

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Кобахидзе Тамара Ильинична

**Высокоэффективная тонкослойная хроматография в анализе растительных
источников и лекарственных средств, содержащих рутин**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Высокоэффективная тонкослойная хроматография – современный метод разделения и анализа биологически активных веществ	17
1.1.1 Краткий очерк развития хроматографии	17
1.1.2 Особенности и преимущества высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	21
1.1.3 Перспективы применения высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	27
1.2 Характеристика объектов исследования, содержащих рутин	31
1.3 Выводы к Главе 1	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Объекты исследования	41
2.2 Оборудование	41
2.3 Реактивы.....	42
2.4 Приготовление стандартных растворов.....	43
2.5 Фармакопейные методы исследования.....	43
2.5.1 Приготовление извлечений из лекарственного растительного сырья.....	43
2.5.2 Тонкослойная хроматография.....	44
2.5.3 Химические методы (качественные реакции).....	45
2.5.4 Спектрофотометрия	46
2.5.5 Титриметрические методы анализа.....	47
2.6 Валидация	48
2.7 Статистическая обработка результатов	51
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ РУТИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	52

3.1 Анализ лекарственного растительного сырья фиалки трава методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии	52
3.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых компонентов	52
3.1.2 Идентификация и количественное определение рутина в траве фиалки методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	57
3.1.3 Валидация разработанной методики.....	58
3.1.3.1 Методика.....	58
3.1.3.2 Результаты валидации	60
3.2 Результаты определения рутина фармакопейными методами	63
3.3 Обсуждение результатов исследования фиалки травы.....	64
3.4 Выводы к Главе 3	66
ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	68
4.1 Анализ лекарственного растительного сырья гречихи трава и софоры бутоны методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	68
4.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых компонентов	68
4.1.2 Идентификация и количественное определение рутина в гречихе траве и софоре бутонах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	69
4.1.3 Валидация	69
4.1.3.1 Методика.....	69
4.1.3.2 Результаты валидации	71
4.2 Результаты определения рутина фармакопейными методами	74
4.3 Результаты исследования и их обсуждение	74
4.4 Выводы к Главе 4	76
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ РУТОЗИДА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	77

5.1 Анализ субстанции рутозида	77
5.1.1 Определение рутозида методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	78
5.1.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых веществ	78
5.1.1.2 Идентификация и количественное определение рутозида методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии	78
5.1.1.3 Валидация	79
5.1.1.3.1 Методика.....	79
5.1.1.3.2 Результаты валидации	81
5.1.2 Определение рутозида фармакопейными методами	87
5.1.3 Обсуждение результатов исследования субстанции рутозида.....	88
5.2 Анализ таблеток, содержащих рутозид	90
5.2.1 Определение действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии.....	90
5.2.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых веществ	90
5.2.1.2 Идентификация и количественное определение действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид»	91
5.2.1.3 Валидация	92
5.2.1.3.1 Методика.....	92
5.2.1.3.2 Результаты валидации	93
5.2.2 Определение действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» фармакопейными методами	96
5.2.3 Обсуждение результатов исследования анализируемых таблеток, содержащих рутозид	97
5.3 Выводы к Главе 5	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	103
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	105

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ А	124
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	137
ПРИЛОЖЕНИЕ В	138

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день в практике фармакопейного анализа лекарственных средств (ЛС) применяют хроматографические (высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ), газовая хроматография), химические (титриметрическое определения вещества, качественные реакции), оптические (спектрофотометрия, рефрактометрия, поляриметрия) методы.

Среди хроматографических методов наиболее широко распространенным является метод ВЭЖХ. При этом ТСХ также находит применение в аналитических исследованиях, что связано с доступностью и легкостью воспроизведения метода.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) – это хроматографический метод анализа и разделения сложных смесей веществ, который является более усовершенствованным видом ТСХ. Этот метод основан на разделении компонентов смеси за счёт их различной способности адсорбироваться неподвижной твердой фазой. В ВЭТСХ этот процесс ускоряется и становится более эффективным благодаря использованию специальных условий (увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фазы за счёт уменьшения диаметра частиц сорбента и большей однородности размеров этих частиц), а также применение оборудования, которое обеспечивает быстрое и точное разделение сложных смесей веществ. Использование ВЭТСХ позволяет одновременно проводить идентификацию и количественное определение биологически активных веществ (БАВ), что отвечает современным тенденциям гармонизации отечественных требований с международными фармакопеями (Европейская, Американская), где ВЭТСХ широко используется для анализа растительных препаратов.

Следует отметить, что в зарубежных фармакопейных статьях уже в названии отражена рекомендация применения метода ВЭТСХ в анализе лекарственных

средств растительного происхождения: фармакопея США 47 – национальный формуляр 42 – <203> High-performance thin-layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin («метод ВЭТСХ для идентификации сырья растительного происхождения»); европейская фармакопея 11.0 – 2.8.25. High-performance thin-layer chromatography of herbal drugs and herbal drug preparations («ВЭТСХ лекарственного растительного сырья и препаратов растительного происхождения»).

В действующей фармакопее Евразийского экономического союза (ЕАЭС) представлена фармакопейная статья 2.1.2.26 «Тонкослойная хроматография», в которой описан раздел количественного измерения с применением ВЭТСХ-пластин.

В государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XV издания в ОФС.1.2.1.2.0003 «Тонкослойная хроматография» описаны преимущества метода ВЭТСХ, однако практическое применение данного метода в анализе веществ не находит отражения в частных фармакопейных статьях.

Флавоноиды, как класс растительных полифенолов, широко используются в фармацевтической промышленности в качестве БАВ. Рутин, в частности, является одним из наиболее распространенных и изученных флавоноидов, присутствующих во многих фитопрепаратах и многокомпонентных лекарственных средствах. Несмотря на глубокое изучение его структурно-функциональных характеристик и фармакологического профиля, актуальность контроля качества рутин-содержащих препаратов остается высокой. Это обусловлено необходимостью обеспечения точности дозирования, стабильности и чистоты активного вещества в готовых лекарственных формах.

В связи с этим, разработка и валидация эффективных и надежных аналитических методик для качественного обнаружения и количественного определения рутина является критически важной задачей.

Настоящее исследование направлено на создание таких методик с применением метода ВЭТСХ.

Степень разработанности темы исследования

В зарубежной научной литературе метод ВЭТСХ широко использован. В Фармакопее США (USP 47 NF 42) помимо общей статьи, посвященной ВЭТСХ, представлены частные статьи с его применением в более чем в 100 объектах растительного происхождения для определения состава и количественного содержания БАВ. В Европейской фармакопее 11-го издания также представлено более 60 видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), для анализа БАВ которых используют ВЭТСХ.

В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России разработана методика количественного определения суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого методом ВЭТСХ (Моргунов И.М. и др., 2023 г.). Авторами из Воронежского Государственного Университета предложен способ количественного определения рутина методом ТСХ (Тринеева О.В. и др., 2014 г.). Профессор Университета Ла Троба и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Сеченовского Университета Агатонович-Куштрин Снежана показывает широкое практическое применение ВЭТСХ в научных исследованиях в различных областях: в фармации, в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и др.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка и валидация методик определения биологически активных веществ методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии для контроля качества лекарственных средств, содержащих рутин.

Задачи исследования:

1. Провести информационно-аналитическое исследование научной литературы, отражающей текущее состояние и перспективы применения метода ВЭТСХ в анализе природных соединений;

2. Разработать методики и подобрать условия для хроматографического определения рутина методом ВЭТСХ в объектах растительного происхождения на примере фармакопейного ЛРС (фиалки трава, *Violae herba*);

3. Валидировать разработанную методику в соответствии с требованиями нормативной документации;

4. Апробировать разработанную методику и провести анализ рутина в растительных источниках его получения (гречихи посевной трава, *Fagopyri esculenti herba* и софоры японской бутоны, *Sophorae japonicae alabastra*);

5. Оценить возможность применения разработанной методики ВЭТСХ для анализа рутина в лекарственных средствах (субстанция, таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид»).

Научная новизна

В результате проведенного исследования автором впервые разработана методика качественного и количественного определения рутина в лекарственном растительном сырье (фиалки трава, *Violae herba*) методом ВЭТСХ, позволяющая повысить точность и воспроизводимость оценки содержания маркерного соединения по сравнению с традиционными спектрофотометрическими методами. Разработанная методика была оптимизирована и применима к растительным источникам получения рутина (трава гречихи, бутоны софоры). Также на основании представленной методики был проведен анализ рутина в лекарственных средствах (субстанции, таблетках).

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования включает в себя обзор имеющихся научных данных о преимуществах метода ВЭТСХ и его широком применении в различных отраслях экономики.

Практическая значимость результатов исследования состоит в том, что, используя один из перспективных физико-химических методов анализа, разработаны методики идентификации и количественного определения рутина методом ВЭТСХ в лекарственных средствах, обеспечивающие повышение точности, воспроизводимости и экологичности анализа за счёт минимального расхода растворителей и отказа от токсичных проявляющих реагентов, что способствует оптимизации процесса стандартизации и соответствует современным фармакопейным требованиям. Полученные результаты могут быть использованы для контроля качества лекарственных средств и лекарственного растительного сырья, содержащих рутин, а также рекомендованы для включения в нормативную документацию. Разработанные методики дают возможность эффективно определить рутин как в растительных объектах, так и в лекарственных средствах.

Методология и методы исследования

Методология исследования была построена на систематизации литературных данных и общих принципах фармакопейного анализа по установлению критериев, обеспечивающих достижение требуемого уровня стандартизации лекарственных средств, а также критической оценке существующих методик определения биологических активных веществ методом ВЭТСХ.

В рамках проводимого исследования были применены химические, физико-химические и инструментальные методы, такие как титриметрия, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия (СФМ), и высокоэффективная тонкослойная хроматография. Идентификация и количественное определение рутозида проводились с помощью набора оборудования для ВЭТСХ. Результаты были получены на денситометре Vilver Quantum E5 при ультрафиолетовом свете (254 нм и 365 нм) и белом свете. Обработку результатов, полученных в ходе исследования, осуществляли при помощи программного обеспечения (ПО)

BioVision, а также с помощью Origin: Data Analysis and Graphing Software и Microsoft Office Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика одновременного проведения качественного и количественного анализа рутина методом ВЭТСХ на примере фармакопейного ЛРС (фиалки трава, *Violae herba*);

2. Результаты валидации разработанной методики определения рутина методом ВЭТСХ по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность;

3. По результатам исследования оптимизированные и валидированные методики определения рутина методом ВЭТСХ в фитообъектах, являющихся источником рутина (гречихи посевной трава, *Fagopyri esculenti herba* и софоры японской бутоны, *Sophorae japonicae alabastra*);

4. Разработанная и апробированная методика количественного определения рутина в многокомпонентном препарате и активной фармацевтической субстанции (АФС).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует пунктам 2, 3 и 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия: п. 2. «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; п. 3. «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; п. 6. «Изучение химического состава лекарственного растительного

сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность основывается на проведении валидации разработанных методик качественного и количественного определения рутина в растительных источниках его получения, и лекарственных средств на его основе, по требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Методики валидированы по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность. Разработанные методики характеризуются селективностью и воспроизводимостью, сочетают относительную простоту исследования с точностью. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием поверенного и аттестованного оборудования. Выводы и рекомендации базируются на достаточном объеме экспериментальных данных, подвергнутых статистической обработке.

