 2, 3) помещают необходимые навески пробы ЛРС. Далее все картриджи подключают к многоходовому соленоидному крану (5) и помещают в УЗ-ванну (4). После этого в каждый картридж последовательно подают необходимые объемы экстрагентов через краны (5 и 7) с помощью перистальтического насоса (6). Затем в течение определенного времени при фиксированной температуре происходит извлечение БАВ в раствор экстрагента под действием УЗ-поля.

На следующем этапе последовательно в РЕ (8) направляют оптимизированный объем экстракта из картриджа (1), растворы реагентов и поток газа в течение заданного времени, обеспечивающий интенсивное перемешивание растворов в РЕ. Далее раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивают в проточную кювету детектора (9), измеряют аналитический сигнал раствора в условиях остановленного потока и раствор сбрасывают.

На заключительном этапе коммуникации системы промывают и измеряют фоновый сигнал. После промывки системы проводят детектирование БАВ в экстрактах, полученных в других картриджах (2, 3).

При разработке конкретных методик, основанных на данной проточной схеме, были исследованы такие важные параметры, как интенсивность и продолжительность УЗ-воздействия, температура извлечения аналитов из ЛРС, соотношение сырья и экстрагента, состав экстрагента, а также оптимизация процесса образования аналитической формы в РЕ.

Глава 3. Методика экспериментальных исследований

3.1. Средства измерений

1. Экспериментальная система циклического инжекционного анализа с извлечением аналитов в раствор в УЗ-поле была смонтирована с использованием двух шестиходовых соленоидных кранов (Cole-Parmer, США), одного перистальтического насоса «MasterFlex L/S™» (Cole-Parmer, США) (скорость потока от 0,5 до 6 мл/мин), трех одноразовых полипропиленовых картриджей (высота – 50 мм, внутренний диаметр – 5 мм) с пористыми политетрафторэтиленовыми фильтрами, помещенных в ультразвуковую ванну «УЗВ-1,3» (Сапфир, Россия), и реакционной емкости (стеклянная трубка с воронкообразным входом в нижней части, высота – 40 мм, внутренний диаметр – 10 мм). Система в качестве детектора оснащена оптоволоконным спектрофотометром (источник видимого света «LS-1» и спектрометр «USB 4000», Ocean Optics, США), снабжённым проточной кюветой «FIA-Z-SMA-50-TEF», FIAlab®, США (длина оптического пути – 50 мм при определении аскорбиновой кислоты и флавоноидов, 10 мм при определении антрахинонов). Коммутация отдельных узлов аэрогидравлической схемы обеспечивалась трубками из политетрафторэтилена (внутренний диаметр – 0,5 мм). Проточный анализатор управлялся автоматически с помощью персонального компьютера.

2. Экспериментальная система последовательного инжекционного анализа с извлечением аналитов в раствор в УЗ-поле, была смонтирована с использованием коммерчески доступного прибора «FIAlab® 3500» (FIAlab®, США), состоящего из одного десятиходового соленоидного крана, стеклянного шприцевого насоса (объем – 5 мл), удерживающей спирали (длина – 2000 см, внутренний диаметр – 1,5 мм); пяти одноразовых полипропиленовых картриджей (высота – 55 мм, внутренний диаметр – 1 см), помещенных в ультразвуковую ванну «UCI–150» (Trade Raypa, Испания). Система в качестве детектора была оснащена оптоволоконным спектрофотометром (источник света «DH–2000» и спектрометр «USB 2000», Ocean Optics, США), снабжённым проточной кюветой (длина

оптического пути – 10 мм). Коммутация отдельных узлов аэрогидравлической схемы обеспечивалась трубками из политетрафторэтилена (внутренний диаметр – 0,75 мм). Проточный анализатор управлялся с помощью персонального компьютера (программное обеспечение FIAlab®, 5.9.321 версия).

3. Импульсный потенциостат-гальваностат «Elins P-30SM» (Элинс, Россия).

4. Прибор для высокоэффективного капиллярного электрофореза «Капель 103 РТ» (Люмэкс, Россия).

5. Спектрофотометр «UVmini–1240» (Shimadzu, Япония). Спектральный диапазон от 190 до 1100 нм.

6. Электронные весы «PioneerPA214C» (Ohaus, США), 2-ой класс точности, предел взвешивания 210 г, дискретность 0,1 мг.

7. Секундомер механический типа «Агат».

8. Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 250, 1000 мл (ГОСТ 1770-74).

9. Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 мл (ГОСТ 29227-91).

10. Преобразователь ионометрический «И-510» (Аквилон, Россия).

11. Термометр ртутный стеклянный лабораторный с ценой деления 1 °С, диапазон температур от 0 °С до +250 °С (ТУ 25-2021.003-88).

12. Ареометр АСП (ГОСТ 18481-81).

3.2. Вспомогательные устройства и оборудование

1. Ультразвуковая ванна «УЗВ-1,3» (Сапфир, Россия). Температурный диапазон от +15 °С до +70 °С. Точность поддержания температуры ±1 °С.

2. Муфельная печь «LF-7/11-G1» (ЛОИП, Россия). Максимальная температура нагрева +1100 °С, стабильность температуры в установившемся тепловом режиме ±10 °С.

3. Лабораторная мельница.

4. Сито с диаметром отверстий 1 мм.

5. Шкаф сушильный (ЛОИП, Россия).

6. Плита нагревательная «LOIP-302» (ЛОИП, Россия).

7. Химические стаканы вместимостью 5, 50 и 100 мл (ГОСТ 25336).
8. Металлическая форма (диаметр – 5 мм, высота – 7 мм).
9. Одногорлая сердцевидная колба вместимостью 100 мл.
10. Холодильник Грэхема.
11. Делительная воронка.
12. Фильтр мембранный «Millipore» (диаметр пор 0,22 мкм).
13. Фарфоровая ступка и пестик.

3.3. Реактивы и материалы

1. Triton X-100 (Merck, Германия).
2. 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия (х.ч.) по ТУ 6-09-2808-77.
3. Ализарин (ч.д.а.) по ТУ 6-09-1749-77.
4. Ацетон (х.ч.) по ГОСТ 2603-79.
5. Ацетат натрия (ч.д.а.) по ГОСТ 199-78.
6. Гидроксид натрия (ч.д.а.) по ГОСТ 2263-79.
7. Гидрофосфат натрия (х.ч.) по ГОСТ 4172-76.
8. Дигидрофосфат калия (ч.д.а.) по ГОСТ 4198-7.
9. Дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72.
10. Додецилсульфат натрия (ч.д.а.) по ГОСТ 8748-2006.
11. Кислота аскорбиновая (х.ч.) по ГОСТ 4815-76.
12. Кислота соляная (х.ч.) по ГОСТ 3118-77.
13. Ледяная уксусная кислота (х.ч.) по ГОСТ 61-75.
14. Политетрафторэтилен, фракция 0,45 – 0,9 мм.
15. Рутин 3-водный (имп., Германия).
16. Тетраборат натрия (ч.д.а.) по ГОСТ 4199-79.
17. Трилон Б (ч.д.а.) по ГОСТ 10652-73.
18. Хлорид алюминия (III) 6-водный (ч.д.а.) по ГОСТ 3759-75.
19. Формалин по ГОСТ 1625-15.
20. Цетилпиридиния хлорид (Merck, Германия).

21. Этиловый спирт (х.ч.) по ГОСТ 5964-93.

3.4. Приготовление растворов

Приготовление 0,25 г/л раствора аскорбиновой кислоты

В стаканчик помещали 0,0250 г аскорбиновой кислоты и растворяли в 10 мл дистиллированной воды. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывали стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Рабочие растворы аскорбиновой кислоты готовили путем последовательного разбавления исходного раствора. Растворы готовили ежедневно.

Приготовление 0,2 г/л раствора рутина

Предварительно высушивали рутин при температуре 130 °С в течение 3 часов до постоянной массы. В стаканчик помещали 0,0200 г рутина, добавляли 10 мл 70 % этилового спирта и перемешивали. Смесь количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывали стаканчик тремя порциями 70 % этилового спирта по 10 мл, и затем растворяли рутин при нагревании до 50–60 °С. После растворения содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и разбавляли 70 % этиловым спиртом до 100 мл. Рабочие растворы рутина готовили путем последовательного разбавления исходного раствора 70 % этиловым спиртом. Раствор устойчив в течение месяца при хранении в защищенном от света месте.

Приготовление 2,5 г/л раствора ализарина

В стаканчик помещали 0,1250 г ализарина, добавляли 10 мл 2 % раствора Triton X-100 и перемешивали смесь до полного растворения ализарина. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, промывали стаканчик тремя порциями 2 % раствором Triton X-100 по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки 2 % раствором Triton X-100 и тщательно перемешивали. Рабочие растворы ализарина готовили путем последовательного разбавления исходного раствора 2 % раствором Triton X-100.

Приготовление 7 мМ раствора алюминия хлорида

В стаканчик помещали 0,17 г хлорида алюминия 6-водного, добавляли 20 мл 70 % этилового спирта, перемешивали до полного растворения вещества. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывая стакан тремя порциями 70 % этилового спирта по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки 70 % этиловым спиртом и тщательно перемешивали. Рабочие растворы готовили путем последовательного разбавления исходного раствора 70 % этиловым спиртом.

Приготовление 0,2 мМ раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия

В стаканчик помещали 0,006 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, добавляли 20 мл дистиллированной воды, перемешивали до полного растворения вещества. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывая стакан тремя порциями дистиллированной воды по 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Раствор устойчив в течение 2 дней при хранении в холодильнике. Рабочие растворы готовили путем последовательного разбавления исходного раствора дистиллированной водой.

Приготовление фосфатного буферного раствора (pH=6,86)

Навески 69,25 г двузамещенного фосфата калия и 54,76 г однозамещенного фосфата калия из стаканчиков для взвешивания количественно переносили в мерную колбу вместимостью 1 л, промывали стаканчики не менее пяти раз по 20 мл дистиллированной воды, сливая промывные воды в ту же колбу. Объем раствора в колбе доводили до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Для достижения требуемого значения pH добавляли по каплям 0,1 М раствор двузамещенного фосфата калия при перемешивании. pH раствора контролировали с помощью pH-метра.

Приготовление боратного буферного раствора (pH=8,0)

Смешивали 56 мл 0,05 М раствора тетрабората натрия, 22 мл 0,2 М раствора соляной кислоты и 22 мл 0,4 М Трилона Б. По каплям добавляли 1 М раствор

гидроксида натрия до достижения требуемого значения pH. pH раствора контролировали с помощью pH-метра.

Приготовление ацетатного буферного раствора (pH=4,5)

Навеску 8,85 г ацетата натрия из стаканчика для взвешивания количественно переносили в мерную колбу вместимостью 1 л, промывали стаканчик не менее пяти раз по 20 мл дистиллированной воды, сливая промывные воды в ту же колбу, и добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты. Объем раствора в колбе доводили до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Для достижения требуемого pH добавляли по каплям 0,1 М раствор уксусной кислоты или ацетата натрия при перемешивании. pH раствора контролировали с помощью pH-метра.

3.5. Изготовление картриджей с пористыми ПТФЭ фильтрами

В одноразовые полипропиленовые картриджи воронкообразной формы (высота – 50 мм, внутренний диаметр – 5 мм) помещали пористые ПТФЭ фильтры соответствующих размеров, изготовленные из порошка ПТФЭ (Фторопласт – 4). Для получения фильтра порошок ПТФЭ спекали при температуре 380 ^{o}C в течение 3 часов в металлической форме (20 × 50 × 50 мм), после чего ПТФЭ пластину измельчали. С помощью сит отбирали 0,45 – 0,9 мм фракцию порошка ПТФЭ, которую повторно спекали в металлической форме с отверстиями (диаметр – 5 мм, высота – 7 мм) при температуре 380 ^{o}C в течение 1,5 ч.

3.6. Пробоотбор и пробоподготовка ЛРС

Растительный материал хранили при комнатной температуре в защищенном от света и влаги месте. Анализируемое ЛРС сушили в сушильном шкафу в условиях, указанных в таблице 5. Затем при помощи лабораторной мельницы измельчали анализируемое сырье и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм.

Таблица 5. Условия высушивания анализируемого ЛРС, содержащего различные природные БАВ.

БАВ	**Температура, ^{o}C**	**Время, ч**
Флавоноиды	150	1
АК	80	1
Антрахиноны	50	6

Измельченный материал тщательно перемешивали, рассыпали ровным тонким слоем в виде квадрата на бумажном листе и делили на четыре сектора. Содержимое двух противоположных секторов отбрасывали, оставшиеся два сектора повторно перемешивали и рассыпали тонким слоем. Операцию квартования проводили многократно до получения средней пробы (0,5 – 1 г).

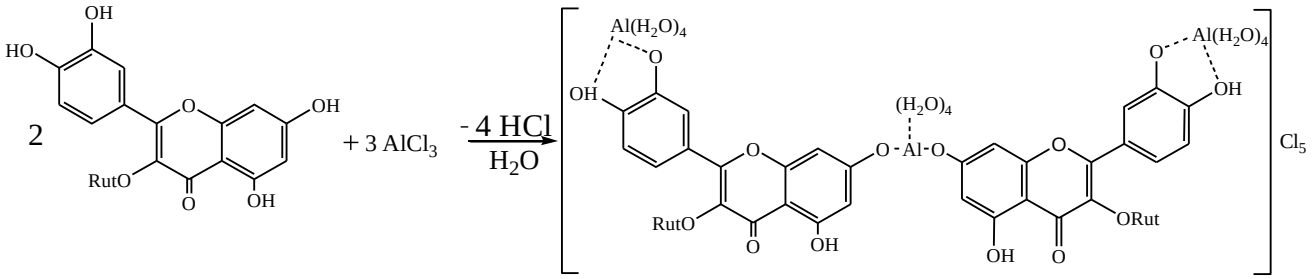
Далее при определении флавоноидов или антрахинонов 0,01 г или 0,1 г подготовленного ЛРС соответственно помещали в фарфоровую ступку, добавляли 1 г хлористого калия и тщательно растирали смесь при помощи пестика.

Глава 4. Разработка методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье

4.1. Влияние ПАВ на образование комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III)

На основе обзора известных решений проблемы определения флавоноидов в ЛРС и ЛП был сделан вывод, что для проточного определения флавоноидов в растительном сырье наиболее предпочтителен спектрофотометрический метод детектирования, обеспечивающий высокую надежность и простоту анализа. Для определения флавоноидов была выбрана известная селективная реакция образования их комплексов с ионами алюминия (III). Данная реакция рекомендована для определения флавоноидов в ЛРС Государственной фармакопеей XI издания [73].

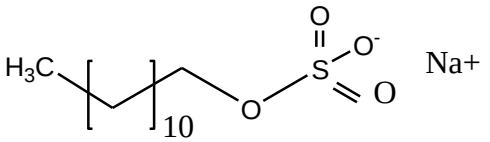
Формирование комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III) может быть выражено следующим химическим уравнением [120]:

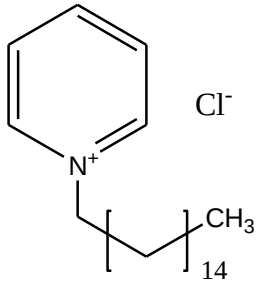


Однако выбранная реакция является кинетически замедленной. Общим решением для преодоления кинетических ограничений при образовании аналитических форм является проведение фотометрических реакций в средах ПАВ за счет катализа подобных аналитических реакций [121, 122]. Но возможность реализации данного методического решения для случая определения флавоноидов требовала экспериментальной проверки, т.к. ранее это не было изучено.

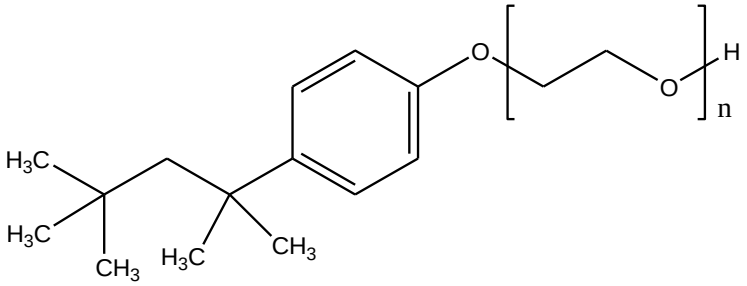
Влияние катионных, анионных и неионогенных ПАВ на скорость образования аналитической формы рутина было исследовано на примерах

цетилпиридиния хлорида (**ЦПХ**), додецилсульфата натрия и Triton X-100 соответственно:





Додецилсульфат натрия Цетилпиридиния хлорид



Triton X-100

Для этого в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл 0,8 мМ раствора рутина и 1 мл 40 мМ раствора хлорида алюминия. При изучении влияния ПАВ 1 мл 2,8 мМ раствора соответствующего ПАВ был добавлен в колбу. Затем содержимое колбы доводили до метки 70 % этиловым спиртом. Далее измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 415 нм через каждые 5 мин.

Согласно полученным данным (Рисунок 14), при прочих равных условиях добавление любого из ПАВ к реакционной смеси приводит к увеличению оптической плотности раствора, достигаемой за одно и то же время. Максимальный эффект проявляется в присутствии ЦПХ (Рисунок 14, кривая 4). В этом случае скорость протекания фотометрической реакции значительно возрастает. Для достижения близкого к максимальному значению оптической плотности достаточно 5 мин вместо 30 мин (без ПАВ). Электростатическое взаимодействие между отрицательно заряженными центрами флавоноидов и положительно заряженными группами ПАВ приводит к более эффективному взаимодействию флавоноидов с ионами алюминия (III). В данных условиях формируются комплексы, обусловленные взаимодействием молекул катионных

ПАВ с молекулами флавоноидов, которые в свою очередь образуют агрегативно устойчивые и интенсивно окрашенные растворы аналитических форм с ионами алюминия (III). Кроме того, введение ЦПХ приводит к увеличению молярного коэффициента светопоглощения. При этом молярный коэффициент светопоглощения комплекса рутина с ионами алюминия (III) равен $1{,}9 \cdot 10^4$ л/моль·см (λ=415 нм), а без введения ЦПХ – $1{,}6 \cdot 10^4$ л/моль·см соответственно.