Основные положения диссертационной работы и результаты исследования были представлены на: Международной научно-практической конференции «Интеграция фармакопейных требований в международных исследованиях лекарственных растительных препаратов (Россия, г. Москва, 2023); I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора К. А. Кузьминой (Россия, г. Саратов, 2023 г.); Semmelweis International Students Conferece 2023 of Semmelweis University Budapest (Венгрия, г. Будапешт, 2023 г.); The 5th International Congress on Pharmacy Updates/4th IPharms Annual Conference (Иран, г. Тегеран, 2022); VII Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» организованной Фондом Нурсултана Назарбаева и Южно-Казахстанской медицинской академией

(Республика Казахстан, г. Шымкент, 2020 г.); The 2nd China-Russia Young Scholars International Symposium (Китай, г. Гуанчжоу, 2021 г.); The 4th International Congress on Pharmacy Updates/3rd IPharms Annual Conference (Иран, г. Тегеран, 2021), конференции «Современное состояние проблем фармации и фармакологии ДВ России и стран АТР» I Дальневосточного международного медицинского конгресса (ФГБОУ ВО «Дальневосточный Государственный медицинский университет» МЗ РФ) (Россия, г. Хабаровск, 2020); The 3th International Congress on Pharmacy Updates/2rd IPharms Annual Conference (Иран, г. Тегеран, 2020).

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 3 от «15» октября 2025 г.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе темы и методов исследования. Автором лично проведен выбор объектов исследования: фармакопейное ЛРС (фиалки трава), растительные источники получения рутина (гречихи трава, софоры бутоны), лекарственные средства на основе рутина (субстанция, таблетки). Диссертантом лично проведена серия экспериментов анализа рутина методом ВЭТСХ в перечисленных объектах исследования, результатом которой является разработанная методика качественного и количественного определения рутина в многокомпонентных объектах исследования. Вклад автора является важнейшим на всех этапах исследования: от постановки цели и задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях. Результаты исследования были доложены автором лично на международных и всероссийских научных и научно-практических конференциях и внедрены в практику научно-практических и образовательных организаций. Результаты работа

были статистически обработаны и систематизированы в научных статьях и докладах. Текст диссертации и автореферата написан автором самостоятельно.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Кобахидзе Тамары Ильиничны внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Общая фармацевтическая химия» по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (акт № 657 от 05.05.2025); в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Фармакогнозия» по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (акт № 657 от 05.05.2025), в учебный процесс фармацевтического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» при изучении дисциплин «Общая фармацевтическая химия», «Фармакогнозия», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (акт № 1500-200 от 18.09.2025.).

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена согласно тематике и плану научно-исследовательских работ кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и

последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в изданиях, включенных в международные индексируемые базы данных Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts; 1 иная публикация по результатам исследования, 4 публикации в сборниках материалов и международных и всероссийских научных конференций (из них 3 зарубежных конференции).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах, состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), экспериментальной части (Главы 2-5), общих выводов, списка сокращений (списка сокращений и условных обозначений), списка литературы и трех приложений. Список литературы включает 139 источников (46 из которых зарубежные). Работа содержит 12 рисунков и 31 таблицу, а также 1 таблицу в приложении.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Целью настоящего обзора литературы является анализ информации о новом и перспективном методе высокоэффективной тонкослойной хроматографии, анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной разработке методик определения действующих веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных формах, а также изучение подходов к фармакопейному анализу лекарственных препаратов (ЛП) на растительной основе.

Под качеством понимают пригодность фармацевтической субстанции или лекарственного препарата для использования по их целевому назначению [117]. Концепция качества лекарственного препарата – достаточно емкое понятие, контроль качества является одним из основных ее элементов и целей. Составной частью общей стратегии контроля лекарственного препарата зарубежом является спецификация. Под спецификацией понимают перечень испытаний, ссылок на аналитические методики, представляющие собой количественные пределы, диапазоны и прочие критерии для описанных испытаний. Таким образом спецификация является ключевым стандартом качества, которая предлагается, обосновывается производителем и утверждается уполномоченным органом в качестве условий регистрации [93, 118].

В нашей стране вместо спецификаций в качестве основного контрольного документа используется нормативная документация на фармацевтическую субстанцию или лекарственный препарат. Соблюдение фармакопейных требований играет важную роль в обеспечении качества препарата. Фармакопейная статья содержит в большей мере конкретные инструкции, порядок действий относительно трех основных направлений: идентификация лекарственного препарата – анализ подлинности, оценка чистоты – обнаружение примесей различного происхождения, а также количественное определение – определения содержания или количественных соотношений компонентов в анализируемом образце. Для проведения фармакопейного анализа лекарственного препарата необходимо провести оценку качества по всем направлениям – идентификации,

оценки содержания примесей и количественного определения. Для этого в частных фармакопейных статьях приведены методики с применением различных методов, что с одной стороны позволяет провести сравнительный анализ, что приводит к более точному результату эксперимента, но с другой стороны на это может уйти много времени и ресурсов. Решением данной проблемы может являться внедрение универсального метода для определения всех необходимых аспектов фармацевтического анализа. Именно таким методом и является высокоэффективная тонкослойная хроматография.

1.1 Высокоэффективная тонкослойная хроматография – современный метод разделения и анализа биологически активных веществ

1.1.1 Краткий очерк развития хроматографии

Русский ученый, ботаник и физико-химик Цвет Михаил Семенович признан первооткрывателем хроматографии.

Однако, история хроматографии началась еще в IV веке до н.э. при Аристотеле. Древнегреческий философ отмечал, что морская вода опресняется при ее прохождении через стенки сосуда из воска. Принципы очистки ему, конечно, не были известны.

Периодом открытия хроматографии считают время завершения Цветом М.С. работы над магистерской диссертацией в Петербурге и начало его работы в Варшаве в начале XX века. Русский ученый проводил исследование экстрактов пигментов растений в петролейном эфире. Цвет М.С. пропускал раствор смеси пигментов близких по цвету через трубку с кристаллическим карбонатом кальция, выполняющим функцию адсорбента. После адсорбент промывал чистым растворителем [1]. В результате компоненты смеси были разделены на отдельные цветные полосы. Описывая этот эксперимент современными терминами, можно сказать, что русский ученый и ботаник открыл проявительную хроматографию, а

именно – колоночную жидкостно-адсорбционную хроматографию. Его доклад «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу», сделанный 21 марта 1903 г. на заседании биологического отделения Варшавского Общества естествоиспытателей считается днем открытия хроматографии. Важнейшие результаты исследований Цвет М.С. описал в своей книге «Хромофиллы в растительном и животном мире», изданной в 1910 г., которая и стала его докторской диссертацией [29].

Помимо исследования и разделения экстракта смеси пигментов, ученый применял данный метод для количественного анализа компонентов, разбивая стеклянную колонку и разрезая столбик адсорбента на слои. Цвет М.С. разработал аппаратуру для проведения исследования жидкостной хроматографии. Также он дал рекомендации для приготовления эффективных колонок и смог реализовать хроматографические процессы при пониженном и избыточном давлении. Помимо всего вышеописанного русский ученый ввел основные понятия и термины открытого им метода: «хроматография», «хроматограмма», «проявление», «вытеснение» и другое [4, 29].

Однако, несмотря на обширные исследования, проведенные Цветом М.С., хроматография, как метод разделения, не находила широкого практического применения, и в течение 20 лет было опубликовано лишь небольшое число работ, посвященных данному методу. В 1931 г. немецкий химик Куну Р. совместно с учеными Винтерштейном А. и Ледереру Э., работая в химической лаборатории Института императора Вильгельма по медицинским исследованиям в Гейдельберге, используя хроматографию, разработали методику выделения α - и β -каротина из сырого каротина, тем самым возродив метод Цвета, и продемонстрировав его эффективность при изучении растительных пигментов [2].

Следующим важнейшим этапом в хронологии развития хроматография стало открытие в 1938 г. советскими учеными Измайловым Н.А. и Шрайбером М.С. метода адсорбционного анализа, основанного на разделении веществ в тонком слое адсорбента на зоны, при нанесении одной капли вещества; метод стали использовать для анализа фармацевтических препаратов и их идентификации.

Дальнейшее развитие и широкое внедрение в практику метод получил в середине 60-х годов, благодаря работам Э. Шталь [86]. Именно Шталь стандартизировал технику разделения и ввел термин «тонкослойная хроматография», как самостоятельный метод аналитической химии.

В 1937 – 1940 гг. немецкий ученый Шваб Г. стал основателем ионообменной хроматографии. Дальнейшее развитие данного метода было описано в 1947 г. советскими учеными Гапон Е.Н. и Гапон Т.Б. совместно с Шемякиным Ф.М., которые провели хроматографическое разделение смеси ионов в растворе. В 1948 г. советские ученые смогли реализовать идею Цвета М.С. о возможности хроматографического разделения многокомпонентных смесей веществ на основе различия в растворимости труднорастворимых осадков [2, 29].

В 1940 г. английские биохимики Мартин А. и Синг Р. открыли вариант жидкостной распределительной хроматографии на примере разделения ацетильных производных аминокислот на колонке с силикагелем в качестве адсорбента, насыщенным водой, и с применением хлороформа в качестве растворителя [2, 4]. Немного позже английские биохимики предложили осуществлять разделение производных аминокислот на смоченной водой бумаге с применением бутанола в качестве подвижной фазы (ПФ). Также ученые провели первую двумерную систему разделения. В 1952 г. Мартин А. и Синг Р. получили Нобелевскую премию по химии за открытие распределительного варианта хроматографии [29].

В начале 1940-х была обнаружена возможность применения газа в качестве ПФ колоночной хроматографии. Это дало толчок развитию газовой хроматографии (ГХ). В 1951 году советский ученый физико-химик Жуховицкий А.А. предложил один из вариантов ГХ – хроматермографию, при которой для улучшения разделения смеси газообразных компонентов одновременно с газовой подвижной фазой воздействуют на сорбент и разделяемую смесь изменяющимся температурным полем, имеющим определенный градиент по длине [2].

В 1952 – 1953 гг. Мартин А. совместно с британским химиком Джеймсом Э. внесли огромный вклад в развитие газовой распределительной хроматографии,

разделив сложные смеси с высокой точностью и эффективностью на смешанном сорбенте из силикона ДС–550 и стеариновой кислоты. Именно с этого открытия ГХ стала одним из перспективных методов в области аналитической химии [2, 4, 29].

В 1956 г. сотрудник американской фирмы лабораторного оборудования «PerkinElmer» Голей М. предложил вариант капиллярной хроматографии – нанесение сорбента на внутренние стенки капиллярной трубки для микроколичественного анализа многокомпонентных смесей [2, 4, 29].

В конце 60-х годов появилась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Американский ученый Кэлвин Гиддингс и немецкий ученый Йозеф Хубер предсказали перспективу развития и практического применения ВЭЖХ в аналитической химии при уменьшении диаметра частиц сорбента, а также использовании давления для увеличения скорости движения ПФ [136]. Разработка новых селективных полимерных сорбционных материалов, создание высокочувствительных детекторов, совершенствование аналитического оборудования и компьютерных технологий сделало этот метод применимым в различных областях химии, биологии, биотехнологии и медицины.

В начале 70-х годов немецкий ученый-хроматографист Кайзер Р.Е. применил хроматографические пластинки без связующего вещества с использованием силикагеля с малым размером частиц в 5 мкм [36]. В результате было установлено сокращение времени проведения анализа, также было отмечено улучшение разделительной способности, что стало предпосылкой создания усовершенствованного метода ТСХ – высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

В 1975 г. ученые из США Смолл Г., Стивенс Т. И Бауман У. сделали огромный шаг в развитии ионообменной хроматографии. Ученые предложили новый аналитический метод – высокоэффективную ионообменную хроматографию (ВЭИХ) с кондуктометрическим детектированием [92].