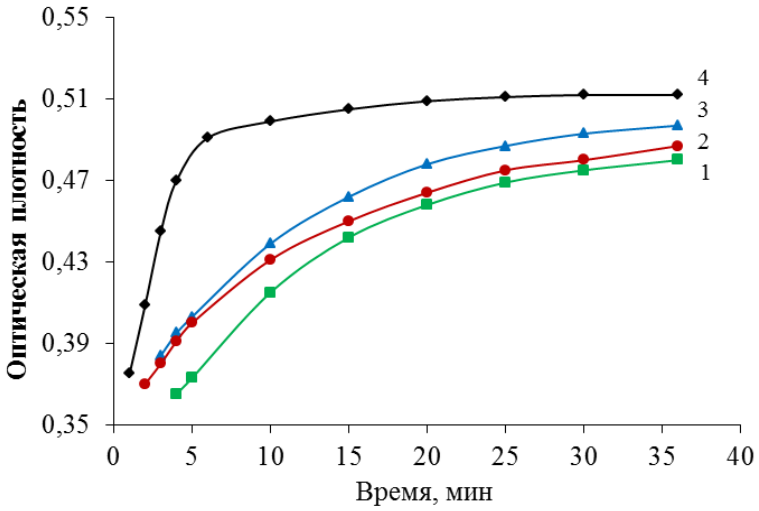


Рисунок 14. Влияние различных ПАВ на скорость образования комплекса рутина с ионами алюминия (III): 1 – без ПАВ; 2 – Triton X-100; 3 – додецилсульфат натрия; 4 – ЦПХ (С(рутин) – 0,8 мМ, С(ПАВ) – 2,8 мМ, С(Al (III)) – 40 мМ).

В рамках данной работы были найдены константы скоростей реакций комплексообразования рутина с ионами алюминия (III) в присутствии и без ЦПХ путем построения кинетических зависимостей. Для этого в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл (0,3 – 1,3) мМ раствора рутина и 1 мл 40 мМ раствора хлорида алюминия. При изучении влияния ПАВ 1 мл 2,8 мМ раствора ЦПХ был добавлен в колбу. Затем содержимое колбы доводили до метки 70 % этиловым спиртом. Далее измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 259 нм, которая соответствует максимуму поглощения раствора рутина в УФ-области, через каждые 30 с. В качестве раствора сравнения использовали 1 мл раствора рутина соответствующей концентрации, разбавленный до 25 мл 70 % этиловым спиртом.

Было рассчитано изменение концентрации рутина (*c*) в зависимости от времени (*t*), а также построены кинетические зависимости в координатах $1/c^2$ – t.

Установлено, что общий вид кинетического уравнения образования аналитической формы рутина в среде ПАВ аналогичен уравнению в спиртовой среде. На основании полученных кинетических зависимостей были рассчитаны константы скоростей реакций образования комплексов флавоноидов с ионами Al (III) в этаноле и в присутствии ПАВ по тангенсам углов наклона их линейных участков, которые составили соответственно $(1,8 \pm 0,1)\cdot 10^4$ и $(8,8 \pm 0,1)\cdot 10^3$ $мин^{-1}\cdot моль^{-2}\cdot л^2$. Из полученных данных следует, что в присутствии ЦПХ скорость спектрофотометрической реакции удваивается.

4.2. Выбор условий спектрофотометрического определения флавоноидов

Для достижения оптимальных условий протекания спектрофотометрической реакции в условиях ЦИА было изучено влияние концентрации ЦПХ и ионов алюминия (III) на величину аналитического сигнала. Согласно выбранной схеме анализа в РЕ (8) подавали 100 мкл 50 мкМ раствора рутина (5, *a*), 300 мкл 0,7–7,0 мМ $AlCl_3$ (5, *f*) и 300 мкл 0,01–1,0 мМ ЦПХ (7, *e*) (Рисунок 20). Растворы в РЕ (8) перемешивали потоком воздуха (кран 5, *d*) в течение 10 с со скоростью 6 мл/мин и выдерживали 5 мин при температуре 25 ^oC. На следующем этапе раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) последовательно перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (11), измеряли оптическую плотность раствора (λ=415 нм) в условиях остановленного потока в течение 10 с и раствор сбрасывали.

Затем коммуникации системы промывали 70 % раствором этанола (7, *d*) и измеряли фоновый сигнал.

Экспериментально было найдено, что максимальное значение оптической плотности раствора аналитической формы рутина наблюдалось при концентрации ионов алюминия (III) равной 1,7 мМ (Рисунок 15). При более высоких концентрациях реагента происходило постепенное изменение состава комплексов рутина и уменьшение оптической плотности. Оптическая плотность продукта

реакции достигала максимума при концентрации цетилпиридиния хлорида равной 0,1 мМ (Рисунок 16).

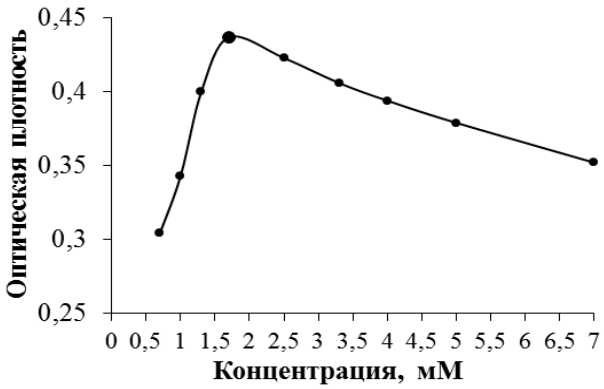


Рисунок 15. Влияние концентрации ионов алюминия (III) на оптическую плотность раствора аналитической формы рутина (С(рутин) – 50 мкМ, С(ЦПХ) – 0,1 мМ).

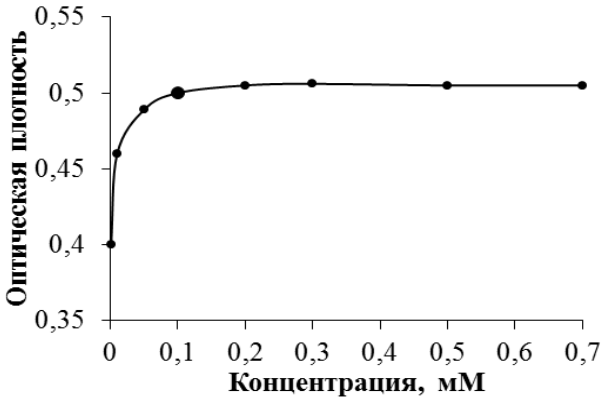


Рисунок 16. Влияние концентрации ЦПХ на оптическую плотность раствора аналитической формы рутина (С(рутин) – 50 мкМ, С(Al (III)) – 1,7 мМ).

При оптимизации анализа по ЦИ-схеме было изучено влияние температуры на процесс образования аналитической формы рутина в диапазоне от 20 ^{o}С до 50 ^{o}С. Оптическая плотность в указанном диапазоне температур не изменялась.

4.3. Оптимизация процесса извлечения флавоноидов из лекарственного растительного сырья

Для различного сырья (травы зверобоя, цветков ромашки и календулы) была изучена возможность извлечения флавоноидов в растворы различных ПАВ и этанола в УЗ-поле. Было показано, что растворы ПАВ не обеспечивают эффективного извлечения флавоноидов (эффективность извлечения не превышала 50 %) при нагревании в УЗ-поле, в отличие от 70 % раствора этанола.

При изучении влияния массы навески были зафиксированы объем экстрагента – 2 мл и время извлечения в УЗ-ванне (130 Вт, 35 кГц) – 10 мин при температуре 60 ^{o}С. В картриджи помещали от 0,05 до 0,2 г пробы, картриджи подключали к многоходовому соленоидному крану (5) и помещали в УЗ-ванну (4)

(Рисунок 20). После этого в каждый картридж последовательно подавали по 2 мл 70 % этанола (кран 7, *d*) через краны (5 и 7) с помощью перистальтического насоса (6). Затем в течение 10 мин производили УЗ воздействие при температуре 60 ^{o}C на пробы в картриджах.

Через краны-переключатели (5, 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8, 9, 10) последовательно подавали по 100 мкл экстрактов, полученных в картриджах (1, 2, 3), 300 мкл 1,7 мМ $AlCl_3$ (5, *f*) и 300 мкл 0,1 мМ ЦПХ (7, *e*). Растворы в РЕ (8, 9, 10) перемешивали потоком воздуха (кран 5, *d*) в течение 10 с со скоростью 6 мл/мин и выдерживали 5 мин при температуре 25 ^{o}C.

Далее растворы аналитических форм из РЕ (8, 9, 10) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) последовательно перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (11), измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 415 нм в условиях остановленного потока в течение 10 с и растворы сбрасывали.

На заключительном этапе из этой же пробы проводили вторичное извлечение и определение флавоноидов. Для проверки полноты извлечения выбранных аналитов также проводили третье извлечение из данной пробы сырья, однако значение аналитического сигнала значительно не отличалось от значения фонового сигнала. Полученные экспериментальные результаты дают право утверждать, что данные БАВ извлекаются в экстрагент в результате двух последовательных извлечений. Под эффективностью извлечения понимается процентное соотношение найденных содержаний БАВ для каждого из двух последовательных автоматизированных извлечений из одной и той же пробы сырья.

На основании полученных результатов (Рисунок 17), масса всех исследованных проб равная 0,1 г была выбрана для дальнейших экспериментов, т.к. при данном значении массы достигается наибольшая эффективность извлечения флавоноидов. При увеличении массы навески пробы наблюдается уменьшение эффективности извлечения определяемых БАВ, связанное с недостаточным объемом экстрагента, в случае дальнейшего уменьшения массы наблюдается увеличение СКО.

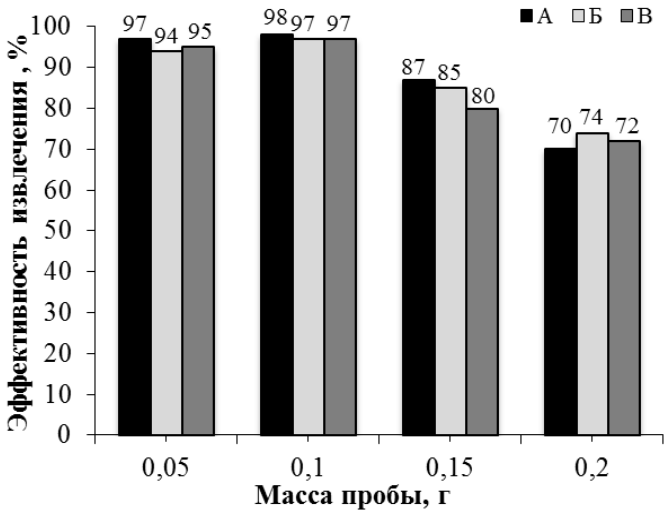


Рисунок 17. Зависимость эффективности извлечения флавоноидов от массы пробы: А – трава зверобоя; Б – цветки ромашки; В – цветки календулы (объем экстрагента – 2 мл, время извлечения – 10 мин, температура – 60 ^{o}C).

При изучении влияния объема экстрагента на полноту извлечения флавоноидов из ЛРС масса пробы составляла 0,1 г, а время извлечения в УЗ-ванне – 10 мин. Объем экстрагента варьировали в пределах от 0,5 до 3 мл.

При изучении влияния времени извлечения флавоноидов из проб на эффективность извлечения аналитов на примере травы зверобоя были зафиксированы масса навески – 0,1 г и объем экстрагента – 2 мл. Время перемешивания пробы с экстрагентом в картридже потоком газа или под действием УЗ варьировали в пределах от 3 до 30 мин.

Из полученных результатов (Рисунки 18, 19) следует, что объем экстрагента равный 2 мл и время извлечения флавоноидов в УЗ-поле равное 10 мин при температуре 60 ^{o}C являются оптимальными. При повышении температуры выше 60 ^{o}C эффективность извлечения остается постоянной. Извлечение данных природных БАВ в УЗ-поле дает примущество в значительном сокращении времени анализа при автоматизации методики их определения.

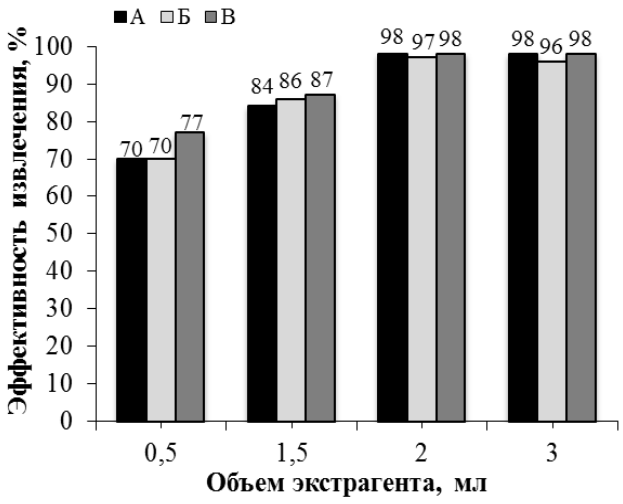


Рисунок 18. Зависимость эффективности извлечения флавоноидов от объема экстрагента: А – трава зверобоя; Б – цветки ромашки; В – цветки календулы (масса пробы – 0,1 г, время извлечения – 10 мин, температура – 60 ^{o}C).

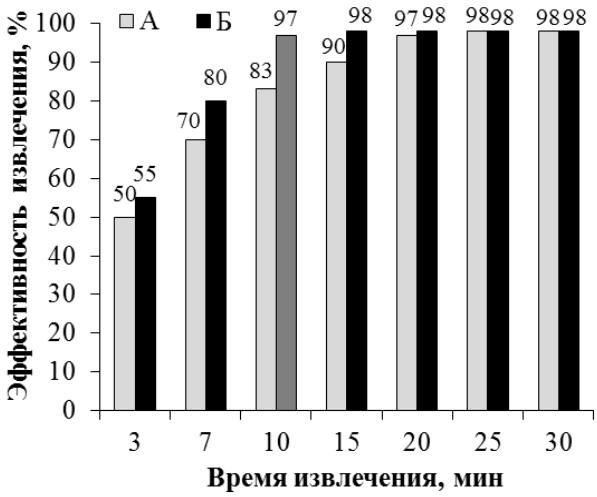


Рисунок 19. Зависимость эффективности извлечения флавоноидов от времени: А – перемешивание воздухом; Б – УЗ перемешивание (скорость потока воздуха – 6 мл/мин, объем экстрагента – 2 мл, масса пробы – 0,1 г, температура – 60 ^{o}C).

4.4. Методика ЦИ-определения флавоноидов в ЛРС с извлечением аналитов в УЗ-поле

Приведённые в предыдущих разделах данные позволили предложить следующую методику циклического инжекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в ЛРС: траве зверобоя, цветках ромашки и календулы. В варианте методики, адаптированной к разработанной схеме ЦИА (Рисунок 20), в три съемных картриджа (1, 2, 3) помещали по 0,1 г измельченной пробы (смесь 0,01 г измельченного растительного материала и 1 г KCl). Далее все картриджи подключали к многоходовому соленоидному крану (5) и помещали в УЗ-ванну (4). После этого в каждый картридж последовательно подавали по 2 мл 70 % этанола (кран 7, *d*) через краны (5 и 7) с помощью перистальтического насоса (6). Затем в

течение 10 мин производили УЗ воздействие при температуре 60 °С на пробы в картриджах.

На следующем этапе через краны-переключатели (5, 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8, 9, 10) последовательно подавали по 100 мкл экстрактов, полученных в картриджах (1, 2, 3), 300 мкл 1,7 мМ раствора $AlCl_3$ (5, *f*) и 300 мкл 0,1 мМ раствора ЦПХ (7, *e*). Растворы в РЕ (8, 9, 10) перемешивали потоком воздуха (кран 5, *d*) в течение 10 с со скоростью 6 мл/мин и выдерживали 5 мин при температуре 25 °С.

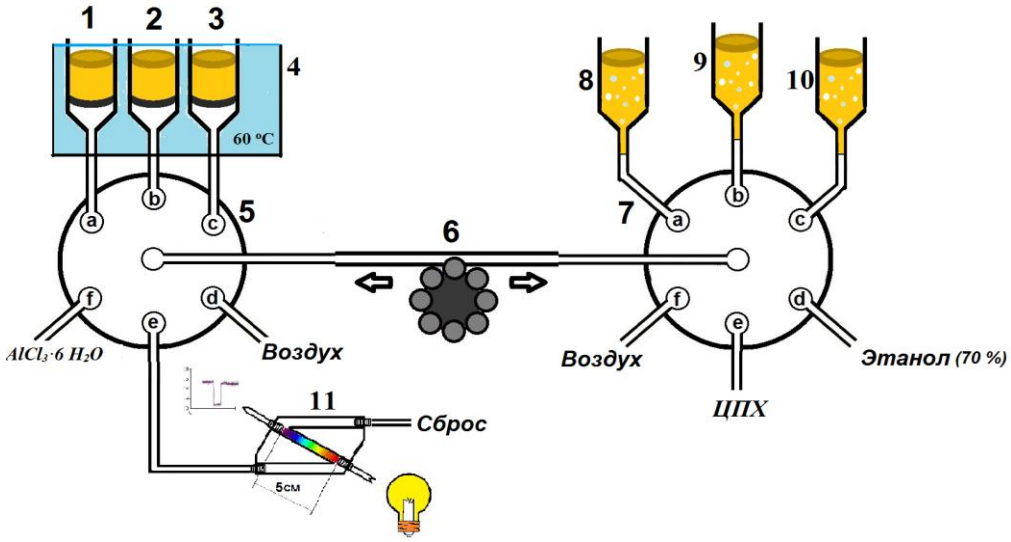


Рисунок 20. Схема ЦИ-определения флавоноидов в ЛРС: 1, 2, 3 – картриджи с ПТФЭ фильтрами; 4 – УЗ-ванна; 6 – перистальтический реверсивный насос; 5, 7 – многоходовые краны-переключатели; 8, 9, 10 – реакционные емкости; 11 – проточная кювета, подключенная с помощью оптоволоконных кабелей к источнику света и спектрометру.

Далее растворы аналитических форм из РЕ (8, 9, 10) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) последовательно перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (11), измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 415 нм в условиях остановленного потока в течение 10 с и растворы сбрасывали. Затем коммуникации системы промывали 70 % раствором этанола (7, *d*) и измеряли фоновый сигнал при заполнении кюветы смешанным раствором экстракта, 70 % раствора этанола и 0,1 мМ раствора ЦПХ

(1:3:3). Разность сигналов пробы и фона использовалась для расчета содержания флавоноидов в ЛРС, при этом удалось устранить матричные эффекты.

Для задания порядка необходимых операций и количества реагентов составлен алгоритм операций, представленный в Приложении 1 и позволяющий устанавливать состояния управляемых элементов прибора в каждый момент времени. Аналитические характеристики разработанной методики представлены в таблице 6. Данная методика в отличие от ранее предложенных проточных аналогов обеспечила полную автоматизацию анализа, включая стадию извлечения флавоноидов из ЛРС в раствор. Разработанная методика позволяет проводить определение флавоноидов в ЛРС с производительностью 8 проб в час.