Таким образом, благодаря первоначальным работам русского ученого Цвета М.С. совместно с учеными всего мира были сформированы теоретические основы хроматографии и практические рекомендации по ее использованию. Разработка

усовершенствованных материалов для разделения и высокочувствительных детекторов привело к созданию современных и перспективных хроматографических методов: КГХ (капиллярная газовая хроматография), ВЭЖХ, ВЭТСХ, ВЭИХ, СКФХ (сверхкритическая флюидная хроматография), КЭ (капиллярный электрофорез) и др.

Развитие хроматографии не останавливается. Разрабатываются новые технологии, колонки, детекторы, позволяющие улучшить существующие методы исследований. Те вопросы, для ответа на которые еще 10-20 лет не применяли хроматографию, сейчас решаются исключительно хроматографическими методами. Комбинация хроматографии с масс-спектрометрией позволила решить многие аналитические задачи и перевела ее в разряд экспертных методов. Хроматография заняла очень важную часть во многих отраслях экономики.

1.1.2 Особенности и преимущества высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Высокоэффективная тонкослойная хроматография – современный и перспективный хроматографический метод, усовершенствованная форма тонкослойной хроматографии, где разделение веществ осуществляется в высокоэффективных тонких слоях с помощью автоматизированного оборудования. Разрешение и точность ВЭТСХ очень высоки [73]. Большинство шагов этого метода можно автоматизировать.

ТСХ и ВЭТСХ – это два химических метода, используемых для разделения нелетучих компонентов в смеси. Ключевое различие между ТСХ и ВЭТСХ заключается в том, что адсорбирующий материал в пластинке для ТСХ имеет крупные частицы (10-15 мкм), тогда как пластины для ВЭТСХ отличаются малыми размерами (5-7 мкм). Также следует отметить, что плотность упаковки геля на пластине более высокая, следствием чего является получение более гладкой поверхности пластины, что в свою очередь обеспечивает эффективное разделение

[68]. Потому ВЭТСХ-пластины характеризуются высокой однородностью адсорбирующего материала, следствием чего является увеличение скорости проведения ВЭТСХ анализа по сравнению с ТСХ методом. Еще одной отличительной чертой ВЭТСХ является возможность одновременного разделения несколько разных образцов в одной планшете [68].

Сравнительная характеристика методов тонкослойной хроматографии с ее усовершенствованным автоматизированным методом ВЭТСХ представлена в Таблицах 1.1 и 1.2.

Инструментализация и автоматизация ТСХ на всех стадиях хроматографического анализа, применение усовершенствованных сорбентов и элюентов, разработка новых способов и приемов хроматографирования являются основными направлениями развития данного метода [38].

Таблица 1.1 – Сравнительная характеристика показателей ТСХ и ВЭТСХ

Характеристика метода	Показатели ТСХ метода	Показатели ВЭТСХ метода
Размер частиц	10-15 мкм	5-7 мкм
Разброс размера частиц	Широкий	Узкий
Толщина слоя	250 мкм	100, 200 мкм
Количество дорожек (max)	12	36-72
Элюирование	100-150 мм	30-70 мм
Время элюирования	30-200 мин	3-20 мин
Объем ПФ	50 мл	5-10 мл
Предел обнаружения:		
Поглощение	100-1000 нг	10-100 нг
Флуоресценция	1-100 нг	0,1-10 нг

Таблица 1.2 – Сравнительная характеристика методов ТСХ и ВЭТСХ

ТСХ	ВЭТСХ
Это основной физико-химический метод, используемый для разделения нелетучих компонентов в смеси	Это усовершенствованная форма ТСХ
Пластина может быть изготовлена из бумаги, металла, пластика или стекла, на которую наносится адсорбирующий материал с крупными частицами	Пластины представляют собой основу (стекло) и закрепленный слой сорбента с очень мелкими частицами адсорбирующего материала
Метод дает низкое разрешение, если в образце есть компоненты, имеющие аналогичные свойства	Метод дает высокое разрешение даже для близких по структуре веществ
Анализ требует много времени	Дает результаты с большей скоростью, чем метод ТСХ

Перспективными считаются варианты хроматографирования под давлением, в непрерывном потоке элюента, с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ) [38, 57, 58].

Принцип метода и этапы хроматографического процесса ВЭТСХ идентичны классической ТСХ. Главные отличия заключаются в характеристике пластин для разделения, стандартизации условий и автоматизации хроматографического процесса, что позволяет достичь максимальной эффективности и воспроизводимости анализа.

Применение ВЭТСХ обеспечивает получение более компактных зон адсорбции разделяемых соединений, что улучшает метрологические характеристики количественного определения с помощью сканирующей хроматоденситометрии [24].

Разделение определяется совокупностью процессов адсорбции, распределения, ионного обмена посредством перемещения в тонком слое (неподвижной фазе) исследуемых веществ, растворенных в смеси растворителей (подвижной фазе).

К основным этапам хроматографирования относят: нанесение образцов, элюирование и детектирование (Рисунок 1.1). Для детектирования пластины либо опрыскивают специальными реактивами (химический способ), либо облучают ультрафиолетовым светом (оптический способ), либо проводят экстракцию вещества с соответствующей зоны сорбента для последующего исследования физическими или физико-химическими методами. В зависимости от цели исследования детектирование и оценка результатов анализа ВЭТСХ могут осуществляться с помощью просмотра пластинки – снимка (хроматограммы), денситометрически (используется преимущественно для количественного определения) или путём регистрации биолюминесценции (биодетекция) [73].



Рисунок 1.1 – Этапы хроматографирования методом ВЭТСХ

Как и во всех хроматографических процессах в ВЭТСХ подвижная фаза движется вдоль неподвижной. Разделяемые компоненты при этом перемещаются с различной скоростью в направлении движения потока элюента. В ВЭТСХ пластинах в качестве сорбента применяют силикагель, частицы которого имеют правильную сферическую форму. Как правило сорбент используется однократно. После разделения анализируемой смеси на отдельные компоненты хроматографирование прекращают и проводят качественное и количественное определение вещества в хроматографических зонах.

Научная новизна применения высокоэффективной тонкослойной хроматографии в контроле качества лекарственных средств может заключаться в следующих аспектах:

1. Повышение точности и чувствительности анализа. Высокоэффективная тонкослойная хроматография позволяет более точно определять содержание активных ингредиентов и примесей в лекарственных средствах, что способствует повышению качества контроля.

2. Уменьшение времени анализа. Благодаря высокой эффективности разделения компонентов, метод позволяет сократить время, необходимое для проведения анализа в 10 раз, что может ускорить процесс контроля качества. ВЭТСХ одновременно можно проводить анализ по двум показателям: идентификация веществ и их количественное определение.

3. Улучшение воспроизводимости результатов. Применение стандартизированных методов и оборудования в ТСХ способствует получению более воспроизводимых результатов, что повышает надёжность контроля качества лекарственных средств.

4. Расширение возможностей анализа сложных смесей. ТСХ может быть адаптирована для анализа сложных многокомпонентных смесей, таких как экстракты растений или синтетические полимеры, используемые в фармацевтике. Это расширяет возможности контроля качества различных лекарственных форм.

5. Снижение затрат на оборудование и материалы. Несмотря на первоначальные инвестиции в оборудование и расходные материалы, долгосрочная экономия может быть достигнута за счёт уменьшения времени анализа и повышения точности результатов.

6. Соответствие международным стандартам. Внедрение современных методов контроля качества, таких как высокоэффективная тонкослойная хроматография, помогает обеспечить соответствие лекарственных средств международным стандартам и регуляторным требованиям.

7. Возможность интеграции с другими методами анализа. Метод может быть интегрирован с другими современными аналитическими методами, такими как масс-спектрометрия или спектроскопия, для получения более полной картины состава и свойств лекарственных средств.

Таким образом, можно говорить о ВЭТСХ, как о перспективном методе в контроле качества лекарственных средств, о чем также более подробно представлено в обзорной статье [43].

Различают два варианта ВЭТСХ: линейный и циркуляционный (круговой). В случае линейного варианта пробы наносят на линию старта параллельно одной из стороны. При этом пластина помещается вертикально в хроматографическую камеру, на дне которой налит элюент. В круговом варианте пробы наносят на некотором расстоянии от центра пластины по окружности, элюент при этом подают в центр.

При проведении ВЭТСХ берут специальные чистые пластинки с покрытием силикагеля для получения цифровых изображений при ультрафиолетовом излучении (УФ) 254 нм и при дневном (белом) свете. Затем начинают подготовку камеры: готовят подвижную фазу (смесь растворителей) и наливают ее в камеру для элюирования. С помощью программного обеспечения на компьютере выставляют необходимые параметры хроматографирования (длина пластинки, количество дорожек, положение нанесения образцов, расстояние между дорожками, тип растворителя). Дорожка 1 используется для применения теста на пригодность системы (при этом остальные дорожки должны быть отключены).

На пластинки наносят образцы и помещают на 45 минут в эксикатор. затем пластинку помещают в камеру для элюирования. После прохождения подвижной фазы до линии финиша, достают пластинку, сушат холодным воздухом и помещают в денситометр (при проявлении окрашенных полос или полос, просматриваемых в УФ-свете, для других полос – проводим прежде дериватизацию). С помощью программного обеспечения – получают цифровое изображение хроматограммы для дальнейшего проведения качественного и количественного анализа.

ТСХ и ВЭТСХ – инструментальные методы хроматографического скрининга, широко используемые для разделения веществ, в основе которого лежит разница в коэффициентах распределения анализируемых веществ между подвижной и неподвижной фазами [24].

1.1.3 Перспективы применения высокоэффективной тонкослойной хроматографии

ВЭТСХ является перспективным методом количественного определения биологически активных веществ. На сегодняшний день, данный метод активно используют зарубежом. В европейской фармакопее, а также в фармакопее США представлены отдельные общие фармакопейные статьи, как на тонкослойную хроматографию, так и на высокоэффективную тонкослойную хроматографию [32, 82].

Следует отметить, что зарубежные фармакопейные статьи уже в названии указывают о возможности применения ВЭТСХ в анализе лекарственных средств растительного происхождения: в соответствии с фармакопеей США 47 – национального формуляра 42 – <203> High-performance thin-layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin (Метод ВЭТСХ для идентификации сырья растительного происхождения) и в соответствии с европейской фармакопеей 11.0 – 2.8.25. High-performance thin-layer chromatography of herbal drugs and herbal drug preparations (ВЭТСХ лекарственного растительного сырья и препаратов растительного происхождения) [46]. Таким образом, можно сделать вывод, что данный метод является неотъемлемой частью в контроле качества лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

В указанных статьях представлено применение данного метода, необходимое оборудование, требование к пластинам, условия приготовления испытуемого раствора и стандартного образца, нанесение образца, подготовка камеры, условия визуализации и документация результатов.

В действующей фармакопее ЕАЭС представлена фармакопейная статья 2.1.2.26 «Тонкослойная хроматография» (I том, 2020 г.), в которой помимо основных характерных аспектов для ТСХ представлены требования к количественному измерению с применением ВЭТСХ-пластин.

В государственной фармакопее Российской Федерации XV издания представлена ОФС.1.2.1.2.0003 «Тонкослойная хроматография», в которой

говорится о высокоэффективной тонкослойной хроматографии, как о методе преобладающим над ТСХ за счет его преимуществ, таких как увеличение эффективности разделения, получение более компактных зон адсорбции разделяемых соединений [24, 46].

Данный метод хроматографии, применяемый для анализа всех классов химических соединений, приобрел значение в качестве экспресс-метода анализа и широко используется в науке, промышленности, медицине, фармации, ветеринарии, в контроле загрязнений окружающей среды, в центрах Госсанэпиднадзора, стандартизации и метрологии и. т.д. [11, 28, 37, 38, 39].

ТСХ находит уже давно применение при анализе практически всех классов соединений, включая пестициды, стероиды, алкалоиды, липиды, нуклеотиды, гликозиды, углеводы, жирные кислоты и многие другие [38, 123].

В работах представлено применение ТСХ в сельскохозяйственном производстве. В работах представлены методики разделения и количественного определения пестицидов методом ТСХ [91, 121]. Анализ пестицидов является основным направлением в оценке безопасности пищевых продуктов, в связи с чем данная тема актуальна и на сегодняшний день [71]. В идеале метод анализа содержания пестицидов в пищевых продуктах должен быть быстрым и простым в применении с минимальным использованием растворителей, обеспечивая при этом определенную степень селективности и охватывая широкий спектр комбинаций анализируемого вещества. Несмотря на то, что сегодня одним из актуальных методов определения пестицидов является ВЭЖХ с применением твердофазной микроэкстракции в качестве пробоподготовки [134], тонкослойная хроматография также является востребованным методом [3]. На сегодняшний день также активно ведут исследования определения пестицидов методом ВЭТСХ [102, 139].

ТСХ проявила себя как высокотехнологичный, относительно недорогой и легко воспроизводимый метод. Популярность ТСХ приобрела в 80-е годы, когда активно стали публиковаться результаты определения аминокислот из растений, животных и различных биологических жидкостей [98, 101, 130]. Однако ТСХ находит применение в анализе пептидов и по сей день [59, 122, 125, 126].

Следует отметить, что совершенствование ТСХ способствует развитию анализа органических и биоорганических соединений. ВЭТСХ является одним из востребованных методов количественного определения за счет его простоты [52, 99].

ТСХ также может использоваться для анализа нуклеотидов [81, 106, 138]. Однако, ВЭТСХ способствует оптимизации определения нуклеотидов [100, 110].

Изучена возможность использования капиллярной ТСХ для анализа окрашенных антибиотиков группы тетрациклина [12]. В диссертационной работе [10] представлены методики нормально-фазовой и обращенно-фазовой ТСХ для изучения хроматографической подвижности цефтриаксона, цефепима и цефпинома. Следует также отметить, что разработаны и методики количественного определения штаммов-продуцентов промышленных антибиотиков методов ВЭТСХ [7].

ТСХ используется в анализе алкалоидов для быстрого скрининга и предварительной идентификации этих веществ. Данный метод позволяет провести идентификацию амариллисовых алкалоидов (галантамина и ликорина) [13]. На базе ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России разработана методика количественного определения суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого [8, 66]. Хроматография в тонком слое применяется для идентификации и количественного определения алкалоидов *Catharanthus Roseus*, в том числе для винкристина и винбластина [78].

В государственной фармакопее Российской Федерации ТСХ предлагают, как один из метод для идентификации дексаметазона [25] и прогестерона [27]. ТСХ является полезным и удобным методом анализа стероидов [107, 109]. Однако на сегодняшний день существует методика количественного определения стероидов методом ВЭТСХ [137].

ТСХ применяется в контроле лекарственных средств с целью использования их в терапевтической практике [69, 89] и ветеринарии [63]. На сегодняшний день ВЭТСХ является актуальным и востребованным методом в контроле качества лекарственных средств [42, 45, 120]. Существует множество

методик для количественного определения соединений разных классов. В работе [114] было проанализировано влияние спонтанной микробной мацерации на высвобождение и экстракцию флавоноидов и фенолов из листьев оливы. Инфракрасная хроматография с ослабленным полным внутренним отражением и преобразованием Фурье (ИК-Фурье НПВО) и высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) с направленным на эффект детектированием использовались для получения подробных спектроскопических и хроматографических отпечатков полифенолов и флавоноидов в экстрактах. Благодаря своей простоте, минимальной подготовке образцов, низкому расходу растворителя и возможности параллельного анализа нескольких образцов ВЭТСХ стала методом выбора для хроматографических «отпечатков пальцев» растительного материала.

Разделение и определение водорастворимых и жирорастворимых витаминов осуществляется методом ТСХ [63, 89, 124]. В работе [60] представлена разработанная методика определения α -токоферола (витамина E) и эргокальцеферола (витамина D₂) в растительных маслах, что включало отдельное выделение витаминов экстракцией органическими растворителями после щелочного гидролиза растительного масла.

Хроматографические методы анализа являются надежным методом экспрессного контроля за содержанием в атмосфере и других объектах окружающей среды (а также продуктах питания) чрезвычайно токсичных хлорсодержащих пестицидов и полихлорбифенолов, которые добавляют к ядохимикатам для усиления их действия [38, 54].

В одном из исследований [104] была разработана методика ВЭТСХ для количественного определения пяти водорастворимых витаминов: B₂, B₃, B₆, B₁₂ и C с использованием этанол-водной смеси (70:30, об./об.) в качестве подвижной фазы. Полезность предложенного метода для контроля качества была продемонстрирована успешным количественным анализом этих пяти витаминов в ряде пищевых добавок.

ТСХ также применяется в криминалистике для разделения и идентификации различных веществ и их смесей. ТСХ используют для исследования наркотических средств, что позволяет установить состав изъятых из незаконного оборота веществ, сопоставить их свойства со стандартами и решить важные для следствия и суда вопросы [77].

С помощью ТСХ проводят исследование нефтепродуктов, что позволяет выяснить принадлежность к определенному виду нефтепродуктов, а в исключительных случаях – к определенному производителю [9]. ТСХ используют для определения вида взрывчатых веществ, установления вида специальных химических веществ (красителей химловушек), установление наличия денатурирующих добавок в спиртосодержащих жидкостях, определения сильнодействующих и ядовитых веществ [15, 34, 55, 72].

ВЭТСХ применяется для идентификации и контроля примесей, количественного анализа маркерных веществ, мониторинга стабильности, для решения задач прикладного характера. Основные области применения включают: контроль качества лекарственных растений, биологически активных добавок, фитопрепаратов; продуктов питания и кормов; фармацевтических препаратов; косметики; в биотехнологии; в криминалистике; анализ веществ в биологических жидкостях при клинических исследованиях; использование в экологии.

Таким образом, показано, что метод ВЭТСХ является перспективным и актуальным в контроле качества различных соединений.

1.2 Характеристика объектов исследования, содержащих рутин

Одним из перспективных источников фитопрепаратов считаются лекарственные растения, содержащие флавоноиды, которые в силу широкого распространения в растениях и большого структурного разнообразия в настоящее время находятся в центре внимания исследователей в области фармакогнозии, фармации и медицины [15, 34, 48-51, 55, 56, 67, 95].

Флавоноиды относятся к классу полифенольных соединений растительного происхождения. Разнообразие флавоноидов огромно, на сегодняшний день известно о существовании около восьми тысяч веществ [84]. Одним из первых, кто оценил размеры потребления флавоноидов большими группами населения, был M.D. Hertog [116]. В 1993 году он и его коллеги сообщили, что смертность от инфаркта миокарда среди пожилых людей характеризуется обратной корреляцией с потреблением флавоноидов [105]. Дальнейшие исследования заболеваний, связанных со старением, показали, что флавоноиды способствуют предотвращению развития сердечно-сосудистых заболеваний и диабета II типа [128].

На основе флавоноидов разработаны препараты широкого спектра действия – противовоспалительные, антиканцерогенные, противовирусные и бактерицидные. Последние исследования показали, флавоноиды могут использоваться при лечении различных заболеваний [85].

Исследования последних лет показали, что производные некоторых флавоноидов могут успешно использоваться при лечении различных заболеваний внутренних органов: эти вещества зачастую проявляют бóльшую эффективность, чем известные лекарственные препараты [96, 111, 129, 131]. Также стоит отметить, что флавоноиды проявляют меньше побочных эффектов и обладают меньшей токсичностью, чем препараты из других источников [84].

Таким образом, растет интерес к исследованию действия флавоноидов на организм человека.

Флавонолы считаются наиболее распространенными представителями флавоноидов в природе. Кверцетин и его гликозид рутин являются одними из наиболее известных и хорошо изученных флавонолов, которые широко распространены в растительном мире [84].

В экспериментальном исследовании, проведенном на крысах [132] выявлено, что рутин способен возвращать к норме течение многих хронических процессов, которые могут быть связаны с метаболическим синдромом, например,

толерантность к глюкозе, воспаление, нарушение функций печени и сосудистой системы [84].

Работа [62] посвящена исследованию новых аспектов биологической активности рутина и его супрамолекулярного комплекса с глицирризиновой кислотой. В эксперименте на крысах были показаны высокая антиэкссудативная и антипролиферативная активность, снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов и повышение активности ферментов антиоксидантной системы при применении указанных соединений.

В исследовании [108] обсуждаются антигипергликемические свойства рутина и его защитное действие против развития диабетических осложнений. Приведены предполагаемые механизмы антигипергликемического действия рутина, которые, например, способствуют снижению всасывания углеводов в тонком кишечнике, ингибированию тканевого глюконеогенеза, увеличению поглощения глюкозы тканями. Представленные в работе в совокупности результаты подтверждают способность рутина предотвращать или лечить патологии, которые связаны с диабетом.

На сегодняшний день, ведется активное исследование флавоноидов, в частности рутина. Это послужило причиной для выбора рутозида, и рутин-содержащего лекарственного растительного сырья, как основного объекта для внедрения метода ВЭТСХ в практику фармакопейного анализа. Один из основных способов получения рутина – выделение его из лекарственного растительного сырья [74]. В настоящей работе было изучено большое количество методик анализа рутина в растительном сырье методом ТСХ. Основные хроматографические параметры представлены в Приложении А.

Анализ данных Приложения А выявил, что необходимым условием разделения флавоноидов в извлечениях из ЛРС является создание кислого рН в используемой ПФ. Это достигается введением либо муравьиной кислоты, либо ледяной уксусной кислоты. Предлагаемые системы достаточно полярны, что достигается введением в ПФ этилацетата или этилформиата, воды, метанола.

Сделанные наблюдения будут учтены при выборе условий хроматографирования в нашей работе.

Рутозид входит в состав большого количества лекарственных средств, например, в состав препаратов «АнвиМакс», «Антигриппин», «Дуоколд», «Пентафлуцин-Бронхо», «Викалин Авексима» и др., в лекарственном препарате «Троксерутин» действующим веществом является троксерутин – производное рутина.

Однако, одним из наиболее известных препаратов является рутозид в сочетании с аскорбиновой кислотой – «Аскорутин». Поэтому несмотря на то, что зарубежом ВЭТСХ применяют для исследования препаратов растительного происхождения, в качестве объектов исследования нами были выбраны также: субстанция рутозид и таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид», изучение которых показывает возможность широкого применения ВЭТСХ как перспективного метода в контроле качества лекарственных средств [46].

В Таблице 1.3 представлен сравнительный анализ рутозида в РФ и за рубежом.

Согласно ГФ РФ XIV издания рутозид идентифицируют с помощью ИК-спектрометрии, спектрофотометрии, также проводят качественные реакции с раствором натрия гидроксида (желто-оранжевое окрашивание) и с порошком цинка в присутствии хлористоводородной кислоты (постепенное окрашивание раствора в красный цвет).

В ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» ГФ XV издания отсутствует качественная реакция с натрия гидроксидом, однако, в данной статье описана методика идентификации рутина с применением ТСХ.

Первоначальную идентификацию рутозида согласно Европейской фармакопее 11.0 проводят на основании снятия спектра с применением инфракрасной абсорбционной спектрофотометрии. Второстепенным методом идентификации является метод ТСХ и качественная реакция с цинком в присутствии хлористоводородной кислоты [35, 46].