Таблица 6. Аналитические характеристики циклической инжекционной спектрофотометрической методики определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье.

Параметр	**Оптимальное значение**
Концентрация ЦПХ (мМ)	0,1
Концентрация Al (III) (мМ)	1,7
Объем экстрагента (мл)	2
Время извлечения (мин)	10
Температура извлечения (^{o}C)	60
Время спектрофотометрической реакции (мин)	5
Температура реакции (^{o}C)	25
Предел обнаружения (%)	0,1
Диапазон определяемых концентраций (%)	0,36 – 8
Коэффициент корреляции	0,999
Sr, % (n = 5)	3
Производительность (проб/час)	8

4.5. Мешающее влияние примесных компонентов

В работе было изучено влияние на результаты определения флавоноидов некоторых соединений, содержащихся в ЛРС и вступающих в реакции комплексообразования с ионами алюминия (III), имеющих фенольные, карбоксильные и гидроксильные группы, а также ионов металлов. Исследование мешающего влияния было проведено на модельных спиртовых растворах, содержащих 50 мкМ рутина и различные количества примесных компонентов, в соответствии с разработанной автоматизированной методикой. Допустимое значение было принято при отклонении аналитического сигнала не более, чем на ± 5 %. Для оценки селективности реакции использовали фактор селективности, величина которого рассчитывается по уравнению: $F=C_i/C_A$, где C_i – концентрация примесного компонента; C_A – концентрация аналита. Полученные результаты приведены в таблице 7. Не было найдено мешающего влияния в присутствии аскорбиновой, яблочной, фталевой, малоновой и лимонной кислот, цистеина в соотношении [мешающее соединение]/[рутин] гораздо большем, чем то, что обычно содержится в ЛРС [123]. По меньшей мере 200-кратный избыток неорганических ионов, таких как Fe (II/III), Cu (II), Ca (II), Mg (II), Sn (II), Ni (II), Co (II), Mn (II), Cr (III), не влияет на определение флавоноидов. Было обнаружено мешающее влияние сахаров, в том числе глюкозы, при их 10-кратном избытке.

Таблица 7. Факторы селективности для различных примесных компонентов при определении флавоноидов.

Примесный компонент	**Фактор селективности**
Лимонная кислота	2
Глюкоза	10
Аскорбиновая кислота	25
Яблочная кислота	25
Фталевая кислота	25
Малоновая кислота	40

Цистеин	100
Fe (II/III), Sn (II), Cr (III)	250
Cu (II), Ca (II), Mg (II), Ni (II), Co (II), Mn (II),	450

4.6. Испытание методики на реальных объектах анализа

Разработанная методика была апробирована для определения флавоноидов в различном ЛРС (Таблица 8). Расчет содержания флавоноидов в анализируемом растительном сырье осуществляли в пересчете на рутин, так как все максимумы в спектрах поглощения аналитических форм исследуемого растительного сырья практически совпадали с максимумом поглощения аналитической формы рутина (Рисунок 21).

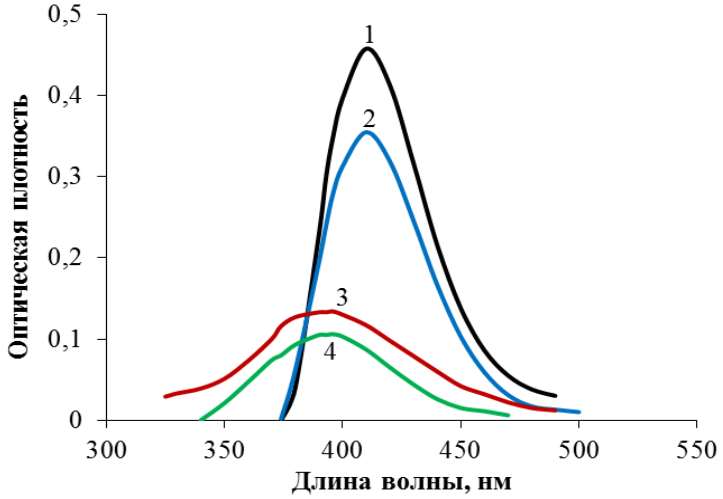


Рисунок 21. Спектры поглощения растворов аналитических форм: 1 – рутина; 2 – травы зверобоя; 3 – цветков ромашки, 4 – цветков календулы (С(рутин) – 0,8 мМ, С(ЦПХ) – 2,8 мМ, С(алюминий хлорид) – 40 мМ).

Параллельно определяли суммарное содержание флавоноидов в исследуемых объектах референтным методом циклической вольтамперометрии [124]. Последний проводился с использованием индикаторного стеклоуглеродного электрода относительно насыщенного хлорид-серебряного электрода на фоне 0,1 М фосфатного буферного раствора (pH=6,86) с последующей регистрацией анодных

пиков при постоянно-токовой форме развертки потенциала со скоростью 0,04 В/с. Концентрацию суммарного содержания флавоноидов в ЛРС определяли по высоте анодного пика окисления веществ в диапазоне потенциалов от +0,1 В до +0,6 В относительно насыщенного хлорид-серебряного электрода. Для этого в электрохимическую ячейку вольтамперометрического анализатора помещали 10 мл раствора фонового электролита фосфатного буферного раствора с pH=6,86. Далее в раствор опускали электроды, перемешивали в течение 10 с и останавливали перемешивание. Через 20 с фиксировали циклическую вольтамперограмму. Отсутствие пиков свидетельствовало о чистоте фона. После этого в ячейку с фоновым раствором помещали 0,1 мл экстракта ЛРС, полученного извлечением 0,1 г пробы растительного сырья 25 мл 70 % этилового спирта на кипящей водяной бане в течение 30 мин, перемешивали раствор 10 с, успокаивали 20 с и вновь снимали вольтамперограмму в тех же условиях. Анодный пик регистрировали при потенциале +0,4 В. Концентрацию суммарного содержания флавоноидов определяли методом градуировочного графика, построенного по стандартному раствору рутина с точно известной концентрацией при последовательном добавлении аликвотных порций в ячейку, измеряя высоту полученного анодного пика (E = +0,4 В) на вольтамперограмме. Расчет проведен с учетом потери в массе сырья при высушивании.

Примеры полученных вольтамперограмм представлены на рисунке 22.

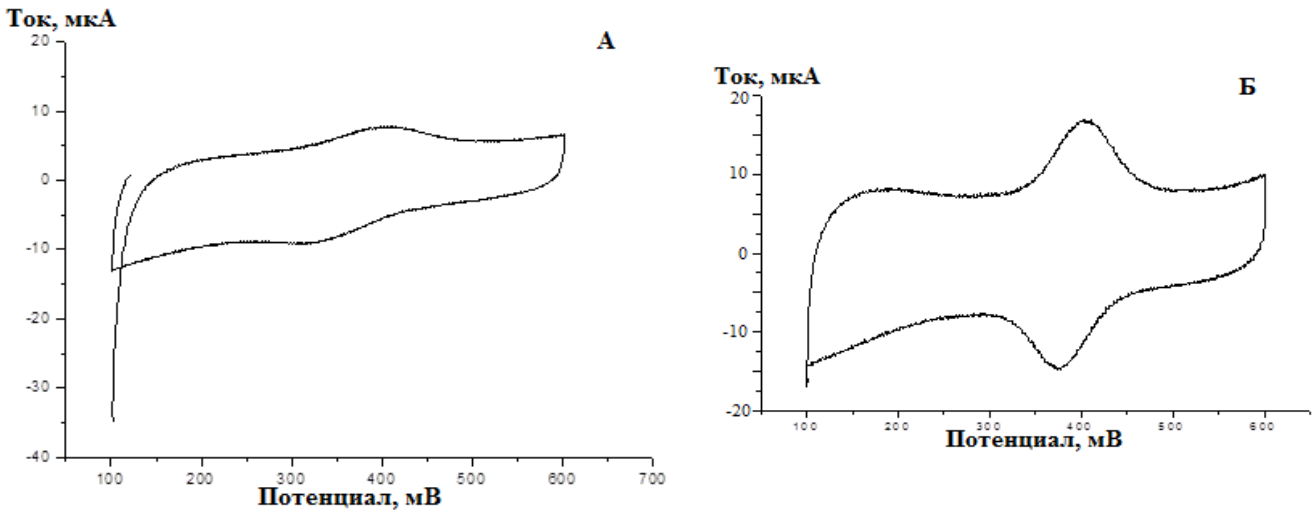


Рисунок 22. Вольтамперограммы, полученные при определении флавоноидов в ЛРС: А – цветки ромашки, Б – трава зверобоя (масса пробы – 0,1 г, объем 70 % этилового спирта – 25 мл, время извлечения – 30 мин).

Результаты, полученные методами ЦИА с извлечением в УЗ-поле и циклической вольтамперометрии, были сравнены с помощью *F*- и *t*-тестов и представлены в таблице 8.

Полученные *F*-значения ≤ 6,39 указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные *t*-значения ≤ 2,31 указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи двух методик.

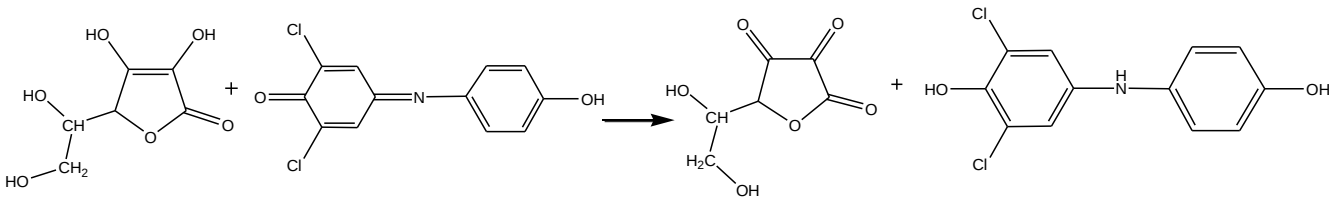
Таблица 8. Результаты определения содержания флавоноидов в лекарственном растительном сырье (n=5, P=0,95).

ЛРС	**Общее содержание флавоноидов*, %**			
	ЦИА	**Циклическая вольтамперометрия**	***F*-значение**	***t*-значение**
Трава зверобоя	5,8±0,1	5,7±0,1	1,20	1,63
Цветки ромашки	2,20±0,05	2,15±0,04	1,50	1,30
Цветки календулы	1,09±0,03	1,03±0,04	1,40	1,20
* в пересчете на рутин				

Глава 5. Разработка методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания

5.1. Выбор условий спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты

Для определения АК в ЛРС выбрана окислительно-восстановительная реакция между АК и 2,6-дихлорфенолиндофенолом (2,6-ДФИФ) в кислой среде. Данная реакция рекомендована для определения АК в ЛРС Государственной фармакопеей XI издания [73]. 2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой – красную, а при восстановлении обесцвечивается. АК взаимодействует с 2,6-ДФИФ в соотношении 1:1 [125]:



Аскорбиновая Кислота | 2,6-ДФИФ | Дегидроаскорбиновая Кислота | 2,6-ДФИФ (восстановленная форма)

Продуктами реакции являются дегидроаскорбиновая кислота и лейко-соединение индофенола. При этом наблюдается уменьшение оптической плотности раствора 2,6-ДФИФ при λ=515 нм, т.к. продукты реакции при этой длине волны не поглощают (Рисунок 23).

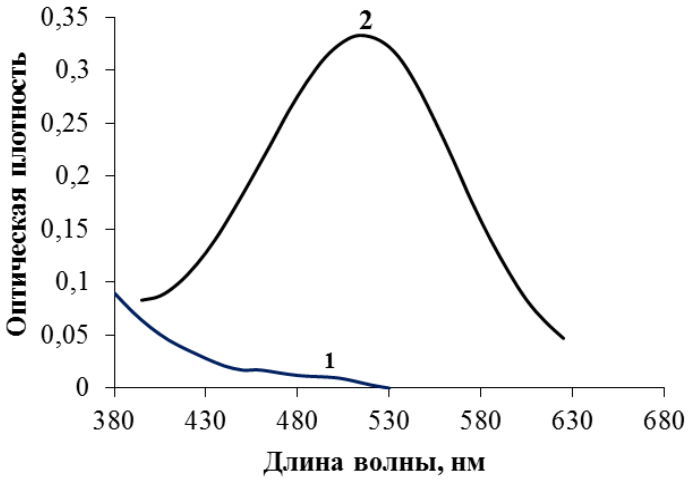


Рисунок 23. Спектры поглощения растворов: 1 – лейко-соединение 2,6-ДФИФ (С(ДФИФ) – 38 мкМ, С(HCl) – 0,1 М, С(АК) – 110 мкМ); 2 – 2,6-ДФИФ (С(ДФИФ) – 38 мкМ, С(HCl) – 0,1 М, С(АК) – 14 мкМ).

Для достижения оптимальных условий протекания спектрофотометрической реакции было изучено влияние концентрации соляной кислоты и 2,6-ДФИФ на величину аналитического сигнала непосредственно в условиях ЦИА.

При изучении влияния концентрации соляной кислоты на протекание спектрофотометрической реакции через краны-переключатели (5 и 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8) подавали 0,25 мл 17 мкМ раствора АК (5, *f*), 0,1 мл раствора соляной кислоты с концентрацией от 1 до 500 мМ (7, *a*), 0,25 мл раствора 2,6-ДФИФ с концентрацией 7 мкМ (7, *c*) и поток воздуха (5, *d*) со скоростью 6 мл/мин, обеспечивающий перемешивание растворов в РЕ (Рисунок 30). Продолжительность перемешивания раствора в РЕ потоком воздуха составила 10 с.

После этого раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (9), измеряли оптическую плотность раствора (λ=515 нм) в условиях остановленного потока в течение 10 с и раствор сбрасывали.

Согласно полученным данным, при прочих равных условиях аналитический сигнал максимален при концентрации соляной кислоты 5 мМ (Рисунок 24). При дальнейшем увеличении концентрации соляной кислоты происходит протонирование реагента, и наблюдается уменьшение оптической плотности. Для

дальнейших экспериментов данная концентрация была выбрана в качестве оптимальной.

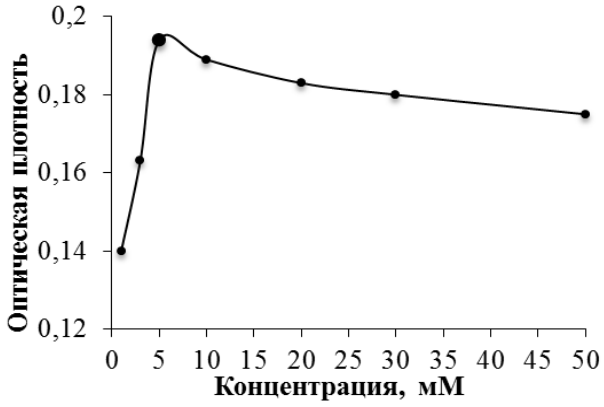


Рисунок 24. Влияние концентрации соляной кислоты на оптическую плотность раствора аналитической формы АК (С(ДФИФ) – 7 мкМ, С(АК) – 17 мкМ).

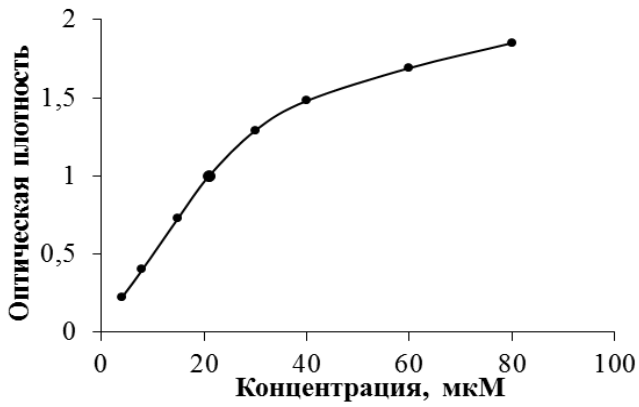


Рисунок 25. Влияние концентрации 2,6-ДФИФ на оптическую плотность раствора (С(HCl) – 5 мМ).

При определении АК фиксируется уменьшение оптической плотности раствора 2,6-ДФИФ, пропорционально связанное с концентрацией АК. Для выбора концентрации 2,6-ДФИФ через краны-переключатели (5 и 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8) подавали 0,25 мл дистиллированной воды (7, *d*), 0,1 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 5 мМ (7, *a*), 0,25 мл раствора 2,6-ДФИФ с концентрацией от 8 мкМ до 80 мкМ (7, *c*) и поток воздуха со скоростью 6 мл/мин (5, *d*), обеспечивающий перемешивание растворов в РЕ (Рисунок 30). Продолжительность перемешивания раствора в РЕ потоком воздуха составила 10 с. После этого раствор из РЕ (8) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора и измеряли оптическую плотность раствора (λ = 515 нм). В качестве оптимальной была выбрана концентрация 2,6-ДФИФ 20 мкМ, обеспечивающая значение оптической плотности 1 (Рисунок 25). При увеличении концентрации реагента наблюдается отклонение от закона Бугера-Ламберта-Бера.

Особое внимание было уделено оптимизации условий образования аналитической формы по времени. При изучении влияния времени перемешивания

реакционной смеси в РЕ на протекание спектрофотометрической реакции через краны-переключатели (5 и 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8) подавали 0,25 мл водного экстракта листьев смородины (5, *f*), 0,1 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 5 мМ (7, *a*), 0,25 мл раствора 2,6-ДФИФ с концентрацией 20 мкМ (7, *c*) и поток воздуха со скоростью 6 мл/мин (5, *d*), обеспечивающий перемешивание растворов в РЕ (8) (Рисунок 30). Продолжительность перемешивания раствора в РЕ (8) потоком воздуха варьировалось от 5 до 25 с. После этого раствор аналитической формы из РЕ (8) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора и измеряли оптическую плотность раствора (λ = 515 нм).

Другие восстановители, такие как триозы, присутствующие в ЛРС, способны вступать в реакции восстановления с реагентом. Однако эти реакции обладают меньшими константами скоростей реакции по сравнению с константой скорости реакции АК с 2,6-ДФИФ [126]. Время перемешивания реакционной смеси в РЕ ЦИА должно быть достаточным, чтобы обеспечить гомогенизацию раствора и исключить возможное взаимодействие реагента с другими восстановителями. Было установлено, что при увеличении времени перемешивания более 10 с наблюдается ослабление окраски реагента, что связано с влиянием примесных компонентов (Рисунок 26).

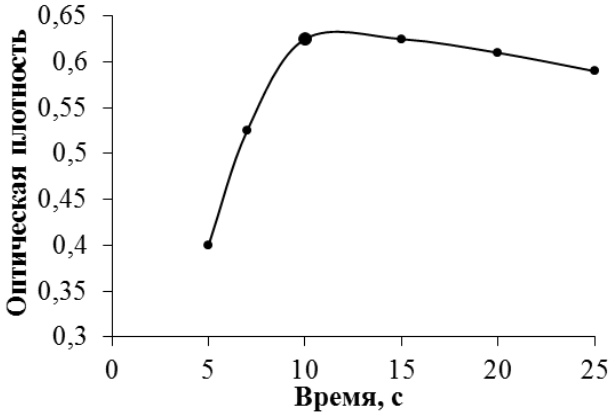


Рисунок 26. Зависимость оптической плотности аналитической формы АК от времени перемешивания (С(ДФИФ) – 20 мкМ, С(HCl) – 5 мМ, скорость потока воздуха – 6 мл/мин).

5.2. Оптимизация процесса извлечения аскорбиновой кислоты из лекарственного растительного сырья

Для оптимизации процесса извлечения АК из ЛРС и продуктов питания было исследовано влияние массы пробы, объема экстрагента и времени извлечения. Степень эффективности извлечения АК рассчитывали на основании результатов двух последовательных автоматизированных извлечений из одной и той же пробы с последующим спектрофотометрическим детектированием.

При изучении влияния массы навески были зафиксированы объем экстрагента – 1,5 мл и время извлечения в УЗ-ванне (130 Вт, 35 кГц) – 10 мин при температуре 25 ^{o}С. В картридж помещали от 0,005 до 0,02 г пробы (листья смородины, красный перец и яблочное пюре) и проводили ЦИ-определение АК по разработанной схеме (пункт 5.3). Далее из этой же пробы проводили вторичное извлечение и определение АК. На основании полученных результатов (Рисунок 27), масса всех исследованных проб равная 0,01 г была выбрана для дальнейших экспериментов. При увеличении массы навески пробы наблюдается уменьшение эффективности извлечения АК, связанное с недостаточным объемом экстрагента, а в случае уменьшения массы наблюдается увеличение СКО.

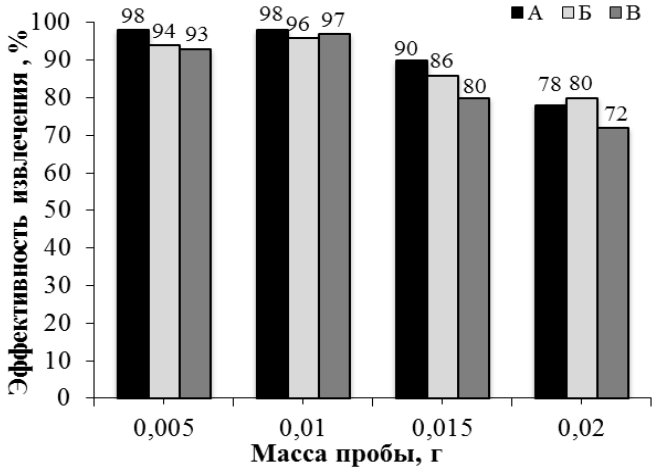


Рисунок 27. Зависимость эффективности извлечения АК от массы пробы: А – сладкий красный перец; Б – листья смородины; В – яблочное пюре (объем экстрагента – 1,5 мл, время извлечения – 10 мин, температура – 25 ^{o}С).

При изучении влияния объема экстрагента на полноту извлечения АК из проб были зафиксированы масса пробы – 0,01 г и время извлечения в УЗ-ванне – 10 мин. Объем экстрагента варьировали в пределах от 0,5 до 2 мл.

При изучении влияния времени извлечения АК из проб на примере листьев смородины были зафиксированы масса навески – 0,01 г и объем экстрагента – 1,5 мл. Время перемешивания пробы с экстрагентом в картридже потоком газа или под действием УЗ варьировали в пределах от 3 до 30 мин.

Анализ проводили по описанной в пункте 5.3 схеме. Из полученных результатов (Рисунки 28, 29) следует, что объем экстрагента равный 1,5 мл и время извлечения АК в УЗ-поле равное 5 мин являются оптимальными. Извлечение проводилось при температуре 25 ^{o}C, так как при повышении температуры скорость разрушения АК возрастает.

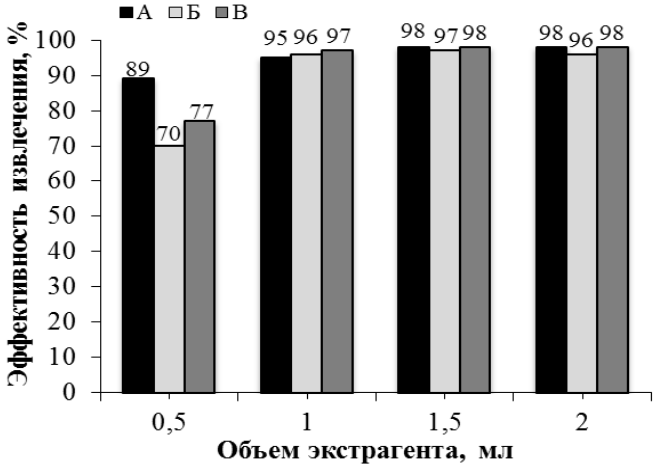


Рисунок 28. Зависимость эффективности извлечения АК от объема экстрагента: А – сладкий красный перец; Б – листья смородины; В – яблочное пюре (масса пробы – 0,01 г, время извлечения – 10 мин, температура – 25 ^{o}C).

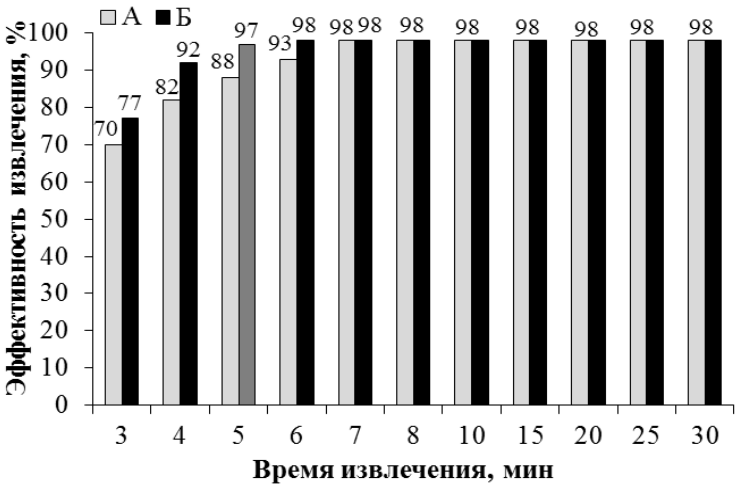


Рисунок 29. Зависимость эффективности извлечения АК от времени: А – перемешивание воздухом; Б – УЗ перемешивание (скорость потока воздуха – 6 мл/мин, объем экстрагента – 1,5 мл, масса пробы – 0,01 г, температура – 25 ^{o}C).

5.3. Методика ЦИ-определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и продуктах питания

На основании проведенных экспериментов, описанных выше, была разработана методика циклического инжекционного спектрофотометрического определения АК в ЛРС: плодах рябины, листьях смородины; и продуктах питания: сладком красном перце, яблочном пюре, яблоке и киви.

В соответствии с разработанной методикой в три съемных картриджа (1, 2, 3) помещали по 0,01 г пробы ЛРС или пищевого продукта (Рисунок 30). Далее все картриджи (1, 2, 3) подключали к многоходовому соленоидному крану (5) и помещали в УЗ-ванну (4). После этого в каждый картридж последовательно подавали по 1,5 мл дистиллированной воды через краны (5 и 7) с помощью перистальтического насоса (6). Затем в течение 5 мин происходило извлечение АК в водную фазу под действием УЗ.

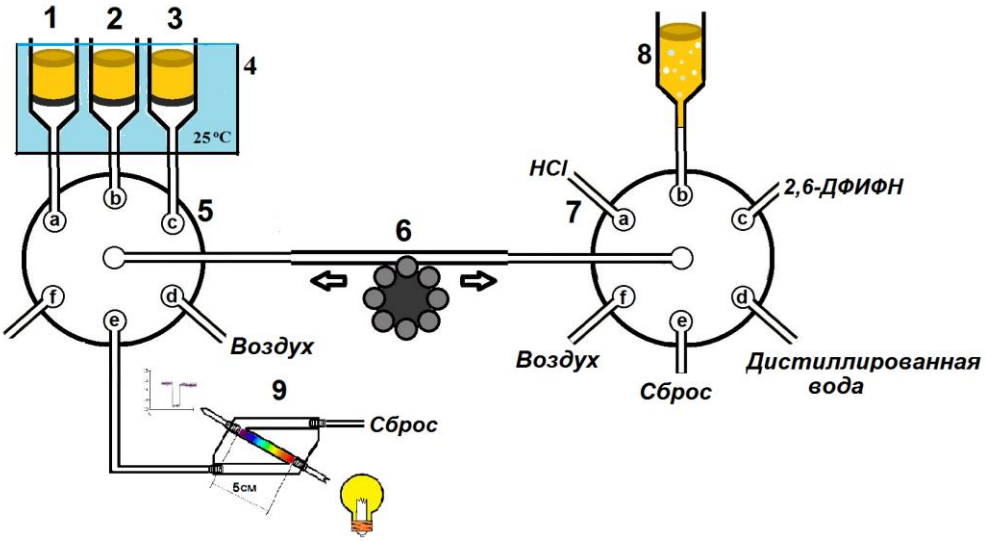


Рисунок 30. Схема ЦИ-определения АК в ЛРС: 1, 2, 3 – картриджи с ПТФЭ фильтрами; 4 – ультразвуковая ванна; 5, 7 – многоходовые краны-переключатели; 6 – перистальтический реверсивный насос; 8 – реакционная емкость; 9 – проточная кювета, подключенная с помощью оптоволоконных кабелей к источнику света и спектрометру.

После этого последовательно в РЕ (8) направляли 0,25 мл экстракта из картриджа (1), 0,1 мл 5 мМ раствора соляной кислоты (7, *a*) и 0,25 мл 20 мкМ раствора 2,6-ДФИФ (7, *c*) и поток воздуха (5, *d*) со скоростью 6 мл/мин в течение 10 с, обеспечивающий интенсивное перемешивание растворов в РЕ. На следующем этапе раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (9), измеряли оптическую плотность раствора (λ = 515 нм) в условиях остановленного потока в течение 10 с и раствор сбрасывали. На заключительном этапе коммуникации системы промывали дистиллированной водой (7, *d*) и измеряли фоновый сигнал при заполнении кюветы смешанным раствором полученного экстракта, 5 мМ раствора соляной кислоты и дистиллированной воды (2,5:1:2,5). После промывки системы проводили детектирование АК в экстрактах, полученных во втором и третьем картриджах (2, 3).

Для задания порядка необходимых операций и количества реагентов составлен алгоритм операций, представленный в Приложении 2, позволяющий

устанавливать состояния управляемых элементов прибора в каждый момент времени. Аналитические характеристики методики представлены в таблице 9. Разработанная методика в отличие от ранее предложенных проточных аналогов обеспечила полную автоматизацию анализа, включая стадию извлечения аскорбиновой кислоты из ЛРС и продуктов питания в раствор. Методика позволяет проводить определение АК в ЛРС и продуктах питания с производительностью 17 проб в час.

Таблица 9. Аналитические характеристики циклической инжекционной спектрофотометрической методики определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания.

Параметр	**Оптимальное значение**
Концентрация соляной кислоты (мМ)	5
Концентрация 2,6-ДФИФ (мкМ)	20
Температура извлечения (^{o}C)	25
Объем экстрагента (мл)	1,5
Масса пробы (г)	0,01
Время извлечения в УЗ-поле (мин)	5
Диапазон определяемых концентраций (%)	0,01 – 0,32
Предел обнаружения (%)	0,003
Коэффициент корреляции	0,999
Sr, % (n = 5)	7
Производительность (проб/час)	17

5.4. Мешающее влияние примесных компонентов

В работе было изучено влияние на определение АК некоторых соединений, имеющих фенольные, карбоксильные и гидроксильные группы. Исследование мешающего влияния было проведено на модельных водных растворах,

содержащих 17 мкМ АК и различные количества примесных компонентов, в соответствии с разработанной автоматизированной методикой. Для оценки селективности реакции использовали фактор селективности, величина которого рассчитывается по уравнению: $F=C_i/C_A$, где C_i – концентрация примесного компонента; C_A − концентрация аналита. Полученные результаты приведены в таблице 10. Не было найдено мешающего влияния в присутствии глюкозы, винной, лимонной, яблочной и фолиевой кислот больше, чем в 10-кратном избытке по отношению к АК. Мешающее влияние цистеина было найдено в 2-кратном избытке. Найденные соотношения [мешающее соединение]/[АК] гораздо больше, чем те, что обычно содержатся в ЛРС [123].

Таблица 10. Факторы селективности для различных примесных компонентов при определении аскорбиновой кислоты.

Примесный компонент	**Фактор селективности**
Fe (II)	2
Sn (II)	2
Цистеин	2
Cu (II)	3,5
Глюкоза	10
Лимонная кислота	15
Винная кислота	25
Фолиевая кислота	50
Яблочная кислота	50

5.5. Испытание методики на реальных объектах анализа

Разработанная методика апробирована на различном ЛРС и продуктах питания (Таблица 11). Правильность полученных результатов подтверждена методом КЭ с УФ-детектированием.

Важным фактором, влияющим на время миграции и разделение веществ в КЭ, является выбор фонового электролита. Применение боратного буферного раствора

(pH=8,0) обеспечивает появление воспроизводимых и хорошо разрешенных пиков АК на электрофореграмме через 6 мин.

Перед началом работы капилляр промывали в течение 2 мин 0,1 М раствором NaOH, в течение 2 мин дистиллированной водой и в течение 5 мин боратным буферным раствором (pH=8,0). Между инжекциями капилляр промывали боратным буферным раствором (pH=8,0) в течение 3 мин.

В ходе оптимизации условий анализа было изучено влияние концентрации электролита. Симметрия пиков и стабильность фонового сигнала наблюдались при концентрации боратного буферного раствора равной 50 мМ, которая была выбрана для дальнейших экспериментов. Раствор Трилона Б, входящий в состав боратного буферного раствора, необходим для того, чтобы связать ионы металлов находящиеся в растворе, так как они являются катализаторами реакций окисления АК. Для расчета эффективных электрофоретических подвижностей в качестве маркера электроосмотического потока был взят ацетон.

Также было изучено влияние времени инжекции экстракта на аналитический сигнал. Для этого 0,05 мМ раствор АК отбирали в прибор для высокоэффективного капиллярного электрофореза в течение 2, 4, 6, 8 и 10 с. При времени инжекции больше, чем 4 с, чувствительность анализа значительно не изменялась, однако при этом наблюдалась ассиметрия пиков. Поэтому время инжекции равное 4 с было выбрано в качестве оптимального.

Для определения АК методом КЭ навеску ЛРС помещали в ступку, измельчали и добавляли 1 мл 50 мМ боратного буферного раствора (pH=8,0), затем все помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили дистиллированной водой до метки. Полученное извлечение фильтровали через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. Ввод пробы производили гидродинамически под давлением – 150 мбар·с. Электрофоретическое разделение осуществляли в боратном буферном растворе, при напряжении +20 кВ, температуре +20 °С и нормальной полярности. Детектируемая длина волны составляла 254 нм. Для анализа были использованы кварцевые капилляры (Lобщ/Lэф=60/50, внутренний диаметр 75 мкм). Охлаждение капилляров использовалось жидкостное (t=20 °С).

При проведении эксперимента была использована процедура градуировки прибора по стандартным растворам АК, которые подвергались аналогичным процедурам анализа, что и реальные объекты. На рисунке 31 представлен градуировочный график для определения АК в ЛРС и продуктах питания методом КЭ.

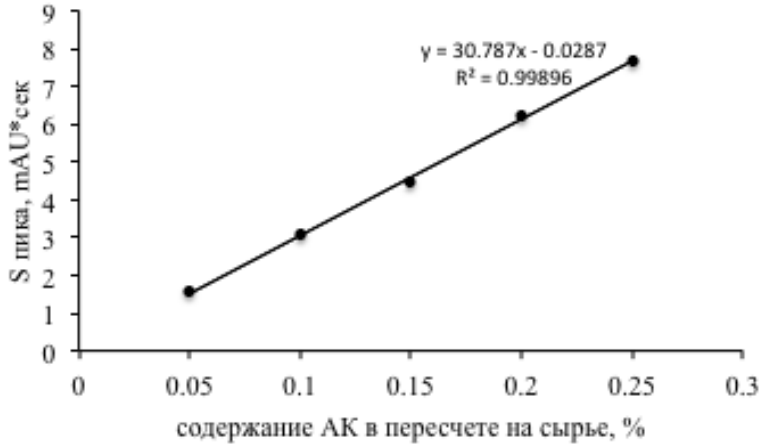
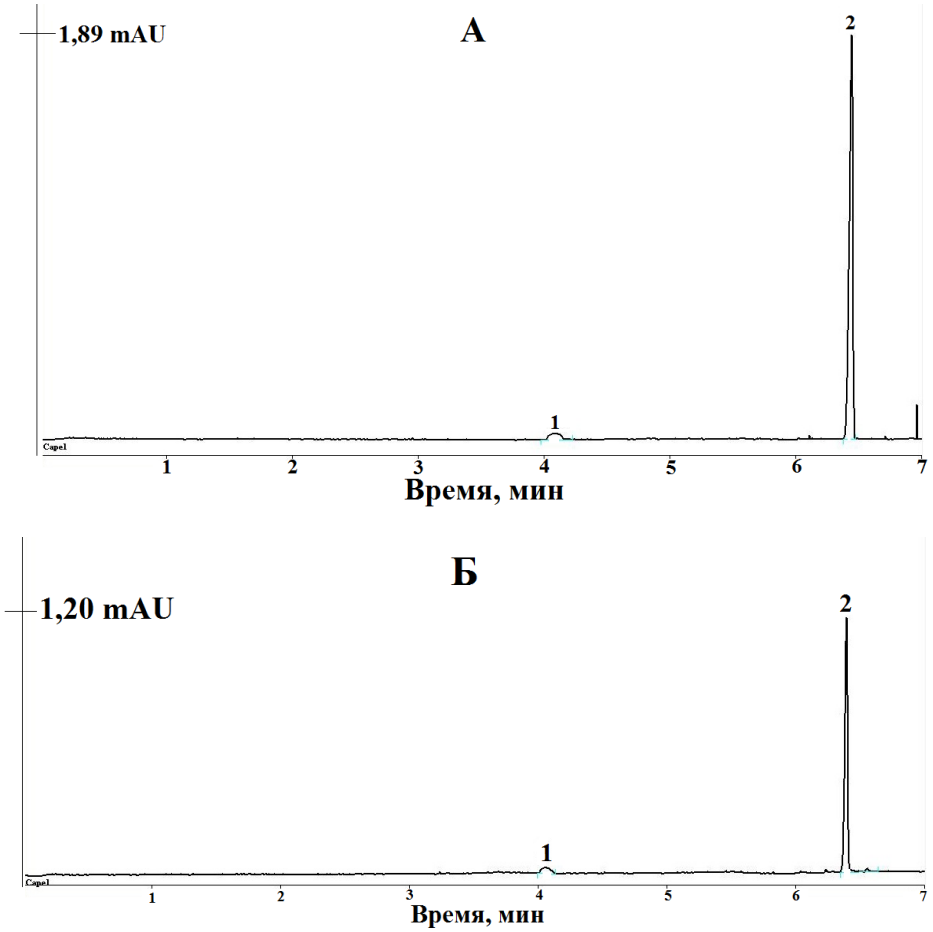


Рисунок 31. Градуировочный график для определения АК в ЛРС методом КЭ.