Таблица 1.3 – Анализ рутина в РФ и зарубежом [46]

НД	Идентификация	Примеси	Количественное определение
ГФ РФ XIV изд.	ИК, СФМ, Качественные реакции	ВЭЖХ	Титриметрия
ГФ РФ XV изд.	ИК, СФМ, ТСХ	ВЭЖХ	Титриметрия
Европейская фармакопея 11.0	ИК, ТСХ, Качественная реакция	ВЭЖХ	Титриметрия
Фармакопея США 47 – Национальный формуляр 42	СФМ	ВЭЖХ	Титриметрия

Фармакопея США 47 – Национальный формуляр 42 для идентификации рутозида приводят единственный метод – УФ - спектрофотометрию [31].

Следует отметить, что количественное определение рутозида в ГФ РФ XV издания, в Европейской фармакопее 11.0 и Фармакопее США 47 – Национального формуляра 42 проводят методом титриметрии 0,1М раствором тетрабутиламмония гидроксида. Конечную точку титрования определяют потенциометрически [26, 31, 83].

Родственные примеси во всех фармакопеех определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Согласно действующей нормативной документации на таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид», содержащие 50 мг аскорбиновой кислоты + 50 мг рутозида (вспомогательные вещества: сахароза (сахар белый) – 201,9 мг, крахмал картофельный – 5,46 мг, крахмал кукурузный – 13,54 мг, кальция стеарат – 3,3 мг, тальк – 5,8 мг) идентификацию рутозида проводят спектрофотометрическим и визуальным (качественная реакция) методами,

количественное определение – спектрофотометрия [16]. В Таблице 1.4 представлен сравнительный анализ рутина в ЛП в РФ и за рубежом

Таблица 1.4 – Сравнительный анализ рутина в ЛП в РФ и за рубежом

ИД	Идентификация	Количественное определение
ГФ РФ ВФС 42-2577-95	СФМ, Качественная реакция	СФМ
Европейская фармакопея 11.0	ФС отсутствует	ФС отсутствует
Фармакопея США 47 – Национальный формуляр 42	ФС отсутствует	ФС отсутствует

Аскорбиновую кислоту идентифицируют по качественной реакцией с фосфорномолибденовой кислотой, количественное определение проводят йодатометрическим титрованием.

В Государственной Фармакопее XIV и XV изданий представлено более 25 видов лекарственного растительного сырья, стандартизацию которых проводят по рутину (Таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Методы стандартизации некоторых видов ЛРС, содержащих рутин [46]

Наименование ЛРС	Метод идентификации	Метод количественного определения суммы флавоноидов (нормируемое содержание)
Горца перечного трава <i>Polygoni hydropiperis herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 1,5 %)
Горца почечуйного трава <i>Polygoni persicariae herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 0,9 %)
Фиалки трава <i>Violae herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 1 %)
Гинкго двулопастного листья <i>Ginkgo biloba folia</i>	ТСХ	СФМ (не менее 0,5 %)

Продолжение Таблицы 1.5

Пустырника трава <i>Leonuri herba</i>	рутин не определяют	СФМ (не менее 0,2 %)
Зверобоя трава <i>Hyperici herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 1,5 %)
Хвоща полевого трава <i>Equiseti arvensis herba</i>	ТСХ	СФМ (в пересчете на изокверцитрозид)
Бузины черной цветки <i>Sambuci nigrae flores</i>	ТСХ	СФМ (не менее 2 %)
Боярышника цветки <i>Crataegi flores</i>	ТСХ	флавоноиды не определяют
Мать-и-мачехи обыкновенной листья <i>Tussilaginis farfarae folia</i>	ТСХ	флавоноиды не определяют
Золототысячника трава <i>Centaurii herba</i>	ТСХ	флавоноиды не определяют
Ромашки аптечной цветки <i>Chamomillae recutita flores</i>	ТСХ	СФМ (не менее 1,2 %)
Земляники лесной листья <i>Fragariae vescae folia</i>	ТСХ	СФМ (не менее 1 %)
Вахты трехлистной листья <i>Menyanthidis trifoliatae folia</i>	рутин не определяют	СФМ (не менее 1 %)
Душицы обыкновенной трава <i>Origanum vulgare herba</i>	ТСХ	СФМ (в пересчете на лютеолин)
Жостера слабительного плоды <i>Rhamni catharticae fructus</i>	ТСХ	флавоноиды не определяют
Календулы лекарственной цветки <i>Calendulae officinalis flores</i>	ТСХ	СФМ (не менее 1 %)
Липы цветки <i>Tiliae flores</i>	ТСХ	СФМ (в пересчете на кверцетин)
Пастушьей сумки обыкновенной трава <i>Capsella bursae-pastoris herba</i>	рутин не определяют (в ГФ РФ XIV определяют)	СФМ (не менее 0,5 %)

Продолжение Таблицы 1.5

Полыни горькой трава <i>Artemisiae absinthii herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 0,3 %)
Тимьяна обыкновенного трава <i>Thymi vulgaris herba</i>	ТСХ	СФМ (в пересчете на лютеолин-7- гликозид)
Хмеля обыкновенного соплодия <i>Humuli lupul ifructus</i>	ТСХ	СФМ (не менее 0,3 %)
Череды трехраздельной трава <i>Bidentis stripartitae herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 0,5 %)
Шиповника плоды <i>Rosae fructus</i>	рутин не определяют	СФМ (не менее 0,4 %)
Эрвы шерстистой трава <i>Aerva lanata herba</i>	ТСХ	СФМ (не менее 0,5 %)

Для внедрения метода ВЭТСХ в практику фармакопейного анализа в настоящей работе были выбраны ЛРС, содержащие флавоноиды – в частности, рутин: фиалки трава (*Violae herba*), софоры японской бутоны (*Alabastra Sophorae japonicae*) и гречихи посевной трава (*Herba Fagopyri esculenti*) [46].

Трава фиалки является лекарственным растительным сырьем, стандартизацию которого проводят по рутину. Согласно ГФ РФ XIV издания идентификацию рутина в траве фиалки проводят с помощью тонкослойной хроматографии, для количественного определения рутина описана методика определения суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в пересчете на рутин [20]. Проанализировав все виды ЛРС, включенные в ГФ РФ XIV и XV изданий, содержащие флавоноид рутин – сделан вывод, что идентификацию рутина проводят методом ТСХ, а количественное определение проводят спектрофотометрическим методом, определяя сумму флавоноидов в пересчете на рутин, также следует отметить, что количественное определение рутина представлено не для всех видов ЛРС.

В Европейской фармакопее 11.0 также представлено лекарственное растительное сырье травы фиалки с цветками “WILD PANSY

(FLOWERING AERIAL PARTS) *Violae herba cum flore*”. Идентификацию рутозида проводят методом ТСХ. Для количественного определения представлена методика спектрофотометрии, в которой определяют сумму флавоноидов в пересчете на виолантин [33, 46]. Нормативные подходы к оценке рутина в траве фиалки в РФ и зарубежом представлены в Таблице 1.6.

Согласно литературным данным [5, 17, 97, 103, 135] софоры японской бутоны и гречихи посевной трава являются перспективным источником рутина.

Основным источником получения рутина в мире являются софоры японской бутоны. Дерево разводится в странах Азии, Северной Америке и в Европе. В Южной Америке для получения рутина используют плоды *Favad`anta (Dimorphandramollis)*.

Таблица 1.6 – Анализ рутина в траве фиалки в РФ и зарубежом

НД	Идентификация	Количественное определение
ГФ РФ XIV изд.	ТСХ	СФМ (в пересчете на рутин)
ГФ РФ XV изд.	ФС отсутствует	ФС отсутствует
Европейская фармакопея 11.0	ТСХ	Рутин не определяют
Фармакопея США 47 – Национальный формуляр 42	ФС отсутствует	ФС отсутствует

На территории Российской Федерации произрастает гречиха – однолетнее травянистое растение, которое является перспективным источником получения рутина. Способ получения рутина из гречихи посевной представлен в патенте RU2505307C1, дальнейший анализ рутина проводят методом ВЭЖХ [65]. В диссертационной работе М.М. Анисимовой «Фармакогностическое исследование травы гречихи посевной (*Fagopyrum Sagittatum Gilib*)» представлены методики

качественного (ТСХ) и количественного определения (СФМ, ВЭЖХ) рутина и суммы флавоноидов [6].

1.3 Выводы к Главе 1

1. Показана актуальность анализа литературных данных изучения для дальнейшего внедрения в практику фармакопейного анализа метода ВЭТСХ. ВЭТСХ представляет собой перспективный метод фармакопейного анализа благодаря своей эффективности, простоте, экономичности и надёжности.

2. Выявлено, что одним из наиболее изучаемых классов полифенольных соединений остаются флавоноиды – вещества, присутствующие во всех тканях растений и представленные огромным разнообразием структурных форм. Они представляют высокую ценность для лечения широкого круга социально значимых заболеваний. В частности, рутозид – вещество широкого спектра действия, входит в состав многих лекарственных препаратов, что делает его одним из основных объектов исследования [46].

3. Проанализирована ГФ РФ XIV и XV изданий, в которые включено более 25 видов ЛРС, стандартизация которых ведется по рутину. Фармакопейным методом для обнаружения рутина в ЛРС является ТСХ. Количественное определение суммы флавоноидов проводят методом СФМ. При этом в Фармакопее США (USP 47 NF 42) помимо общей статьи, посвященной ВЭТСХ, представлено более 100 частных статей с применением данного метода в анализе БАВ. В Европейской фармакопее 11-го издания представлено более 60 видов ЛРС с применением ВЭТСХ для анализа БАВ.

4. Представлена необходимость разработки новых методик качественного и количественного анализа содержания БАВ методом ВЭТСХ для оптимизации процесса проведения контроля качества лекарственных средств, что связано с применением одной пробоподготовки и одной методики анализа по индивидуальному идентифицированному веществу в исследуемых объектах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе являются:

- рутозид (производитель: Сычуань Гуансун Фармасьютикал Ко.Лтд, Китай, Номер реестровой записи ФС-000569 от 06.05.2013, содержание вещества 95 %);
- лекарственное растительное сырье: фиалки трава (производитель: ОАО "Красногорсклексредства", ЛСР-001062/08); гречихи посевной трава (производитель: «Компания ХОРСТ», Алтайский край, ТУ 9185-300-14721358-13); софоры японской бутоны (производитель: «Компания ХОРСТ», Алтайский край, ТУ 10.89.19-124-14721358-2017);
- таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид» (производитель: Открытое акционерное общество "Фармстандарт-Уфимский витаминный завод" (ОАО "Фармстандарт-УфаВИТА", ЛП-№(005097)-(РГ-RU)).

В качестве стандартного образца использовали: рутин ($\geq 94,0$ %, MERCK, Sigmaaldrich, MFCD00149490, CAS Number 250249-75-3), кверцетин (≥ 95 %, MERCK, Sigmaaldrich, MFCD03847906, CAS Number: 849061-97-8), аскорбиновую кислоту ($\geq 99,0$ %, MERCK, Sigmaaldrich, MFCD00064328, CAS Number: 50-81-7).

2.2 Оборудование

Исследование проводили с применением соответствующего оборудования методом ВЭТСХ:

- для нанесения образцов использовали ручной аппликатор Nanomat 4, диспенсер и универсальный держатель (Camag®, Muttenez, Швейцария).
- элюирование осуществляли в автоматизированной хроматографической камере (Camag®, Muttenez, Швейцария).

- регистрацию хроматографических зон проводили в денситометре Vilver Quantum E5 при ультрафиолетовом свете (254 нм и 365 нм).

- обработку полученных данных проводили с ПО BioVision, входящим в комплект денситометра Vilver Quantum E5.

В работе использовали ВЭТСХ пластины Silica gel 60 F254 разных размеров (5×10 см, 10×10 см, 10×20 см).

Извлечения из ЛРС получали с применением обратного холодильника на водяной бане лабораторной (Stegler WB-6, Китай).

Спектрофотометрическое исследование проводили на спектрофотометре Varian CARY 4000 UV-Vis (США), кювета с толщиной слоя 10 мм, оснащенной ПО для обработки данных – CaryWin UV Scan.

Для количественного определения рутозида методом кислотно-основного титрования в неводной среде использовали стандартное оборудование для титриметрического метода анализа (бюретка).

2.3 Реактивы

В работе использовали: Вода очищенная (аквадистилятор электрический Listjn A 1110), этилацетат (АО «ЭКОС-1», х.ч. ГОСТ 22300-76), муравьиная кислота 85 % (Rushim, CAS 64-18-6), спирт этиловый (ЗАО «Брынцалов А», содержание этанола 96,3 %), цинк (марка ПЦР-1, чистота 98,13 %), магний металлический в стружке (Компонент-Реактив, CAS: 7439-95-4), соляная кислота (Сигма Тек, х.ч. ГОСТ 3118-77), уксусная кислота ледяная (х.ч. ГОСТ 61 75), Алюминия хлорид гексагидрат (ФАРМ, ГОСТ 3759-75), железа (III) хлорида гексагидрат (neoFroxx, CAS:10025-77-1), фосфорномолибденовая кислота гидрат (Sigma-Aldrich, CAS:51429-74-4), метилэтилкетон (neoFroxx, CAS: 78-93-3), Аммиак раствор 25 % (Merck, х.ч. CAS:1336-21-6), натрия гидроксид (HiMedia Laboratories), калия феррицианид (HiMedia Laboratories), дифенилборная кислота аминоэтилового эфира (98 %, Acros Organics) раствор 1 % в спирте 96 %, макрогол

400 (CAS 25322-68-3) раствор спиртовой 5 %, 0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида Acros Organics CAS:2052-49-5), диметилформамид (Serva, CAS: 68-12-2), бутанол (Merck, CAS: 71-36-3),

Реактивы имели градацию ХЧ («химически чистый») и ЧДА («чистый для анализа») и соответствовали требованиям, предъявляемым к реагентам для ВЭЖХ-анализа.

2.4. Приготовление стандартных растворов

В настоящей работе были использованы растворы стандартных образцов рутина, кверцетина и аскорбиновой кислоты.

Раствор стандартного образца рутина. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают. При необходимости, содержимое растворяют с применением УЗ-бани в течение 1,5 мин.

Раствор стандартного образца кверцетина. Около 0,005 г (точная навеска) СО кверцетина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают.

Раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают.

2.5 Фармакопейные методы исследования

2.5.1 Приготовление извлечений из лекарственного растительного сырья

В ГФ РФ XIV изд. ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава» представлены две методики получения извлечений: для обнаружения БАВ (извлечение 1) и количественного определения суммы флавоноидов (извлечение 2).

Методика получения извлечения 1: измельченные образцы лекарственного растительного сырья (1 г) экстрагировали 10 мл этанола 96 %. Образцы взвешивали до и после экстракции. В случае потери спирта после экстракции образцы доводили до исходной массы. Затем экстракты фильтровали с помощью фильтровальной бумаги диаметром 7,0 см (Whatman, Англия). Экстракцию проводили с обратным холодильником на водяной бане при температуре 99,9°C. Время экстракции – 5 минут.

Методика получения извлечения 2: 1,0 г сырья экстрагировали 100 мл этанола 70 %. Образцы взвешивали до и после экстракции. В случае потери спирта после экстракции образцы доводили до исходной массы. Затем экстракты фильтровали с помощью фильтровальной бумаги диаметром 7,0 см (Whatman, Англия). Экстракцию проводили с обратным холодильником на водяной бане при температуре 99,9°C. Время экстракции – 5 минут. Первые 10 мл фильтрата отбрасывали.

В соответствии с действующей ГФ РФ была представлена общепринятая методика получения извлечений из анализируемых растительных объектов: аналитическую пробу сырья измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл спирта 95 % и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу нагревали с обратным холодильником на водяной бане при температуре 99,9°C в течение 5 мин. Затем колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и, при необходимости, доводили до первоначальной массы спиртом 95 %. Затем извлечение фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом.

2.5.2 Тонкослойная хроматография

Идентификацию рутина в траве фиалки согласно ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава» проводили методом ТСХ.

В качестве подвижной фазы применяли смесь органических растворителей: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 65:15:20. В качестве детектирующих растворов последовательно использовали дифенилборилоксиэтиламина раствор 1 % в спирте 96 % и полиэтиленгликоль раствором 5 % в спирте 96 %. После высушивания пластин в сушильном шкафу при 105-110°C хроматограмму просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм. В качестве стандартного образца использовали раствор рутина в спирте 96 %.

Идентификацию рутозида проводили также методом ТСХ в соответствии с ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат». Хроматографию проводили в тонком слое сорбента в смеси растворителей бутанол–уксусная кислота безводная – вода – метилэтилкетон- этилацетат в соотношении 5:10:10:30:50 [46]. На пластинки со слоем силикагеля F254 наносили по 10 мкл испытуемого раствора и стандартного образца с содержанием рутозида 25 мкг.

В качестве детектирующего раствора использовали смесь 2,5 мл железа (III) хлорида раствора 10 % и 7,5 мл раствора калия феррицианида, пластину просматривали в течение 10 минут в видимом спектре.

2.5.3 Химические методы (качественные реакции)

Качественную реакцию идентификации флавоноидов проводили в соответствии с ранее применяемым документом ВФС 42-341-74 «Бутоны софоры японской» – спиртовой экстракт из бутонов с цинковой пылью и концентрированной хлороводородной кислотой.

Качественную реакцию рутозида в соответствии с ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» проводили по следующей методике: 10 мг рутозида растворяли в 5 мл спирта 96 %, прибавляли 1 г цинка и 2 мл хлористоводородной кислоты.

Идентификацию рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили в соответствии с нормативной документацией на препарат с магнием в солянокислой среде [46].

Идентификацию аскорбиновой кислоты в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили качественной реакцией с фосфорномолибденовой кислотой [46].

2.5.4 Спектрофотометрия

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве фиалки согласно ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава» проводили спектрофотометрическим методом. К раствору СО рутин и испытуемому раствору (извлечение 2) прибавляли алюминия хлорида раствор 5 % в спирте 70 %, уксусную кислоту раствор 3 %. Оптическую плотность определяли при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В ходе выполнения научной работы помимо расчета суммы флавоноидов в извлечении 2 был проведен также анализ извлечения 1.

Для измерения СО рутин в качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1,0 мл раствора СО рутин, 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, доведенный спиртом 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Для измерения испытуемого раствора в качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,0 мл раствора испытуемого раствора, 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, доведенный спиртом 70% (для извлечения 2) и спиртом 95% (для извлечения 1) до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Согласно ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» идентификацию рутозида проводили спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях». Спектр поглощения испытуемого раствора (рутозид, растворенный в метаноле) определяли в области спектрального диапазона от 210 нм до 450 нм с максимумами при 257 нм и 358 нм.

Идентификацию и количественное определение рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили в соответствии с нормативной документацией на препарат. УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца рутозида определяли в области от 300 до 400 нм [16, 26].

2.5.5 Титриметрические методы анализа

В соответствии с ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» количественное определение рутозида проводили неводным титрованием 0,1 М раствором тетрабутиламмония гидроксида в среде диметилформамида: 0,2 г (точная навеска) субстанции растворяли в 20 мл диметилформамида и титровали 0,1М раствором тетрабутиламмония гидроксида. Конечную точку титрования определяли потенциометрически. Параллельно был проведен контрольный опыт.

Количественное определение аскорбиновой кислоты в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили методом йодатометрического титрования: около 0,3 г (точная масса) порошка растертых таблеток помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали и фильтровали, первые 10 мл отбрасывали. 10 мл полученного раствора помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 1 мл 2% раствора кислоты хлороводородной, 0,5 мл 1% раствора калия йодида, 2 мл 0,5% раствора крахмала, воды до общего объема 20 мл и титровали раствором калия йодата (0,0167 моль/л) до появления стойкого светло-синего окрашивания. Параллельно проводили контрольный опыт.

2.6 Валидация

Разработанные методики были валидированы в соответствии с ГФ РФ XV, ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность [14, 21, 46, 87].

Специфичность. При оценке специфичности исключают влияние примесей и веществ на хроматографическое разделение и детектирование анализируемых веществ [14, 87].

Специфичность методик определялась сравнением показателей R_f (коэффициент удерживания), размером и формы пятен СО и анализируемых объектов. Также специфичность была определена путем сравнения анализируемых пятен по показателям: интенсивности, объема, веса пятен и площади пика. Сравнение результатов проводилось с ошибкой выборки 5 %.

Диапазон применения (аналитическая область) методики. В пределах аналитической области результаты должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности. Методика количественного определения должна быть применима в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики.

По разработанной методике количественное определение проводили относительно раствора СО с концентрацией рутина 0,05 % (1,5 мкг). Таким образом диапазон применения должен быть в пределах от 0,04 % до 0,06 % (1,2 мкг до 1,8 мкг) в соответствии с НД.

Аналитическая область методик установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

Диапазон применения (аналитическая область) методики. В пределах аналитической области результаты должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности. Методика количественного определения должна быть применима в интервал от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики.

По разработанной методике количественное определение проводят для раствора с концентрацией рутина 0,05 % (1,5 мкг). Таким образом диапазон применения должен быть в пределах от 0,04 % до 0,06 % (1,2 мкг до 1,8 мкг). Для разработанной методики аналитическая область находится в пределах от 0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг).

Аналитическая область методики установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

Линейность. Линейность методик проверялась экспериментальным измерением аналитических сигналов для 9 проб с различными концентрациями определяемого вещества – рутина.

Экспериментальные данные были обработаны методом наименьших квадратов с использованием линейной модели по формуле, указанной в фармакопейной статье:

$$y = b \cdot x + a,$$

где x – количество или концентрация определяемого вещества;

y – величина отклика;

b – угловой коэффициент линейной зависимости;

a – свободный член (ОФС «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний»).

Линейность методики подтверждалась, если коэффициент корреляции (R^2) составлял не менее 0,99 [90].

В рамках валидации проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих калибровочным уровням, путем соответствующего разведения матричного раствора растворителем. В качестве растворителя применяли спирт этиловый 95 %. Для приготовления матричного раствора №1 в мерную колбу вместимостью 10 мл добавляли 0,020 г (точная навеска) СО рутина, после чего объем колбы доводили растворителем до метки. Методика приготовления матричного раствора приведена ниже [87].

Концентрация рутина в полученном растворе составила 0,200 % – раствор №1. Объемы и концентрации растворов, приготовленных путем разведения указаны в Таблице 2.1.

Для валидации ЛРС калибровочные растворы, полученные по методике выше, были проанализированы после проведения аналогичной методики приготовления извлечений, указанной в Главе 2.5.1 настоящей работы.

Таблица 2.1 – Калибровочные уровни методики количественного определения рутина

№ раствора	Объем анализируемого раствора, переносимого в мерную колбу вместимостью 10 мл, мл	Объем растворителя, добавленного к анализируемому раствору, мл	Концентрация рутина в полученном растворе, %	Масса рутина, нанесенная на линию старта (в 3 мкл), мкг
1	-		0,200	6,00
2	7 мл раствора №1	1	0,175	5,25
3	5,2 мл раствора №2	0,8	0,150	4,50
4	4,2 мл раствора №3	0,8	0,125	3,75
5	3,2 мл раствора №4	0,8	0,100	3,00
6	2,25 мл раствора №5	0,75	0,075	2,25
7	1,33 мл раствора №6	0,67	0,050	1,50
8	0,5 мл раствора №7	0,5	0,025	0,75
9	0,2 мл раствора, №8	0,8	0,010	0,30

Правильность. Для оценки правильности методики количественного определения рутина был применен следующий подход: проводили анализ с использованием стандартных образцов с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества.