Некоторые из полученных электрофореграмм представлены на рисунке 32.



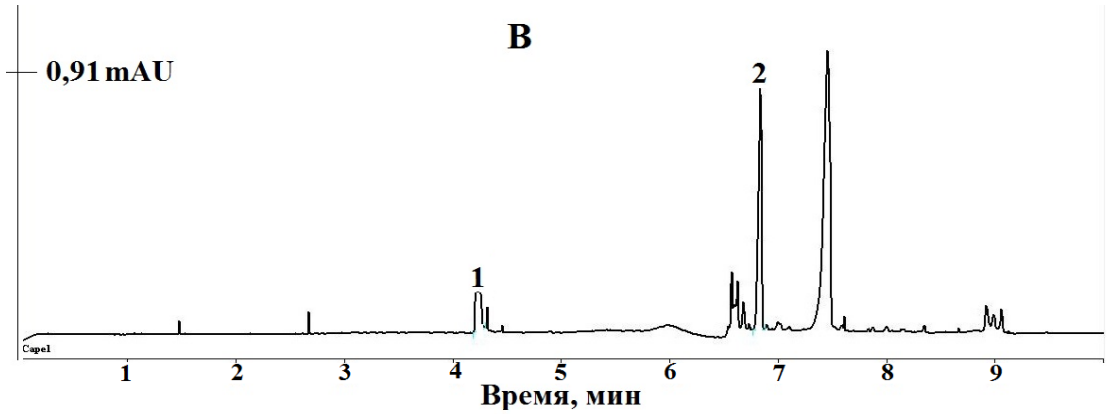


Рисунок 32. Электрофореграммы: А – экстракт сладкого красного перца; Б – экстракт киви; В – экстракт плодов рябины (1 – ацетон; 2 – АК) (концентрация тетраборат-иона – 25 мМ, pH=8, время инжекции – 4 с, приложенное напряжение – +20 кВ, температура – +20 °С, длина волны – 254 нм).

Результаты, полученные методами ЦИА с извлечением в УЗ-поле и КЭ, были сравнены с помощью F- и t-тестов и представлены в таблице 11.

Полученные F-значения ≤ 6,39 указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения ≤ 2,31 указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи двух методик.

Таблица 11. Результаты определения АК в ЛРС и продуктах питания (n=5, P=0,95).

Проба	**Общее содержание АК, %**			
	ЦИА	**КЭ**	***F*-значение**	***t*-значение**
Листья смородины	0,21±0,01	0,20±0,02	1,90	1,70
Плоды рябины	0,14±0,01	0,12±0,01	2,30	2,07
Киви	0,18±0,01	0,180±0,005	2,10	0,86
Яблоко «Антоновка»	0,060±0,004	0,060±0,003	1,50	0,93
Сладкий красный перец	0,270±0,007	0,250±0,003	2,30	2,10
Яблочное пюре «Агуша»	0,15±0,01	0,13±0,02	1,35	2,20

Глава 6. Разработка методики циклического инжекционного спектрофотометрического определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье

6.1. Оптимизация условий извлечения антрахинонов из лекарственного растительного сырья

Методы анализа ЛРС, как правило, включают стадию извлечения аналитов в жидкую фазу – экстрагент. При анализе ЛРС выбор оптимального экстрагента имеет большое значение. К экстрагентам предъявляются следующие требования: они должны быть избирательными по отношению к аналитам, максимально извлекать БАВ из ЛРС, хорошо смачивать растительный материал. Экстрагенты не должны вступать в химическое взаимодействие с аналитами, а также должны быть безопасными и доступными для использования [127]. На сегодняшний день особый интерес представляет собой применение в качестве экстрагентов растворов поверхностно-активных веществ (ПАВ). Экстракцию с использованием ПАВ в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования (**ККМ**) принято называть мицеллярно-опосредованным извлечением (**МОИ)**. Преимуществами данного метода являются достижение высоких коэффициентов концентрирования микрокомпонентов при использовании малых объемов проб, возможность выделения и разделения веществ различной природы, в том числе заряженных форм, удобство сочетания с разными физико-химическими методами анализа [128–131]. Указанные преимущества обуславливают перспективность использования МОИ в фармацевтическом анализе.

Антрахиноны, как правило, извлекают из ЛРС в органические растворители или в водную фазу при нагревании и под давлением. В данной работе реализован альтернативный метод их извлечения из корней и корневищ марены и коры крушины, который включает в себя процесс МОИ. Было установлено, что использование МОИ при температуре помутнения является эффективной альтернативой использованию органических растворителей для процесса

извлечения. В данном случае раствор ПАВ, концентрация которого выше его ККМ, используется в качестве экстракционного растворителя. При такой концентрации молекулы ПАВ образуют мицеллы [57], которые способны извлекать из ЛРС целевые аналиты, предпочтительно неполярные.

Для достижения эффективного извлечения антрахинонов из ЛРС были оптимизированы такие параметры, как состав экстрагента и его объем, время и температура извлечения в условиях ЦИА.

Различные экстрагенты, такие как ацетон (80 %), этанол, растворы ЦПХ, додецилсульфата натрия и Triton X-100 с концентрацией выше ККМ были изучены для извлечения антрахинонов из растительного сырья. Для этого 0,1 г смеси ЛРС с хлоридом калия (1:10) помещали в картриджи с ПТФЭ фильтрами (1, 2, 3) (Рисунок 40). Далее через краны-переключатели (5, 7) с помощью реверсивного насоса (6) в картриджи (1, 2, 3) подавали по 2 мл соответствующего экстрагента (7, *d*) и проводили процесс извлечения антрахинонов в УЗ-ванне (4) при температуре 75 ^{o}C. Время извлечения антрахинонов из ЛРС составляло 15 мин. После этого через краны-переключатели (5 и 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8) подавали 0,25 мл экстракта пробы (5, *a*) из первого картриджа (1), 0,75 мл экстрагента (7, *d*), 1 мл ацетатного буферного раствора (pH=4,5) (5, *f*) и поток воздуха (5, *d*) в течение 10 с со скоростью 5 мл/мин, обеспечивающий интенсивное перемешивание растворов в РЕ (8). Раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (9), измеряли оптическую плотность раствора при оптимальной длине волны и раствор сбрасывали.

В ходе экспериментов было установлено, что наиболее полное извлечение антрахинонов наблюдается при использовании в качестве экстрагента раствора Triton X-100 с концентрацией выше ККМ ($ККМ_{Triton\ X\text{-}100}=2{,}8\cdot10^{-4}$ М=0,03 %) (Рисунок 33).

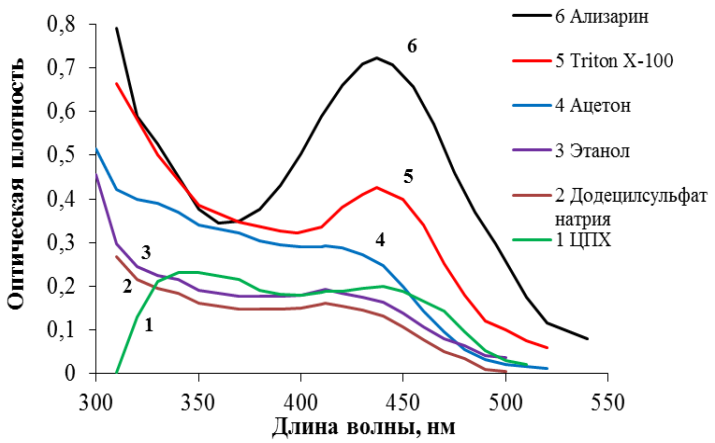


Рисунок 33. Спектры поглощения 2 мМ раствора ализарина в 2 % растворе Triton X-100; экстрактов, полученных при извлечении антрахинонов из ЛРС в различные экстрагенты (объем экстрагента – 2,0 мл, время извлечения – 15 мин, масса пробы – 0,1 г, температура – 75 °С).

Два различных способа извлечения антрахинонов из ЛРС были изучены в диапазоне температур от 25 °С до 75 °С (Рисунок 34): извлечение без и с воздействием УЗ (130 Вт, 35 кГц). Время извлечения было зафиксировано – 15 мин. В ходе экспериментов было установлено, что в обоих случаях максимум аналитического сигнала наблюдается при температуре выше 65 °С, при этом процесс извлечения аналитов в УЗ-поле является более эффективным.

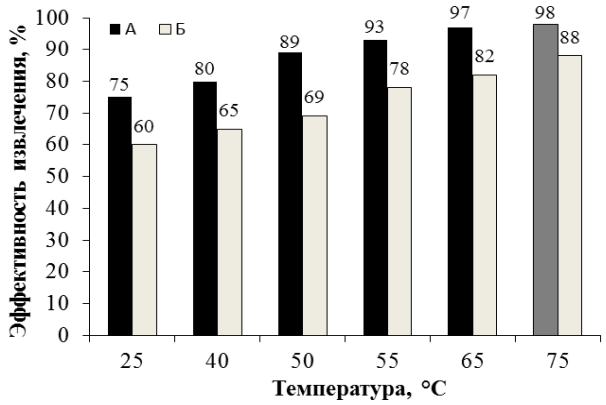


Рисунок 34. Влияние температуры на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС: А – в УЗ-поле; Б – перемешивание воздухом (масса коры крушины – 0,1 г, время извлечения – 15 мин, объем экстрагента – 2,0 мл).

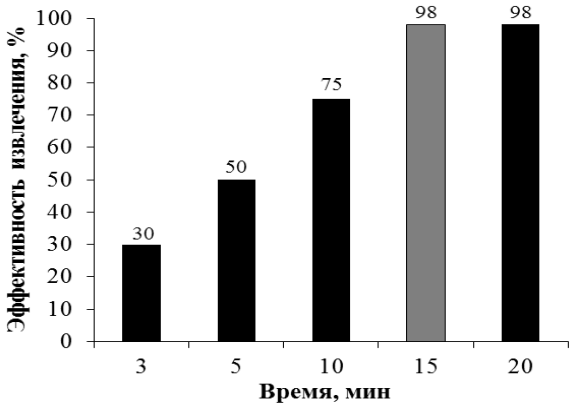


Рисунок 35. Влияние времени УЗ-воздействия на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС (масса корней и корневищ марены – 0,1 г, объем экстрагента – 2,0 мл, температура – 75 °С).

Для определения оптимального времени извлечения антрахинонов из ЛРС проводилась серия экспериментов при варьировании времени перемешивания пробы в УЗ-ванне при 75 ^{o}C в пределах от 3 до 20 мин. На основании полученных данных (Рисунок 35), оптимальным временем извлечения является 15 мин. Концентрация и объем раствора Triton X–100 в диапазоне от 0,01 до 4 % (Рисунок 36) и от 0,5 до 2,5 мл (Рисунок 37) соответственно были исследованы, и значения равные 2 % и 1,5 мл были выбраны в качестве оптимальных.

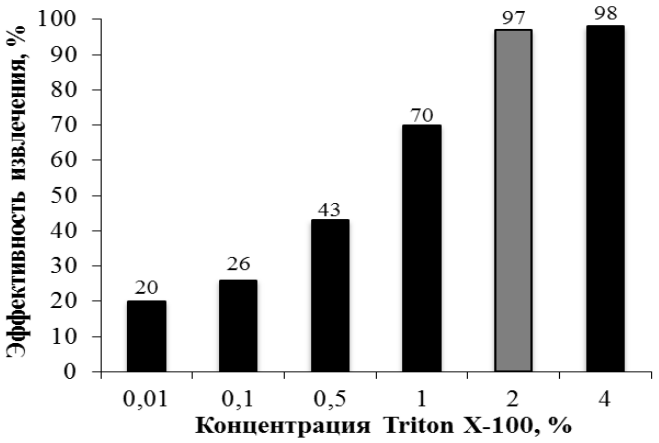


Рисунок 36. Влияние концентрации Triton X-100 на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС (масса корней и корневищ марены – 0,1 г, время извлечения – 15 мин, объем экстрагента – 2,0 мл, температура – 75 ^{o}C).

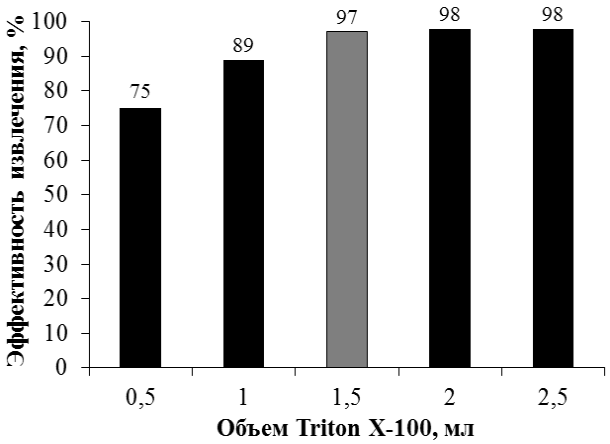


Рисунок 37. Влияние объема экстрагента на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС (масса корней и корневищ марены – 0,1 г, время извлечения – 15 мин, температура – 75 ^{o}C).

При изучении влияния массы навески был зафиксирован объем экстрагента – 2 мл и время извлечения в УЗ-ванне (130 Вт, 35 кГц) – 15 мин при температуре 75 ^{o}C. На основании полученных результатов (Рисунок 38), масса всех исследованных проб равная 0,1 г была выбрана для дальнейших экспериментов.

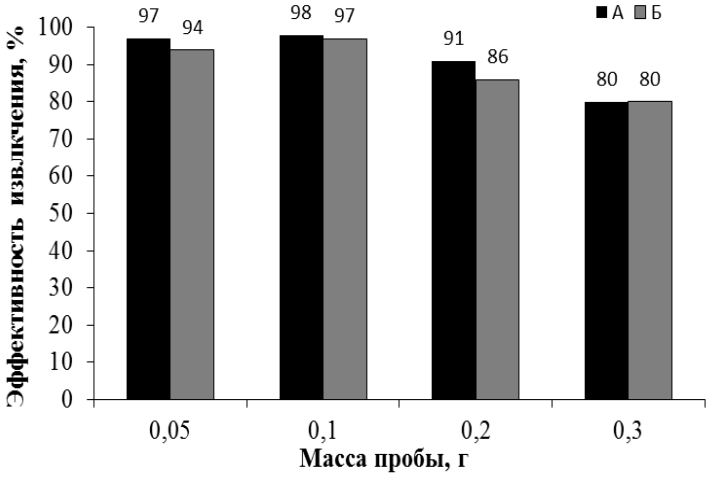


Рисунок 38. Влияние массы пробы на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС: А – кора крушины, Б – корни и корневища марены (объем экстрагента – 2 мл, время извлечения – 15 мин, температура – 75 ^{o}C).

Найденные условия извлечения антрахинонов из корней и кореневищ марены также являются оптимальными для коры крушины и для таблеток «Марены красильной экстракт». Этот факт был доказан экспериментально.

Зависимость величины аналитического сигнала от pH раствора была изучена на модельных 2 мМ растворах ализарина в 2 % растворе Triton X-100 в соответствии с методикой, описанной в пункте 6.2. На основании приведенной на рисунке 39 зависимости, оптимальным значением является pH=4,5.

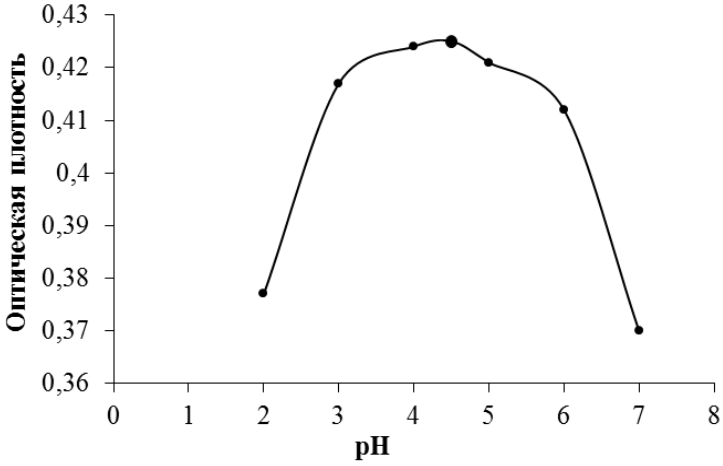


Рисунок 39. Зависимость оптической плотности раствора ализарина от pH (C(ализарин) – 2 мМ, C(Triton X-100) – 2 %, скорость потока воздуха – 5 мл/мин).

6.2. Методика ЦИ-определения общего содержания антрахинонов в ЛРС

На основании проведенных экспериментов, описанных выше, была разработана методика циклического инжекционного спектрофотометрического определения антрахинонов в ЛРС.