Правильности методики определяли для восьми калибровочных образцов (0,025 %, 0,050 %, 0,075 %, 0,100 %, 0,125 %, 0,150 %, 0,175 %, 0,200 %), каждый из которых был проанализирован три раза. По результатам анализа определяли среднее значение расчетного содержания рутина в образце и относительную стандартную погрешность (RSE, %). Правильность подтверждалась, если значение RSE составляло не более 5 % для каждого уровня концентрации [87].

Прецизионность. Прецизионность оценивали по результатам шести (для субстанции) и трех (для таблеток) определений для каждого из трех уровней определяемых величин, которые лежат в диапазоне применения методики.

Для подтверждения прецизионности было проведено два исследования: Повторяемость в рамках одного дня ($n = 6$ или 3); Внутрिलाбораторная прецизионность на следующий день после повторяемости ($n = 6$ или 3) [87].

По результатам анализа определяли стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение (RSD, %). Правильность подтверждалась, если значение RSD составляло не более 5 % для каждого уровня концентрации [87].

2.7 Статистическая обработка результатов

Количественные показатели, полученные в рамках проведённых экспериментальных исследований, были подвергнуты комплексной статистической интерпретации в строгом соответствии с требованиями ГФ РФ XV OFC.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний», с использованием специализированных программных пакетов Origin: Data Analysis and Graphing Software и Microsoft Office Excel [90].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ РУТИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Для идентификации биологически активных соединений в растительных препаратах в соответствии с ГФ РФ XV издания применяют метод ТСХ, для количественного определения суммы флавоноидов представлены физико-химические методы (как правило, спектрофотометрия). ВЭТСХ позволяет объединить эти два метода, сокращая время проведения анализа, и провести анализ по индивидуально идентифицированному веществу в ЛРС.

3.1 Анализ лекарственного растительного сырья фиалки трава методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

3.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых компонентов

Одним из важнейших этапов является получение извлечений с максимальным содержанием действующих веществ. В ходе проведения научно-исследовательской работы было проанализировано два вида извлечений, полученные различным объемом и процентом экстрагента – спирта этилового. Методики получения извлечений представлены в Главе 2.5.1 настоящей работы.

При исследовании БАВ сложного строения, таких как флавоноиды, необходим экспериментальный подбор оптимальных условий разделения. Состав элюента играет определяющую роль при проведении ВЭТСХ-анализа [80].

Подбор подвижной фазы с оптимальным соотношением растворителей является одним из важнейших этапов в исследовании.

Экспериментальная цель данной работы состояла в разработке простой и надежной процедуры ВЭТСХ для количественного определения рутина в извлечениях фиалки травы.

Первым шагом в разработке хроматографического метода был выбор подходящей подвижной фазы таким образом, чтобы значения R_f для компонентов находились в диапазоне 0,3-0,5.

В ходе исследования были экспериментально подобраны и обоснованы теоретически оптимальные условия хроматографирования рутина. Проверка пригодности хроматографической системы основана на разделении двух веществ, имеющих близкие факторы подвижности (значения R_f). Полученные результаты испытания действительны лишь при условии достижения необходимой степени разделения на хроматограмме.

Согласно исследованиям [61, 76, 79, 88] и фармакопейным статьям на лекарственное растительное сырье, содержащее рутин, одним из наиболее известных составов подвижной фазы является применение этилацетата, уксусной кислоты ледяной и воды в различных соотношениях, в некоторых источниках говорится о муравьиной кислоте безводной.

Таким образом, первоначальный подбор был произведен согласно изученной научной литературе.

В Таблице 3.1 представлены ПФ, апробированные для исследования рутина в ЛРС фиалки трава, и наблюдаемые результаты. На основании изученных литературных данных экспериментальным путем была выбрана смесь органических растворителей с оптимальным составом: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода. Она обеспечивала хорошее разделение всех компонентов извлечения из растительного сырья, формируя компактные, симметричные пятна. Увеличение кислотности подвижной фазы путем добавления муравьиной кислоты безводной улучшало общее разделение соединений.

Таблица 3.1 – Сравнительный анализ ПФ для обнаружения рутина в ЛРС

№	Смесь растворителей, мл	Результат
1	хлороформ: метанол: вода (26:14:3)	пятна относительно выраженные
2	бутанол: уксусная кислота ледяная: вода (4:1:5)	пятна относительно выраженные
3	хлороформ: ацетон: метанол (36:1:1)	пятна на линии старта
4	бутанол: уксусная кислота безводная: вода: метилэтилкетон: этилацетат (5:10:10:30:50)	пятна относительно выраженные
5	этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (70:10:20)	пятна относительно выраженные
6	этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (65:15:20)	формируются компактные симметричные пятна

Известно, что pH среды влияет на результаты разделения веществ в тонкослойной хроматографии. Для веществ, проявляющих свойства кислот, кислотность среды влияет больше, чем температура. Уксусная кислота является более слабым кислотным модификатором, нежели муравьиная кислота. В Таблице 3.2 представлены результаты элюирования рутина в различных подвижных фазах с различным соотношением растворителей, подобранные экспериментальным путем. Следует отметить, что разделение при использовании муравьиной кислоты безводной было более четко выраженным.

Таблица 3.2 – Показатели Rf рутина как оценка пригодности хроматографической системы

№ ПФ	Смесь растворителей, мл	Rf	Результат
ПФ 1	Этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (10:10:40)	0,910±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 2	Этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (7,5:1,5:1,5)	0,455±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 3	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (32,5:7,5:10)	0,364±0,01	пятна относительно выраженные

Продолжение Таблицы 3.2

ПФ 4	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4:6)	0,364±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 5	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4,7:5,3)	0,364±0,01	формируются компактные симметричные пятна
ПФ 6	Уксусная кислота ледяная: вода (60:40)	0,900±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 7	Муравьиная кислота безводная: вода (60:40)	0,363±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 8	Этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода (31:6,5:7)	0,400±0,01	формируются компактные симметричные пятна

Коэффициент подвижности определяется в пределах $R_f = 0-1$, а оптимальным значением является $0,3-0,5$. Таким образом, в соответствии с Таблицей 3.2 ПФ №1 и №6 были исключены для дальнейшего анализа. В ПФ №2, №3, №4 и №7 пятна были относительно выраженные, размытые. В подвижных фазах №5 и №8 были сформированы компактные симметричные пятна.

Таким образом, ПФ №5 и №8 были применены для обнаружения рутина в ЛРС фиалки трава. В результате ПФ №8 дала ярко-выраженные компактные симметричные пятна (Рисунок 3.3).

Также в ходе исследования был выявлен оптимальный объем пробы для анализа – 3 мкл. При исследовании 1 и 2 мкл, пятна были слабо выражены, при более высоком объеме – пятна были более насыщенные, что является хорошей оценкой подлинности вещества, но при этом размытые, что мешает анализу количественного определения.

Согласно исследованиям для визуального определения качества разделения хроматографическую пластину после элюирования необходимо обработать каким-либо детектирующим реагентом. В качестве реагентов (Таблица 3.3) для идентификации зон рутина были использованы рекомендованные в литературе: 5 % спиртовой раствор $AlCl_3$; 5 % спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты; пары аммиака; 5 % водный и спиртовой раствор $NaOH$. В исследованиях

[47, 64, 76, 79, 88] в качестве проявителя, был предложен 10 % спиртовой раствор NaOH, образующий с рутином соединение, которое окрашено в желто-оранжевый цвет [80].

Немаловажным фактом, наряду с высокой чувствительностью, специфичностью и доступностью, является то, что обработанные этим реагентом хроматограммы не изменяют интенсивности окраски с течением времени (более 30 дней), а значит, ошибка количественной оценки данных ТСХ будет минимальной [47, 64, 76, 79, 80, 88].

Таблица 3.3 – Характеристика основных используемых для обнаружения рутина методом ТСХ детектирующих реагентов [80]

Детектирующий раствор	Окрашивание зон на хроматограммах	
	Видимый свет	УФ-свет
Без детектирующего раствора	Бледно-желтое	Желтовато-бурое
5 % спиртовой раствор хлорида алюминия	Бледно-желтое	Красновато-бурое
Пары аммиака	-	
Раствор натрия гидроксида водный 5 %	Оранжево-бурое	
Раствор натрия гидроксида спиртовой 10 %	Оранжево-бурое	Желтовато-бурое
Раствор фосфорномолибденовой кислоты спиртовой 5 %	Зеленовато-синее	-

В настоящей работе был исследован показатель интенсивности пятен, обработанных детектирующим реагентом, и без обработки. Реактивами для детектирования были: дифенилборная кислота аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 % и макрогол 400 раствор спиртовой 5 %. Было выявлено, что анализируемое пятно рутозида детектировалось при УФ на длине волны 365 нм, которое дает меньший показатель интенсивности [41]. Применение детектирующих растворов создавало шум на хроматограмме, что мешало

получению точной интенсивности светопоглощения анализируемых пятен. В связи с этим, для исключения ошибки в дальнейшей количественной оценке, было решено исключить применение детектирующих растворов для методик идентификации и количественного определения рутина методом ВЭТСХ. Это также способствует упрощению проведения контроля качества в пользу отказа токсичных и труднодоступных веществ.

По совокупности экспериментальных данных были предложены и теоретически обоснованы оптимальные условия определения рутина методом ВЭТСХ: неподвижная фаза – стеклянные пластинки, покрытые силикагелем, HPTLC plates (reversed phase) RP-18 F 254 (MERCK, Германия) 5x10; оптимальный объем пробы – 3 мкл спиртового раствора рутозид; подвижная фаза – этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода (31:6,5:7); насыщение камеры парами элюента – 20 мин; детектирование – УФ-свет [80].

3.1.2 Идентификация и количественное определение рутина в траве фиалки методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Экспериментальная цель данной работы состояла в разработке и валидации простой и надежной процедуры ВЭТСХ для обнаружения рутина в ЛРС, основанной на четком разделении сложной многокомпонентной системы и определении индивидуально идентифицированных веществ.

При подборе условий хроматографирования для идентификации и количественного определения отталкивались от физико-химических свойств рутина. После серии экспериментов оптимальными были признаны условия, описанные ниже.

Нанесение образцов на ВЭТСХ-пластинки Silica gel 60 F254 (5×10 см) осуществлялось с помощью специального аппликатора Nanomat 4, диспенсера и универсального держателя. В ходе исследования выявлен оптимальный объем пробы для анализа – 3 мкл. Расстояние между образцами было установлено 10 мм,

расстояние от края пластины 15 мм; расстояние от нижнего края пластины составляло 25 мм. Перед началом элюирования пластинки обязательно просушивали потоком горячего воздуха в течение 30 сек. Насыщение камеры парами элюента составляло 20 мин. Время элюирования могло варьировать от 18 до 20 мин., за это время фронт растворителя проходит 70 мм от начала пластины. После хроматографирования пластины просушивали для удаления ПФ в течение 5 минут.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводили на денситометре Vilver Quantum E5. Обнаружение рутина проводили при длине волны 365 нм (Рисунок 3.3). Следует учесть, что возможность параллельного просмотра пластин (254 нм, 365 нм, дневной свет) на приборе при разных длинах волн способствует получению более комплексной оценки хроматограммы, что связано с проявлением определенных классов веществ при определенной длине волны.

Программное обеспечение BioVision было использовано для измерения интенсивности светопоглощения пятнами. Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 1.