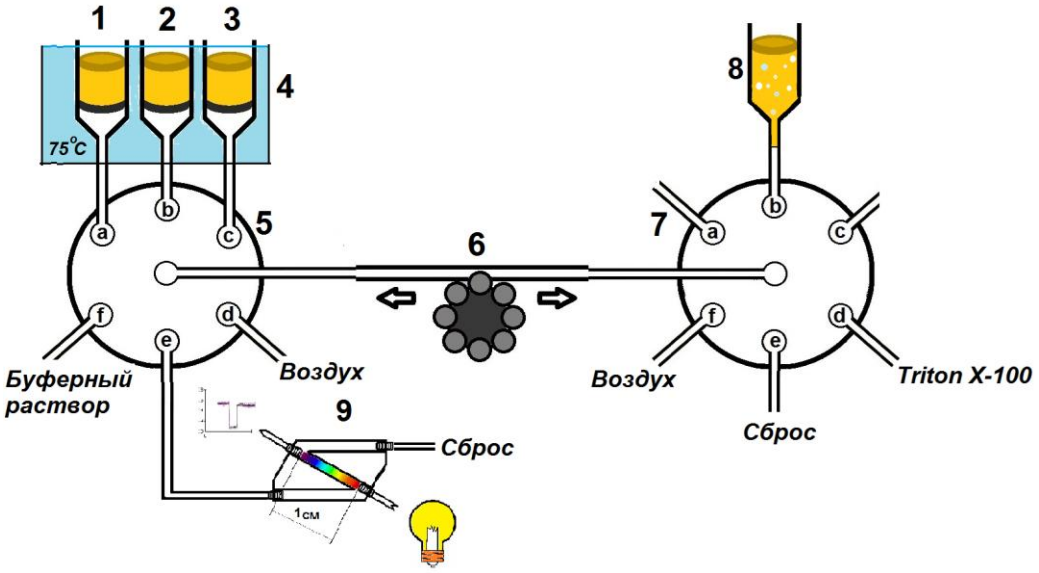


Рисунок 40. Схема ЦИА для определения общего содержания антрахинонов в ЛРС: 1,2,3 – картриджи с ПТФЭ фильтрами; 4 – УЗ-ванна; 5, 7 – многоходовые краны-переключатели; 6 – перистальтический реверсивный насос; 8 – реакционная емкость; 9 – проточная кювета, подключенная с помощью оптоволоконных кабелей к источнику света и спектрометру.

В окончательном варианте разработанной методики 0,1 г смеси ЛРС с хлоридом калия (1:10) помещали в картриджи с ПТФЭ фильтрами (1, 2, 3) (Рисунок 40). Далее через краны-переключатели (5, 7) с помощью реверсивного насоса (6) в картриджи (1, 2, 3) подавали по 1,5 мл 2 % раствора Triton X-100 (7, *d*). Проводили процесс извлечения антрахинонов в УЗ-ванне (4) при температуре 75 ^{o}C. Время извлечения антрахинонов из ЛРС составляло 15 мин. После этого через краны-переключатели (5 и 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8) подавали 0,25 мл экстракта пробы (5, *a*) из первого картриджа (1), 0,75 мл 2 % раствора Triton X-100 (7, *d*), 1 мл ацетатного буферного раствора (pH = 4,5) (5, *f*) и поток воздуха (5, *d*) в течение 10 с со скоростью 5 мл/мин, обеспечивающий интенсивное перемешивание растворов в РЕ (8).

На следующем этапе раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (9), измеряли оптическую плотность раствора (λ = 435 нм) (An) и раствор сбрасывали.

Затем коммуникации системы промывали 2 % раствором Triton X-100 (7, *d*) и проводили аналогичные действия с извлечениями, полученными во втором и третьем картриджах (2, 3).

На заключительном этапе измеряли фоновый сигнал (A_0) при заполнении кюветы детектора (9) 1 мл 2 % раствора Triton X-100 (7, *d*), 1 мл ацетатного буферного раствора (pH=4,5) (5, *f*). Значение аналитического сигнала соответствовало разнице между значениями An и A_0.

Для задания порядка необходимых операций и количества реагентов составлен алгорим операций, представленный в Приложении 3, позволяющий устанавливать состояния управляемых элементов прибора в каждый момент времени. Аналитические характеристики разработанной методики представлены в таблице 12. Разработанная методика в отличие от ранее предложенных проточных аналогов обеспечила полную автоматизацию анализа, включая стадию извлечения антрахинонов из ЛРС и ЛП в раствор. Предложенная ЦИ-методика определения общего содержания антрахинонов позволяет устранить необходимость использования органических растворителей для извлечения аналитов и минимизировать расход реагентов.

Методика позволяет проводить определение антрахинонов в ЛРС с производительностью 9 проб в час.

Таблица 12. Аналитические характеристики циклической инжекционной спектрофотометрической методики определения антрахинонов в ЛРС и ЛП.

Параметр	**Оптимальное значение**
Концентрация Triton X-100 (%)	2
pH (ацетатный буферный раствор)	4,5
Температура извлечения (^{o}C)	65 – 75

Объем экстрагента (мл)	1,5
Масса пробы (г)	0,1
Время извлечения (мин)	15
Диапазон определяемых концентраций (%)	0,65 – 23
Предел обнаружения (%)	0,2
Коэффициент корреляции	0,999
Sr, % (n = 5)	5
Производительность (проб/час)	9

6.3. Мешающее влияние примесных компонентов

При оценке мешающего влияния на результаты определения общего содержания антрахинонов на модельных растворах изучались соединения, потенциально присутствующие в ЛРС. Растворы, содержащие 2 мМ раствор ализарина в 2 % растворе Triton X-100 и различные количества примесных компонентов, подвергались анализу в соответствии с разработанной автоматизированной методикой. Допустимое значение было принято при отклонении аналитического сигнала не более чем на ± 5 %. По отношению к каждому примесному компоненту рассчитывали фактор селективности по уравнению $F=C_i/C_A$, где C_i – концентрация примесного компонента; C_A– концентрация аналита. Полученные результаты приведены в таблице 13. Не было найдено мешающего влияния в присутствии избытка мальтозы, винной, янтарной, фталевой, малоновой, аскорбиновой и щавелевой кислот, сахарозы и глицина. Найденные соотношения [мешающее соединение]/[антрахиноны] в реальных пробах гораздо меньше [132], таким образом можно утверждать, что разработанная методика применима для определения общего содержания антрахинонов в ЛРС.

Таблица 13. Факторы селективности для различных примесных компонентов при определении антрахинонов.

Примесный компонент	Фактор селективности
Мальтоза	20
Фталевая кислота	150
Аскорбиновая кислота	150
Сахароза	1000
Глицин	1000
Малоновая кислота	1000
Винная кислота	2000
Янтарная кислота	2000
Щавелевая кислота	2000

6.4. Испытание методики на реальных объектах анализа

Разработанная методика была использована для определения антрахинонов в различном ЛРС. Расчет содержания антрахинонов в анализируемом растительном сырье осуществляли в пересчете на ализарин. Для проверки правильности методики проводили их параллельное определение методом SIA (Рисунок 41), а также спектрофотометрическим методом в соответствии с фармакопейной статьей [133, 134].

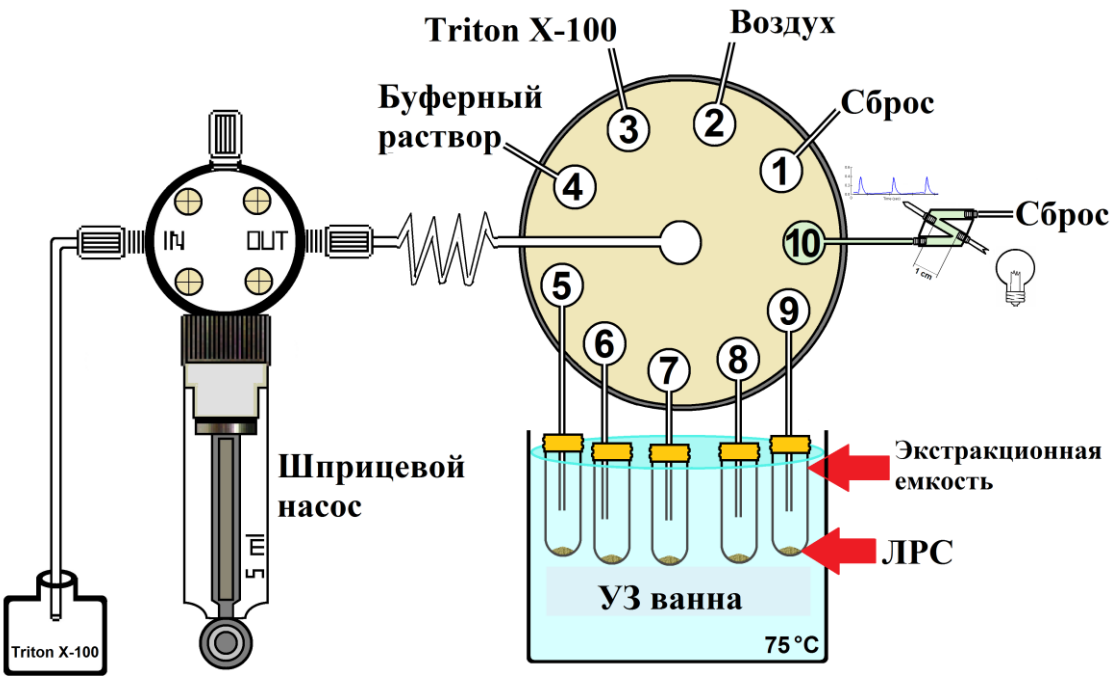


Рисунок 41. Схема SIA для определения общего содержания антрахинонов в ЛРС.

Для достижения эффективного извлечения антрахинонов из ЛРС в условиях SIA были также оптимизированы такие параметры, как состав экстрагента и его объем, время и температура извлечения. Оптимальными условиями являются извлечение аналитов из проб ЛРС в течение 10 мин при температуре 75 ^{o}C в УЗ-поле. Концентрация и объем раствора Triton X–100 в диапазоне от 0,5 до 3 % и от 1 до 3 мл, соответственно, были исследованы, и значения равные 1 % и 2 мл экспериментально были выбраны в качестве оптимальных.

В ходе работы использовали смесь ЛРС с хлоридом калия для повышения прецизионности навески. Для исследования возможного влияния хлорида калия на определение антахинонов была проведена серия экспериментов с растиранием растительного материала с солью и без с дальнейшим автоматизированным определением. На основании полученных данных (Рисунок 42) было установлено, что растирание пробы с хлоридом калия обеспечивает большую прецизионность и снижает величину СКО до 2,9 %.

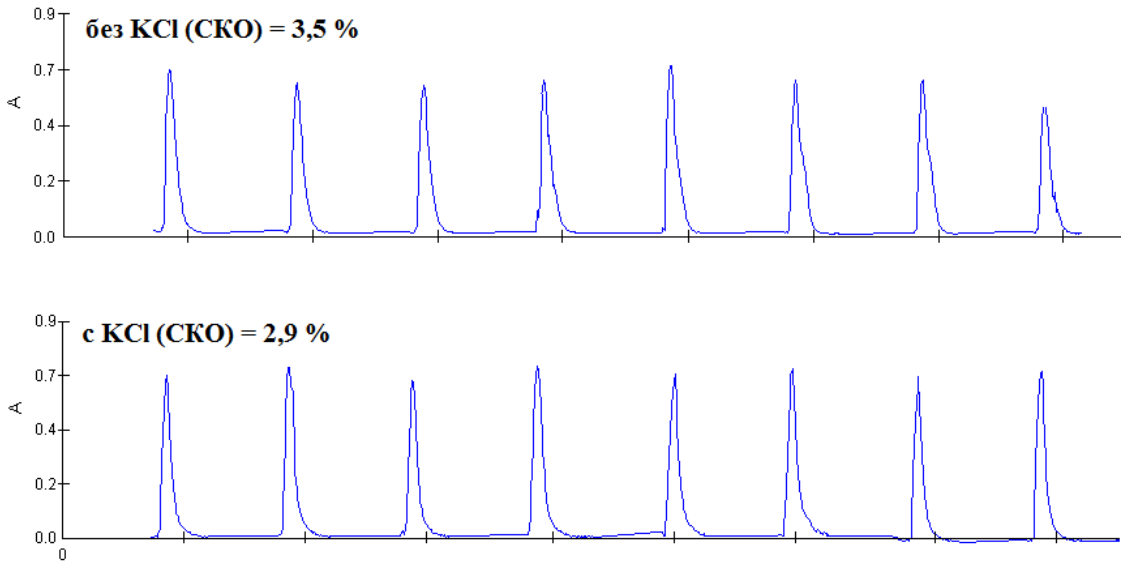


Рисунок 42. Аналитические сигналы при SI-определении антрахинонов в коре крушины (n=8).

В соответствии с SIA методикой на первом этапе в каждую экстракционную емкость (**ЭЕ**) (5 – 9), содержащую 0,01 г смеси ЛРС с хлоридом калия (1:10) последовательно подавали по 2 мл 1% раствора Triton X-100 из резервуара с помощью шприцевого насоса (Рисунок 41). Затем в каждой ЭЕ происходило интенсивное извлечение аналитов в мицеллярную фазу при УЗ воздействии (325 Вт, 35 к Гц) при температуре 75 ^{o}C в течение 10 мин. После этого последовательно в каждую ЭЕ направляли по 0,1 мл ацетатного буферного раствора (pH=4,5) (5) с помощью шприцевого насоса и сегмент воздуха (2) для интенсивного перемешивания извлечений. Затем экстракты подвергались дополнительному УЗ воздействию в течение 1 мин для дегазации. После этого полученные экстракты подавались последовательно в удерживающую спираль и направлялись в Z-образную проточную кювету для спектрофотометрического детектирования (10) при длине волны 435 нм. На заключительном этапе измеряли фоновый сигнал при заполнении проточной кюветы детектора (10) 1 % раствором Triton X-100, содержащим ацетатный буферный раствор (pH=4,5). На Рисунке 43 изображены концентрационные пики, полученные в схеме SIA и градуировочная зависимость аналитического сигнала от концентрации ализарина с уравнением A = 15,83 × C + 0,019, где A – оптическая плотность, C – концентрация ализарина, выраженная в г/л.

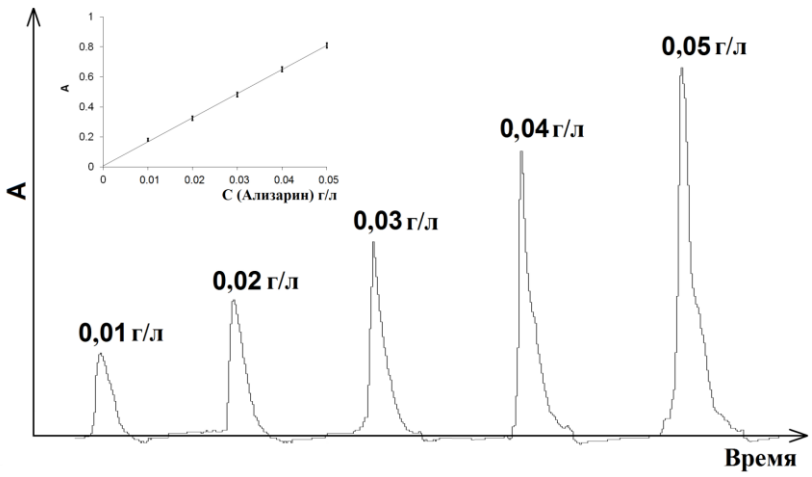


Рисунок 43. Концентрационные пики SIA и градуировочная зависимость.

Результаты, полученные методами ЦИА, SIA и референтным фармакопейным методом, были сравнены с помощью *F*- и *t*-тестов и представлены в таблице 14.

Полученные F-значения ≤ 6,39 указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения ≤ 2,31 указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи данных методик.

Таблица 14. Результаты определения общего содержания антрахинонов в ЛРС (n=5, P=0,95).

Проба	**Общее содержание антрахинонов*, %**						
	ЦИА	**SIA**	**Фармакопейная статья**	**ЦИА – SIA**		**ЦИА – Фарм. Статья**	
				***F*-значение**	***t*-значение**	***F*-значение**	***t*-значение**
Корни и корневища марены	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,3	2,08	1,03	2,82	2,20
Кора крушины	8,3 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,3 ± 0,3	1,01	1,70	3,15	0,22
Таблетки «Марены красильной экстракт»	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,2	1,32	1,40	2,30	0,80
* в пересчете на ализарин							

Выводы

1. Разработана общая аэрогидравлическая схема циклического инжекционного анализа лекарственного растительного сырья с ультразвуковым вскрытием проб.
2. Показана возможность минимизации кинетических ограничений при образовании комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III) в средах цетилпиридиния хлорида.
3. Установлены условия извлечения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ для их экспрессного спектрофотометрического определения.
4. Разработана и аттестована (Приложение 4) методика циклического инжекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье (методика измерений № 01.06.155, свидетельство об аттестации № 01.5.03.178/01.00043/2014). Предел обнаружения флавоноидов в пересчете на рутин составляет 0,1 %. Производительность анализа − 8 проб/час.
5. Разработана методика циклического инжекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания. Предел обнаружения аскорбиновой кислоты составляет 0,003 %. Производительность анализа − 17 проб/час.
6. Разработана и аттестована (Приложение 5) методика циклического инжекционного спектрофотометрического определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье (методика измерений № 01.06.152, свидетельство об аттестации № 01.5.03.177/01.00043/2014). Предел обнаружения антрахинонов в пересчете на ализарин составляет 0,2 %. Производительность анализа − 9 проб/час.
7. Разработанные методики ЦИА апробированы на реальных пробах (различном лекарственном растительном сырье и продуктах питания). Правильность результатов подтверждена методами циклической вольтамперометрии, капиллярного электрофореза и SIA.

Принятые условные сокращения и обозначения

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛП – лекарственный препарат

БАВ – биологически активное вещество

ЦИА – циклический инжекционный анализ

УЗ – ультразвук

АК – аскорбиновая кислота

ПИА – проточно-инжекционный анализ

SIA – последовательный инжекционный анализ

CIA – перекрестный инжекционный анализ

FBA – проточно-порционный анализ

SIC – последовательная инжекционная хроматография

BIA – проточно-инжекционный анализ с возобновляемыми колонками

РЕ – реакционная емкость

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

КЭ – капиллярный электрофорез

ВУП – вспомогательное устройство пробоподготовки

ПТФЭ – политетрафторэтилен

ВЧ – высокие частоты

СВЧ – сверхвысокие частоты

ЦПХ – цетилпиридиния хлорид

2,6-ДФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол

ДАК – дегидроаскорбиновая кислота

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

МОИ – мицеллярно-опосредованное извлечение

ЭЕ – экстракционная емкость

Список литературы

1. Куркин, В.А. Место и роль современной фармакогнозии как науки и учебной дисциплины в фармацевтическом образовании / В.А. Куркин // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4. – С. 676–679.

2. Melchert, W.R. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review / W.R. Melchert, B.F. Reis, F.R.P. Rocha // Analytica Chimica Acta. – 2012. – № 714. – P. 8–19.

3. Galuszka, A. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures / A. Galuszka, P. Konieczka, Z.M. Migaszewski, J. Namiesnik // Trends in Analytical Chemistry. – 2012. – № 37. – P. 61–72.

4. Galuszka, A. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices / A. Galuszka, Z. Migaszewski, J. Namiesnik // Trends in Analytical chemistry. – 2013. – № 50. – P. 78–84.

5. Tiyapongpattana, W. Sequential extraction of phosphorus in soil and sediment using a continuous-flow system / W. Tiyapongpattana, P. Pongsakul, J. Shiowatana, D. Nacapricha // Talanta. – 2004. – № 62. – P.765–771.

6. Legnerova, Z. Sensitive fluorimetric method based on sequential injection analysis technique used for dissolution studies and quality control of prazosin hydrochloride in tablets / Z. Legnerova, J. Huclova, R. Thun, P. Solich // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – № 34. – P. 115–121.

7. Falkova, M.T. Stepwise injection spectrophotometric determination of flavonoids in medicinal plants / M.T. Falkova, M.O. Pushina, A.V. Bulatov, G.M. Alekseeva, L.N. Moskvin // Analytical Letters. – 2014. – № 47. – P. 970–982.

8. Bulatov, A.V. The stepwise injection analysis as a new opportunity for automation of chemical analysis of liquid, gaseous and solid-phase samples / A.V. Bulatov, A.L. Moskvin, L.N. Moskvin, A.V. Mozhuhin // Journal of Flow Injection Analysis. – 2010. – № 27. – P. 13–19.

9. Bulatov, A.V. Stepwise injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active supplements and fodders / A.V. Bulatov, A.V. Petrova, A.B.

Vishnikin, A.L. Moskvin, L.N. Moskvin // Microchemical Journal. – 2013. – № 110. – P. 369–373.

10. Bulatov, A.V. Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine / A.V. Bulatov, A.V. Petrova, A.B. Vishnikin, A.L. Moskvin, L.N. Moskvin // Talanta. – 2012. – № 96. – P. 62–67.

11. Ruzicka, J. Flow injection analysis / J. Ruzicka, E. H. Hansen // Analytical Chemistry. – 2000. – № 72. – P. 212–217.

12. Liawruangrath, S. A Simple Flow Injection Spectrophotometric Procedure for the Determination of Diazepam in Pharmaceutical Formulation / S. Liawruangrath, J. Makchit, B. Liawruangrath // Analytical Sciences. – 2006. – № 22. – P. 127–130.

13. Tzanavaras, P.D. Development and validation of a flow-injection assay for dissolution studies of the anti-depressant drug venlafaxine / P.D. Tzanavaras, A. Verdoukas, D.G. Themelis // Analytical Sciences. – 2005. – № 21. – P. 1515–1518.

14. Ozlu, C. Quantitative determination of ketoprofen in gels and ampules by using flow-injection UV spectrophotometry and HPLC / C. Ozlu, H. Basan, E. Satana, N. Ertas, N.G. Goger // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2005. – № 39. – P. 606–611.

15. Abdurahman, L.K. Flow injection-spectrophotometeric determination of some catecholamine drugs in pharmaceutical preparations via oxidative coupling reaction with p-toluidine and sodium periodate / L.K. Abdurahman, A.M. Al-Abachi, M.H. Al-Qaissy // Analytica Chimica Acta. – 2005. – № 538. – P. 331–335.

16. Pistonesi, M. Simultaneous determination of levodopa and benserazide by stopped-flow injection analysis and three-way multivariate calibration of kinetic-spectrophotometric data / M. Pistonesi, M.E. Centurion, B.S.F. Band, P.C. Damiani, A.C. Olivieri // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – № 36. – P. 541–547.

17. Tipparat, P. Determination of diphenhydramine hydrochloride in some single tertiary alkylamine pharmaceutical preparations by flow injection spectrophotometry / P. Tipparat, S. Lapanantnoppakhun, J. Jakmunee, K. Grudpan // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2002. – № 30. – P. 105–112.

18. Nascimento, R. Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalt (II)–phthalocyanine modified carbon paste electrode / R. Nascimento, T.M.G. Selva, W.F. Ribeiro, M.F. Belia, L. Angnes, V.B. Nascimento // Talanta. – 2013. – № 105. – P. 354–359.

19. Fanjul-Bolado, P. Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes / P. Fanjul-Bolado, P.J. Lamas-Ardisana, D. Hernández-Santos, A. Costa-García // Analytica Chimica Acta. – 2009. – № 638. – P. 133–138.

20. Corujo-Antuna, J. Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals / J. Corujo-Antuna, E.M. Abad-Villar, M.T. Fernandez-Abedul, A. Costa-Garcıa // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2003. – № 31. – P. 421–429.

21. Kongkiatpaiboon, S. HPLC simultaneous analysis for quality assessment of Stemona curtisii roots and determination of their insecticidal activities / S. Kongkiatpaiboon, S. Mikulicic, V. Keeratinijakal, H. Greger, W. Gritsanapan // Industrial Crops and Products. – 2013. – № 43. – P. 648–653.

22. Hussain, M.A. Determination of quercetin in some natural products using reversed FIA-CL method / M.A. Hussain, K.M. Mahmoud // Der Pharma Chemica. –2011. – № 3. – P. 321–329.

23. Ruzicka, J. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays / J. Ruzicka, G.D. Marshall // Anaytica Chimica Acta. –1990. – № 237. – P. 329–343.

24. Lenghor, N. Sequential injection redox or acid–base titration for determination of ascorbic acid or acetic acid / N. Lenghor, J. Jakmunee, M. Vilen, R. Sara, G.D. Christian, K. Grudpan // Talanta. – 2002. – № 58. – P. 1139–1144.

25. Vishkin, A.B. 11-Molybdobismuthophosphate – A new reagent for the determination of ascorbic acid in batch and sequential injection systems / A.B. Vishkin, T.Y. Svinarenko, H. Sklenarova , P. Solich, Y.R. Bazel, V. Andruch // Talanta. – 2010. – № 80. – P. 1838–1845.

26. Satinsky, D. Monolithic columns – a new concept of separation in the sequential

injection technique / D. Satinsky, P. Solich, P. Chocholous, R. Karlicek // Analytica Chimica Acta. – 2003. – № 499. – P. 205–214.

27. Satınsky, D. Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations / D. Satınsky, L.M.L. Dos Santos, H. Sklenarova, P. Solich, M.Conceic, B.S.M. Montenegro, A.N. Araujo // Talanta. – 2005. – № 68. – P. 214–218.

28. Nacapricha, D. Cross injection analysis: Concept and operation for simultaneous injection of sample and reagents in flow analysis / D. Nacapricha, P. Sastranurak, T. Mantim, N. Amornthammarong, K. Uraisin, C. Boonpanaid, C. Chuyprasartwattana, P. Wilairat // Talanta. – 2013. – № 110. – P. 89–95.

29. Ruedas Rama, M.J. Bead injection spectroscopy-flow injection analysis (BIS-FIA): an interesting tool applicable to pharmaceutical analysis: Determination of promethazine and trifluoperazine / M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – № 35. – P. 1027–1034.

30. Honorato, R. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimization algorithm for end point search / R. Honorato // Analytica Chimica Acta. – 1999. – № 396. – P. 91−97.

31. Diniz, P. Flow-batch analysis / P. Diniz, L. Almeida, D. Harding, M. Araujo // Trends in Analytical Chemistry. – 2012. – № 35. – P. 39−49.

32. Freitas, S.K.B. A multicommuted flow analysis method for the photometric determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations using a diazo coupling reaction / S.K.B. Freitas, V. Silv, A.N. Araujo, M.B.S. Montenegro, B.F. Reisd, A.P.S. Paim // Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2011. – № 22. – P. 279–285.

33. Mozzhukhin, A.V. Stepwise injection analysis as a few method of flow analysis / A.V. Mozzhukhin, A.L. Moskvin, L.N. Moskvin // Journal of Analytical Chemistry. – 2007. – № 62. – P. 475–478.

34. Bulatov, A.V. The stepwise injection analysis as a new opportunity for automation of chemical analysis of liquid, gaseous and solid-phase samples / A.V. Bulatov, A.L. Moskvin, L.N. Moskvin, A.V. Mozhuhin // Journal of Flow Injection Analysis. – 2010. – № 27. – P. 13–19.

35. Bulatov, A.V. Stepwise injection photometric determination of ascorbic acid in drugs / A.V.Bulatov, U.M. Strashnova, A.L. Moskvin, L.N. Moskvin, A.B.Vishnikin, G.M. Alekseeva, T.D. Sineva // Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – № 66. – P. 275 p.

36. Can, N.O. Determination of cefuroxime axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis / N.O. Can, G. Altiokka, H.Y. Aboul-Enein // Analytica Chimica Acta. – 2006. – № 576. – P. 246–252.

37. Tzanavaras, P.D. Validated flow injection spectrophotometric assay for the quality and stability control of gemfibrozil tablets / P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis // Analytical Letters. – 2005. – № 38. – P. 2165–2173.

38. Al-Momani, I.F. Flow injection spectrophotometric determination of the antibacterial levofloxacin in tablets and human urine / I.F. Al-Momani // Analytical Letters. – 2006. – № 39. – P. 741–750.

39. Lazaro, F. Novel strategies in flow-injection analysis / F. Lazaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1988. – № 6. – P. 585–598.

40. Lamparter, E. The automation of dissolution testing of solid oral dosage forms / E. Lamparter, C. Lunkenheimer // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1992. – № 10. – P. 727–733.

41. Sultan, S.M. Use of a sequential injection technique for mechanistic studies and kinetic determination of bromazepam complexed with iron(II) in hydrochloric acid / S.M. Sultan, F.E.O. Suliman // Analyst. – 1996. – P. 617–621.

42. Polasíek, M. Chemiluminescence determination of antibacterial drug trimethoprim by automated sequential injection technique with permanganate and hexametaphosphate as reagents / M. Polasíek, M. Jambor // Talanta. – 2002. – № 58. – P. 1253–1261.

43. Sultan, S.M. Sequential injection analysis technique for the concentration, stoichiometry and formation constant studies of promethazine hydrochloride complexed with palladium (II) in hydrochloric acid / S.M. Sultan, N.I. Desai // Analyst. – 1997. – P. 911–914.

44. Kubiak, W.W. The sequential injection system with adsorptive stripping voltammetric detection / W.W. Kubiak, R.M. Latonen, A. Ivaska // Talanta. –2001. – №

53. – P. 1211–1219.

45. Pimenta, A.M. Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection / A.M. Pimenta, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro // Analytica Chimica Acta. – 2001. – № 438. – P. 31–38.

46. Pimenta, A.M. Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system / A.M. Pimenta, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro // Analytica Chimica Acta. – 2002. – № 470. – P. 185–194.

47. Fernandes, R.N. LC determination of the enantiomeric purity of levamisole using stationary phase with bonded naphthylethylcarbamoylated-β-cyclodextrin / R.N. Fernandes, M.G.F. Sales, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2001. – № 25. – P. 407–415.

48. Pimenta, A.M. A sequential injection analysis system for potassium clavulanate determination using two potentiometric detectors / A.M. Pimenta, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2002. – № 30. – P. 931–937.

49. Marcolino, L.H. Flow-injection spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using ammonium molybdate as chromogenic reagent / L.H. Marcolino, R.A. Sousa, O. Fatibello-Filho, F.C. Moraes, M.F.S. Teixeira // Analytical Letters. – 2005. – № 38. – P. 2315–2326.

50. Pasekova, H. Determination of some sulphonamides by sequential injection analysis with chemiluminescence detection / H. Pasekova, M. Polasek, J.F. Cigarro, J. Dolejsíova // Analytica Chimica Acta. – 2001. – № 438. – P. 165–173.

51. Van Staden, J.F. Determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system / J.F. van Staden, M. Tsanwani // Talanta. – 2002. – № 58. – P. 1095–1101.

52. Sultan, S.M. Use of the sequential injection technique to determine the concentrations and stoichiometries of trimeprazine and perphenazine complexed with palladium (II) in hydrochloric acid / S.M. Sultan, F.E.O. Suliman, B.B. Saad // Analyst. – 1995. – P. 561–

563.

53. De Oliveira, P.R. Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles / P.R. de Oliveira, M.M. Oliveira, A.J.G. Zarbin, L.H. Marcolino-Juniora, M.F. Bergamini // Sensors and Actuators. – 2012. – P. 795–802.

54. Gupta, V.K. Flow injection analysis of cholesterol using FFT admittance voltammetric biosensor based on MWCNT–ZnO nanoparticles / V.K. Gupta, P. Norouzi, H. Ganjali, F. Faridbod, M.R. Ganjali // Electrochimica Acta. – 2013. – № 100. – P. 29–34.

55. Kubiak, W.W. The sequential injection system with adsorptive stripping voltammetric detection / W.W. Kubiak, R.M. Latonen, A. Ivaska // Talanta. – 2001. – № 53. – P. 1211–1219.

56. Stefan, R.I. Immunosensor for the determination of azidothymidine: Its utilization as detector in a sequential injection analysis system / R.I. Stefan, R.G. Bokretsion, J.F. van Staden, H.Y. Aboul-Enein // Talanta. – 2003. – № 59. – P. 883–887.

57. Volikakis, G.J. Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection: adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes / G.J. Volikakis, C.E. Efstathiou // Talanta. – 2000. – № 51. – P. 775–785.

58. Can, N.O. Determination of cefuroxime axetil in tablets and biological fluids using liquid chromatography and flow injection analysis / N.O. Can, G. Altiokka, H.Y. Aboul-Enein // Analytica Chimica Acta. – 2006. – № 576. – P. 246–252.

59. Boldizsar, I. Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography / I. Boldizsar, Z. Szucs, Zs. Fuzfai, I. Molnar-Perl // Journal of Chromatography A. – 2006. – № 1133. – P. 259–274.

60. Liu, X. Separation and determination of three water-soluble compounds in Salvia miltiorrhiza Bunge and two related traditional medicinal preparations by flow injection-capillary electrophoresis / X. Liu, J. Zhang, X. Chen // Journal of Chromatography B. – 2007. – № 852. – P. 325–332.

61. Ahmed, S. Selective determination of quinones by high-performance liquid

chromatography with on-line post column ultraviolet irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection / S. Ahmed, S. Fujii, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda // Journal of Chromatography A. – 2006. – № 1133. – P. 76–82.

62. Г.П. Яковлева. Лекарственное сырье животного и растительного происхождения. Фармакогнозия. Спб.: Спецлит. – 2006. – С. 845.

63. Magalhaes, L.M. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity / L.M. Magalhaes, M. Santos, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima // Talanta. – 2009. – № 77. – P. 1559–1566.

64. Matkowski, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review / A. Matkowski // Biotechnology Advances. – 2008. – № 26. – P. 548–560.

65. Tabart, J. Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages / J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J.O. Defraigne, J. Dommes // Food Chemistry. – 2010. – № 120. – P. 607–614.

66. Arts, I.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies / I.C. Arts, P.C. Hollman // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2005. – № 81. – P. 317–325.

67. Bagdonaite, E. Variation in concentrations of major bioactive compounds in Hypericum perforatum L. from Lithuania / E. Bagdonaite, P. Martonfi, M. Repcak, J. Labokasa // Industrial Crops and Products. – 2011. – № 35. – P. 302–308.

68. Гришина, Е.И. Фармакогнозия / Е.И. Гришина, И.С. Погодин, Е.А. Лукша // Омск. – 2008. – С. 697.

69. Halliwell, B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection / B. Halliwell // Drugs. – 1991. – № 42. – P. 569.

70. Смирнова, М.И. Витамины / М.И. Смирнова // М.: Медицина. – 1984. – С. 414.

71. Березовский, В.М. Химия витаминов / В.М. Березовский // М.: Пищевая промышленность. – 1973. – С. 303.

72. Block, G. Vitamin C and reduced mortality / G. Block // Epidemiology. – 1992. – P. 191.

73. Государственная фармакопея XI изд. М.: Медицина. Вып 2. – 1990.

74. Николаева, И.Г. Количественное определение флавоноидов в ноотропном сборе

/ И.Г. Николаева, Л.Д. Дымшеева // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра РАМН. – 2009. – № 3. – С. 353.

75. Зиэп Нго, Т.Т. Разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве пустырника спектрофотометрическим методом / Т.Т. Зиэп Нго, Е.В. Жохова // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 73.

76. Еськин, А.П. Метод количественного фотометрического определения дигидрокверцетина / А. П. Еськин, В. А. Левданский, Н. И. Полежаева // Химия растительного сырья. – 1998. – № 3. – С. 41.

77. Курдинская, В.А. Спектрофотометрическое определение флавоноидов по реакции азосочетания с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония / В. А. Курдинская, С. Г. Дмитриенко, Ю. А. Золотов // Вестник Московского Университета. – 2010. – № 4. – С. 296.

78. Sun, R. Simultaneous kinetic spectrometric determination of three flavonoid antioxidants in fruit with the aid of chemometrics / R. Sun, Y. Wang, Y. Ni, S. Kokot // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2014. – № 122. – P. 529.

79. Лебедева, М.И. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учеб. пособие / М.И. Лебедева // Тамбов: ТГТУ. – 2005. – С. 216.

80. Zheng, X.F. Electroanalysis of kaempferol using pyrolytic graphite electrode and hemoglobin/polysorbate-20 modified electrodes / X.F. Zheng, J. Zao, G.F. Chen, S.L. Liu, G.X. Li // Journal of Analytical Chemistry. – 2008. – № 63. – P. 416.

81. Sun, S. A molecularly imprinted polymer with incorpareted graphene oxide for electrochemical determination of quercetin / S. Sun, M. Zhanq, X. He // Sensors (Basel). – 2013. – № 13. – P. 5493.

82. Hu, Y. A novel solid fluorescence method for the fast determination of quercetin in biological samples based on the quercetin-Al (III) complex imprinted polymer / Y. Hu, T. Feng, G. Li // Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2014. – №118. – P. 921–928.

83. Бельтюкова, С.В. Люминесцентное определение флавонолов как индикаторных компонентов лекарственного растительного сырья / С.В. Бельтюкова, А.А. Бычкова

// Труды Одесского политехнического университета. –2008. – № 30. – С. 242–247.

84. Салахов, И.А. Определение флавоноидов боярышника в лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов // Прикладная химия и химическая технология. – 2007. – № 6. – С. 22.

85. Моисеев, Д.В. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в соцветиях лабазника вязолистного методом жидкостной хроматографии / Д.В. Моисеев // Вестник фармации. – 2011. – № 4. – С. 36.

86. Зимина, Л.Н. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятнистого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.Н. Зимина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Медицинский Альманах. – 2012. – № 2. – С. 227.

87. Ren, Z.Y. Simultaneous determination of nine flavonoids in Anaphalis margaritacea by capillary zone electrophoresis / Z.Y. Ren, Y. Zhang, Y.P. Shi // Talanta. – 2009. – № 78. – P. 959–963.

88. Raghu, V. Comparison of ascorbic acid content of Emblica officinalis fruits determined by different analytical methods / V. Raghu, K. Platel, K. Srinivasan // Journal of food composition and analysis. – 2007. – № 20. – P. 529–533.

89. Коренман, И.М. Фотометрический анализ органических веществ / И.М. Коренман // М: Химия. – 1975. – С. 173.

90. Chen, Y.L. Abstract of papers, Pittsburgh conference in analitical chemistry and applied spectroscopy / Y.L. Chen, J.X. Xiao, Z.W. Wang // Chicago. – 1994. – P. 142.

91. Ferreura, S.L.C. Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in the presence of potassium cyanide / S.L.C. Ferreura, M.L.S.F. Bandeira, V.A. Lemos, J. Fresenius // Journal of Analytical Chemistry. – 1997. – № 357. – P. 1774.

92. Barrales, P.O. Indirect determination of ascorbic acid by solid-phase spectrophotometry / P.O. Barrales, M.L. Fernandez de Cordova, A.M. Diaz // Analytica Chimica Acta. – 1998. – № 360. – P. 143–152.

93. Фарайзаде, М.А. Простой и надежный спектрофотометрический метод определения аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах / М.А. Фарайзаде, А.А. Нагизаде // Журнал аналитической химии. – 2003. – № 58. – С. 108.

94. Таубе, А.А. Оценка содержания аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах флуориметрическим методом / А.А. Таубе, Е.И. Саканян, Е.В. Галушина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – №4. – С. 42–45.

95. Абдуллина, С.Г. Способ кулонометрического определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и препаратах из растительного сырья / С.Г. Абдуллина, Н.М. Агапова, Р.Ш. Хазиев // Патент №2010137455. – 2010.

96. Nojavana, S. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of Rosa canina L. fruit / S. Nojavana, F. Khalilianab, F.M. Kiaiec, A. Rahimic, A. Arabanianc, S. Chalavia // Journal of food composition and analysis. – 2008. – № 21. – P. 300–305.

97. Марахова, А.И. Спектрофотометрия в анализе сборов / А.И. Марахова, А.С. Аврач, Т.А. Скалозубова, А.А. Сорокина, Е.В. Сергунова, Н.Н. Федоровский // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 2. – С. 79.

98. Sakulpanich, A. Determination of anthraquinone glicoside content in Cassia fistula leaf extracts for alternative sourse of laxative drug / A. Sakulpanich, W. Gritsanapan // International journal of biomedical and pharmaceutical sciences. – 2009. – P. 42.

99. Kiathevesta, K. Extraction and concentration of anthraquinones from roots of Morinda citrifolia by non-ionic surfactant solution / K. Kiathevesta, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk // Separation and Purification Technology. – 2009. – № 66. – P. 111–117.

100. Hemwimol, S. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of Morinda citrifolia / S. Hemwimol, P. Pavasant, A. Shotipruk // Ultrasonics Sonochemistry. – 2006. – № 13. – P. 543–548.

101. Mehta, J.P. Separation and characterization of antraquinone derivatives from Cassia Fistula using chromatographic and spectral techniques / J.P. Mehta // International journal of chemical sciences. – 2012. – № 10. – P. 306.

102. Fernand, V.E. Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of Cassia alata L. by use of high performance liquid chromatography / V.E.

Fernand, D.T. Dinh, S.J. Washington, S.O. Fakayode, J.N. Losso, R.O. van Ravenswaay, I.M. Warner // Talanta. – 2008. – № 74. – P. 896–902.

103. He, D. Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection / D. He, B. Chen, Q. Tian, S. Yao // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2009. – № 49. – P. 1123–1127.

104. Mandrioli, R. Determination of aloe emodin in Aloe vera extracts and commercial formulations by HPLC with tandem UV absorption and fluorescence detection / R. Mandrioli, L. Mercolini, A. Ferranti, S. Fanali, M. Raggi // Food Chemistry. – 2011. – № 126. – P. 387–393.

105. Boldizsar, I. Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography / I. Boldizsar, Z. Szucs, Z. Fuzfai, I. Molnar-Perl // Journal of Chromatography A. – 2006. – № 1133. – P. 259–274.

106. Qia, S. Rapid and sensitive determination of anthraquinones in Chinese herb using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid with b-cyclodextrin as modifier in capillary zone electrophoresis / S. Qia, S. Cui, X. Chena, Z. Hua // Journal of Chromatography A. – 2004. – № 1059. – P. 191–198.

107. Макринов, И.А. Биологическая мацерация растительных тканей / И.А.Макринов // Москва — Ленинград: Издательство Академии Наук СССР. – 1941. – С. 18.

108. Husa, W. Drug extraction. The swelling of powdered drugs in liquid / W. Husa, G.R. Jones // Journal of American Pharmacists Association. – 1973. – № 26. – P. 20.

109. Асим, М.А. Разработка технологии экстракта жидкого и гранул с полисахаридами из чашелистиков гибискуса сабдариффа / М.А. Асим // Пятигорск. Гос фармацевтический институт. – 1994. – С. 24.

110. Коничев, А.С. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства и недостатки / А.С. Коничев, П.В. Баурин, А.И. Марахова, Л.М. Якубович, М.А. Черникова, Н.Н. Федоровский // Вестник МГОУ. Серия

«Естественные науки». – 2011. – № 3. – С. 49.

111. Дубашинская, Н.В. Определение коэффициента спиртопоглощения корневищ с корнями синюхи / Н.В. Дубашинская, О.М. Хишова // Актуальные вопросы современной медицины и фармации. – 2006. – С. 192.

112. Гончаренко, Г.К. Кинетика экстрагирования растительного материала / Г.К. Гончаренко, Е.И. Орлова // Медицинская промышленность СССР. – 1992. – № 3.

113. Shi, Z. Microwave assisted micellar extraction-HPLC determination of anthraquinone derivatives in semen cassia / Z. Shi, X. Geng, H. Jiang, H. Zhang // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. – 2010. – № 33. – P. 1369.

114. Молчанов, Г.И. Интенсивная обработка лекарственного сырья / Г.И. Молчанов // М.: Медицина. – 1981. – С. 241.

115. Заморуева, Т.А. Исследование гидродинамики слоя некоторых видов лекарственного растительного сырья применительно к условиям экстракции / Т.А. Заморуева // Москва. – 1965. – С. 26.

116. Пшуков, Ю.Г. Влияние ультразвука на коэффициент диффузии глицирризино вой кислоты и экстрактивных веществ в корне солодки гладкой / Ю.Г. Пшуков // Материалы Всес. научной конференции по совершенствованию производства лекарств и галеновых препаратов. Ташкент. – 1969. – С. 184.

117. Shi, Z. Micellar extraction and preconcentration of anthraquinone derivatives from Rhubarb prior to their HPLC-DAD determination / Z. Shi, X. Zhu, Q. Cheng, H. Zhang // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. – 2007. – № 30. – P. 255.

118. Jiang, T.F. Separation and determination of anthraquinones in Cassia obtusifolia (Leguminosae) by micellar electrokinetic capillary electrophoresis / T.F. Jiang, Z.H. Lv, Y.H. Wang // Journal of Separation Science. – 2005. – № 28. – P. 2225.

119. Xia, E. Ultrasound-assisted extraction of oxymatrine from Sophora flavescens / E. Xia, H. Li, X. Xu, F. Li, G. Deng, S. Li, S. Wu, H. Li // Journal of Medicinal Plants Research. – 2012. – № 10. – P. 1991.

120. De Souza, R.F.V. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids / R.F.V. de Souza, W.F. de Giovani // Spectrochimica Acta Part A. – 2005. – № 61. – P. 1985–1990.

121. Доронин, С.Ю. Аналитические возможности реакций первичных ароматических аминов с п-диметиламинокоричным альдегидом в присутствии ионов и мицелл ПАВ / С.Ю. Доронин, Р.К. Чернова, Н.Н. Гусакова // Журнал аналитической химии. – 2005. – № 60. – С. 471–478.

122. Штыков, С.Н. Поверхностно-активные вещества в анализе. Основные достижения и тенденции развития / С.Н. Штыков // Журнал аналитической химии. – 2000. – № 55. – С. 679–686.

123. Pande, G. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops / G. Pande, C.C. Akoh // Food Chemistry. – 2010. – № 120. – P. 1067–1075.

124. Короткова, Е.И. Вольтамперометрический способ количественного определения суммарного содержания флавоноидов в растительном сырье / Е.И. Короткова, А.Н. Вторушина, Е.В. Дорожко, Т.А. Короткова // ГОУ ВПО "Национальный исследовательский Томский политехнический университет". патент РФ № 2441224. – 2012.

125. Ладыгина, Е.Я. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов / Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова и др. // М: Высш. школа. – 1983. – С. 176.

126. Hiromi, K. A rapid sensitive method for the determination of ascorbic acid in the excess of 2,6-dichlorophenolindophenol using a stopped-flow apparatus / K. Hiromi, C. Kuwamoto, M. Ohnishi // Analytical Biochemistry. – 1980. – № 101. – P. 421–426.

127. Дубашинская, Н.В. Некоторые особенности экстрагирования лекарственного растительного сырья / Н.В. Дубашинская, О.М. Хишова, О.М. Шимко // Вестник фармации. – 2006. – № 34. – С. 5.

128. Кущевская, Н.Ф. Мицеллярно-экстракционное концентрирование микрокомпонентов фазами неионных ПАВ при температуре помутнения / Н.Ф. Кущевская, А.Н. Горбачевский, В.А. Дорощук, С.А. Куличенко // Химия и технология воды. – 2008. – № 5. – С. 521.

129. Shemirani, F. Laser induced thermal lens spectrometry for cobalt determination after cloud point extraction / F. Shemirani, N. Shokoufi // Analytica Chimical Acta. –2006. – № 577. – P. 238–243 p.

130. Shariati, S. Cloud point extraction and simultaneous determination of zirconium and hafnium using ICP-OES / S. Shariati, Y. Yamini // Journal of colloid and interface science. – 2006. – P. 419.

131. Kiathevest, K. Extraction and concentration of anthraquinones from roots of Morinda citrifolia by non-ionic surfactant solution / K. Kiathevest, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, A. Shotipruk // Separation and purification technology. – 2009. – № 66. – P. 111–117.

132. Boldizsar, I. Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography / I. Boldizsar, Z. Szucs, Zs. Fuzfai, I. Molnar-Perl // Journal of Chromatography A. – 2006. – № 1133. – P. 259–274.

133. Gaur, R. Herbal drugs and herbal drug preparation. Fangula Bark / R. Gaur, M. Azizi, J. Gan, P. Hansal, K. Harper, R. Mannan, A. Panchal, K. Patel, M. Patel, N. Patel, J. Rana, A. Rogowska // British Pharmacopeia. – 2009. – № 3. – P. 1–3.

134. Tumanova, I. Chapter 76. Rhizomata et radices Rubiae. Total methods of analysis. Herbal drugs / I. Tumanova, A. Arzamastsev, N. Kosireva // Russian Pharmacopoeia XI. – 1989. – № 2. – P. 366–369.

135. Jain, A. Determination of ascorbic acid in soft drinks, preserved fruit juices and pharmaceuticals by flow injection spectrophotometry: Matrix absorbance correction by treatment with sodium hydroxide / A. Jain, A. Chaurasia and, K.Verna // Talanta. – 1995. – № 42. – P. 779–787.

Приложение 1

Матрица для циклического инжекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье

№	Время, с	Объем, мл	Положение крана 5	Положение крана 7	Направление вращения насоса*	Измерение сигнала**	Комментарий
1	40	2	a	d	-1	0	Введение в картридж (1) 70 % этанола
	10	-	a	f			
2	40	2	b	d	-1	0	Введение в картридж (2) 70 % этанола
	10	-	b	f			
3	40	2	c	d	-1	0	Введение в картридж (3) 70 % этанола
	10	-	c	f			
4	600	-	-	-	0	0	Извлечение в УЗ-поле
5	2	0,1	a	a	+1	0	Введение в РЕ (8) извлечения
6	6	0,3	f	a	+1	0	Введение в РЕ (8) $AlCl_3$
	10	-	d	a			
7	6	0,3	a	e	-1	0	Введение в РЕ (8) ЦПХ
	10	-	d	a	+1		
8	2	0,1	b	b	+1	0	Введение в РЕ (9) извлечения
9	6	0,3	f	b	+1	0	Введение в РЕ (9) $AlCl_3$
	10	-	d	b			
10	6	0,3	b	e	-1	0	Введение в РЕ (9) ЦПХ
	10	-	d	b	+1		
11	2	0,1	c	c	+1	0	Введение в РЕ (10) извлечения
12	6	0,3	f	c	+1	0	Введение в РЕ (10)$AlCl_3$
	10	-	d	c			
13	6	0,3	c	e	-1	0	Введение в РЕ (10) ЦПХ
	10	-	d	c	+1		
14	300	-	-	-	0	0	Образование аналитической формы
15	20	-	e	a	-1	П	Перемещение раствора из РЕ (8) в детектор
16	10	0,5	e	d	-1	0	Промывка гидравлической схемы и повторение измерений

Приложение 2

Матрица для циклического инжекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания

№	Время, с	Объем, мл	Положение крана 5	Положение крана 7	Направление вращения насоса*	Измерение сигнала**	Комментарий
1	30	1,5	a	d	-1	0	Введение в картридж (1) дист. воды
	10	-	a	f			
2	30	1,5	b	d	-1	0	Введение в картридж (2) дист. воды
	10	-	b	f			
3	30	1,5	c	d	-1	0	Введение в картридж (3) дист. воды
	10	-	c	f			
4	300	-	-	-	0	0	Извлечение в УЗ-поле
5	5	0,25	a	b	+1	0	Введение в РЕ извлечения
	15	-	d	b			
6	2	0,1	a	a	-1	0	Введение в РЕ HCl
7	5	0,25	a	c	-1	0	Введение в РЕ 2,6-ДФИФ
8	10	-	d	b	+1	0	Перемешивание
9	20	-	e	b	-1	П	Перемещение раствора из РЕ в детектор
10	5	0,25	e	d	-1	0	Промывка гидравлической схемы
11	10	-	e	f	-1	0	Сброс и повторение измерений

Приложение 3

Матрица для циклического инжекционного спектрофотометрического определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье

№	Время, с	Объем, мл	Положение крана 5	Положение крана 7	Направление вращения насоса*	Измерение сигнала**	Комментарий
1	30	1,5	a	d	-1	0	Введение в картридж (1) раствора Triton X-100
	10	-	a	f			
2	30	1,5	b	d	-1	0	Введение в картридж (2) раствора Triton X-100
	10	-	b	f			
3	30	1,5	c	d	-1	0	Введение в картридж (3) раствора Triton X-100
	10	-	c	f			
4	900	-	-	-	0	0	Извлечение в УЗ-поле
5	5	0,25	a	b	+1	0	Введение в РЕ извлечения
7	20	1	f	b	+1	0	Введение в РЕ буферного раствора
	10	-	d	b			
8	15	0,75	a	d	-1	0	Введение в РЕ раствора Triton X-100
9	10	-	d	b	+1	0	Перемешивание
9	20	-	e	b	-1	П	Перемещение раствора из РЕ в детектор
16	5	0,25	e	d	-1	0	Промывка гидравлической схемы
17	10	-	e	f	-1	0	Сброс и повторение измерений

* -1 – вращение насоса против часовой стрелки

0 – остановка насоса

+1 – вращение насоса по часовой стрелке

** 0 – измерения не производят

П – регистрация сигнала с детектора

Приложение 4

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Аттестат аккредитации № 01.00043-2011

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики (метода) измерений
№ 01.5.03.178/01.00043/2014

Методика измерений *«Лекарственное растительное сырье. Определение массовой доли флавоноидов спектрофотометрическим методом»*

предназначена *для применения в химико-аналитических лабораториях для контроля качества лекарственного растительного сырья,*

разработана *Институтом химии СПбГУ, Россия, 198504, г.Санкт-Петербург, Университетский пр., д.26,*

и содержится в *методике измерений № 01.06.155, 2014 г., 10 страниц*

Методика (метод) аттестована(ан) в соответствии с Федеральным законом от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» и ГОСТ Р 8.563-2009.

Аттестация осуществлена по результатам *метрологической экспертизы материалов по разработке методики (метода) измерений и экспериментальных исследований.*

В результате аттестации методики (метода) измерений установлено, что методика (метод) измерений соответствует требованиям, предъявляемым ГОСТ Р 8.563-2009.

Показатели точности измерений приведены в приложении на 1 л.

Проректор по научной работе С.П. Туник

Главный метролог А.А. Шелих

Дата выдачи: 13.05.2014 г.

Рекомендуемый срок пересмотра методики (метода) измерений:

СПбГУ, Россия, 198504, г.Санкт-Петербург, Университетский пр., д.26
Тел./факс (812) 428-68-98, E-mail: metrolog@chem.spbu.ru
Аттестат аккредитации в области обеспечения единства измерений № 01.00043-2011 от 14.09.2011 г.

Приложение 5

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Аттестат аккредитации № 01.00043-2011

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики (метода) измерений № 01.5.03.177/01.00043/2014

Методика измерений *«Лекарственное растительное сырье. Определение массовой доли антрахинонов спектрофотометрическим методом»*

предназначена *для применения в химико-аналитических лабораториях для контроля качества лекарственного растительного сырья,*

разработана *Институтом химии СПбГУ, Россия, 198504, г.Санкт-Петербург, Университетский пр., д.26,*

и содержится в *методике измерений № 01.06.152, 2014 г., 12 страниц*

Методика (метод) аттестована(ан) в соответствии с Федеральным законом от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» и ГОСТ Р 8.563-2009.

Аттестация осуществлена по результатам *метрологической экспертизы материалов по разработке методики (метода) измерений и экспериментальных исследований.*

В результате аттестации методики (метода) измерений установлено, что методика (метод) измерений соответствует требованиям, предъявляемым ГОСТ Р 8.563-2009.

Показатели точности измерений приведены в приложении на 1 л.

Проректор по научной работе С.П. Туник

Главный метролог А.А. Шелих

Дата выдачи: 13.05.2014 г.

Рекомендуемый срок пересмотра методики (метода) измерений:

СПбГУ, Россия, 198504, г.Санкт-Петербург, Университетский пр., д.26
Тел./факс (812) 428-68-98, E-mail: metrolog@chem.spbu.ru
Аттестат аккредитации в области обеспечения единства измерений № 01.00043-2011 от 14.09.2011 г.