В результате перерасчета получено процентное содержание рутина в извлечении – $3,08 \pm 0,01$ %. Результаты представлены в Таблице 3.7.

Образцы хроматограмм и детальное обсуждение выбора условий разделения представлено в разделе 3.3 настоящей работы.

3.1.3 Валидация разработанной методики

3.1.3.1 Методика

На основании серии проведенных испытаний была разработана методика обнаружения и количественного определения индивидуально идентифицированного соединения (рутина) в ЛРС фиалки трава методом ВЭТСХ:

Пластинка. НРТLC plates (reversed phase) RP-18 F 254 (MERCK, Германия) 5x10.

Испытуемый раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 95 % и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу нагревают с обратным холодильником на водяной бане при температуре $99,9^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и, при необходимости, доводят до первоначальной массы спиртом 95 %. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом.

Раствор стандартного образца рутина. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают. При необходимости, содержимое растворяют с применением УЗ-бани в течение 1,5 мин.

Подвижная фаза (ПФ). этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода 31:6,5:7.

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 3 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца рутина с помощью специального аппликатора. Расстояние между образцами должно быть 10 мм; расстояние от края пластины – 15 мм; расстояние от нижнего края пластины – 25 мм.

Пластинку с нанесенными пробами сушат потоком горячего воздуха в течение 30 сек, затем помещают в (предварительно насыщенную, в течение 20 мин) камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 70 мм от начала пластинки, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в течение 5 минут и просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводят на денситометре с установленной ПО для измерения интенсивности светопоглощения.

Результат. Идентификация. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению и окраске должна соответствовать зоне адсорбции рутина на хроматограмме раствора стандартного образца рутина; показатель Rf для рутина составляет 0,4.

Количественное определение. Проводят измерение интенсивности пятна на хроматограмме испытуемого раствора относительно пятна стандартного образца рутина. Содержание рутина в процентах (X) вычисляют по формуле 1:

$$X\% = \frac{Int_x * m_{co} * P * 100 * 100 \%}{Int_{co} * m_{дрс} * (100 - W)} \quad (1)$$

где Int_x – интенсивность анализируемого объекта, %;

Int_{co} – интенсивность СО, %;

m_{co} – навеска СО, г;

$m_{дрс}$ – навеска сырья, г;

P – содержание основного вещества в СО, доли;

100 – коэффициент учета влажности;

W – влажность сырья, %.

3.1.3.2 Результаты валидации

Разработанная методика была валидирована в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность [21]. Определенные показатели соответствуют условиям и требованиям нормативной документации. Методика характеризуется селективностью и воспроизводимостью, сочетает относительную простоту исследования с точностью [46].

Специфичность. Показатель R_f для рутина составил 0,4. Результаты сравнения анализируемых пятен по показателям: интенсивность, объем, вес пятен и площади пика представлены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Определение специфичности

Критерии пригодности	Полученное значение для СО	Полученные значения для анализируемого образца рутина	Соответствие КП
Интенсивность пятна	100	98,854	Соответствует
Объем пятна	55 652 789	54 994 843	Соответствует
Вес пятна	49 082	49 016	Соответствует
Площадь пика	1 400	1 400	Соответствует

Примечание: *КП – критерий приемлемости.

Диапазон применения (аналитическая область) методики. Аналитическая область методик установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели (Рисунок 3.1).

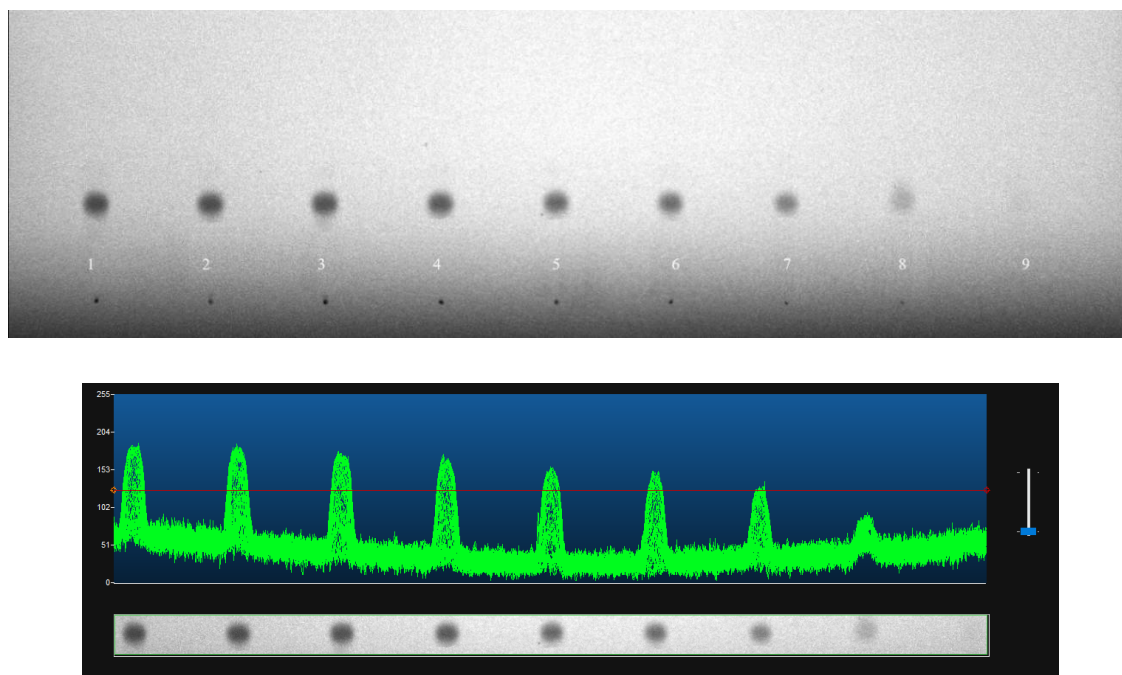


Рисунок 3.1 – Калибровочная хроматограмма с серией стандартных растворов (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 31:6,5:7 (v/v/v)). Нумерация пятен соответствует нумерации растворов в Таблице 3.6

Для разработанной методики аналитическая область находится в пределах от 0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг). Данные представлены в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Определение аналитической области методики

Номинальное значение определяемой аналитической характеристики	Диапазон применения методики в соответствии с ОФС	Диапазон применения методики в соответствии с практическим результатом	Соответствие КП
0,05 % (1,5 мкг)	0,04 % до 0,06 % (1,2 мкг до 1,8 мкг)	0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг)	Соответствует
Примечание: *КП – критерий приемлемости.			

Линейность. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил – 0,9977 (Рисунок 3.2). Интенсивность пятен для калибровочных растворов представлена в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Калибровочные уровни методики количественного определения рутина

№ раствора	Концентрация рутина в полученном растворе, %	Масса рутина, нанесенная на линию старта (в 3 мкл), мкг	Интенсивность, %
1	0,200	6,00	100
2	0,175	5,25	89,099
3	0,150	4,50	78,863
4	0,125	3,75	65,202
5	0,100	3,00	53,756
6	0,075	2,25	41,364
7	0,050	1,50	27,097
8	0,025	0,75	13,256
9	0,010	0,30	-

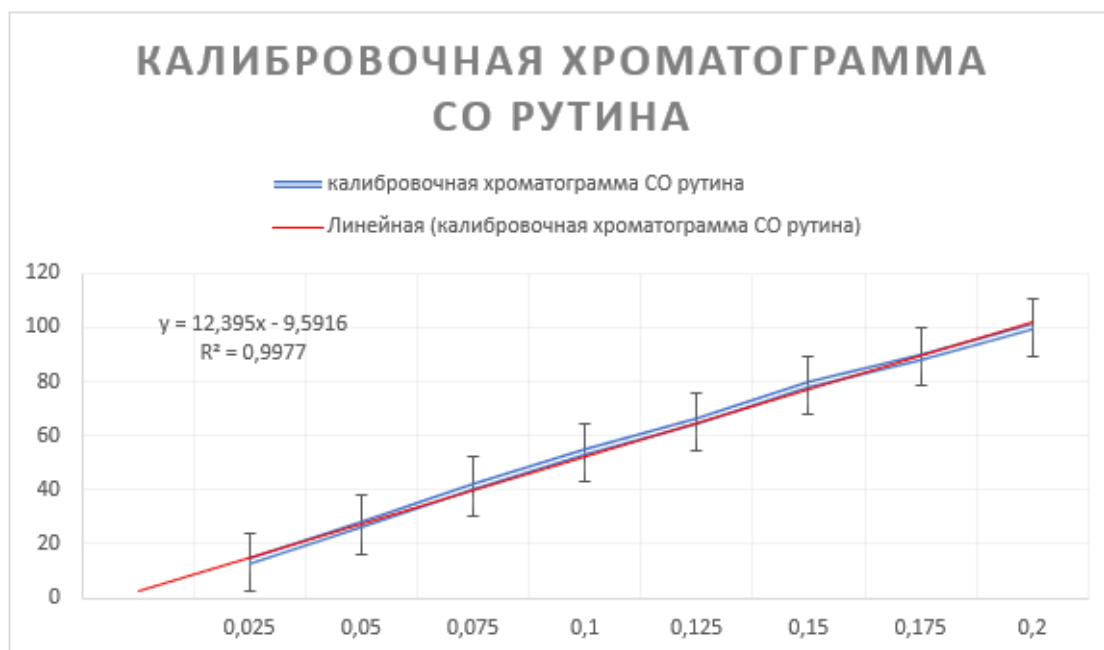


Рисунок 3.2 – График линейности рутина (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 31:6,5:7 (v/v/v))

Полученные результаты валидации соответствуют нормативной документации и подтверждают пригодность методики, предназначенной для идентификации и количественного определения ЛРС методом ВЭТСХ.

3.2 Результаты определения рутина фармакопейными методами

В соответствии с ГФ РФ XIV ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава, *Violae herba*» было проведено обнаружение рутина методом ТСХ, количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин – методом спектрофотометрии по методикам, описанным в разделе 2.5 настоящей работы.

На хроматограмме раствора СО рутина была обнаружена зона с флюоресценцией желто-оранжевого цвета. На хроматограмме испытуемого раствора было обнаружено не менее двух зон: зона с флюоресценцией ярко-желтого цвета ниже зоны рутина и зона с флюоресценцией желто-оранжевого цвета примерно на уровне зоны рутина.

В соответствии с ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава» допускается наличие дополнительных 3-4 зон, в том числе зоны желтой флуоресценции выше зоны рутина. Результаты соответствовали требованиям фармакопейной статьи.

При проведении количественного анализа спектрофотометрическим методом оптическую плотность измеряли для шести растворов: 1 – раствор СО рутина, 2 – раствор сравнения СО рутина, 3 – раствор извлечения №1 травы фиалки, 4 – раствор сравнения извлечения №1 травы фиалки, 5 – раствор извлечения №2 травы фиалки, 6 – раствор сравнения извлечения №2 травы фиалки.

Оптическую плотность измеряли на приборе Agilent Cary 60 при длине волны 410 нм (диапазон 450-350 нм).

В соответствии с ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава» содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин должно быть не менее 1 % [53].

Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в извлечении составило 2,42 %, что соответствует требованиям фармакопейной статьи.

3.3 Обсуждение результатов исследования фиалки травы

Этанол различной концентрации был использован для определения разницы концентрации активных соединений, присутствующих в исследуемых образцах, в зависимости от типа растворителя.

Результаты ВЭТСХ-анализа показывают, что спирт (96 %) растворяет большее количество активных компонентов из исследуемых образцов, чем этанол (70 %), что проявляется в большей интенсивности полосы рутина и соответственно концентрации (Рисунок 3.3).

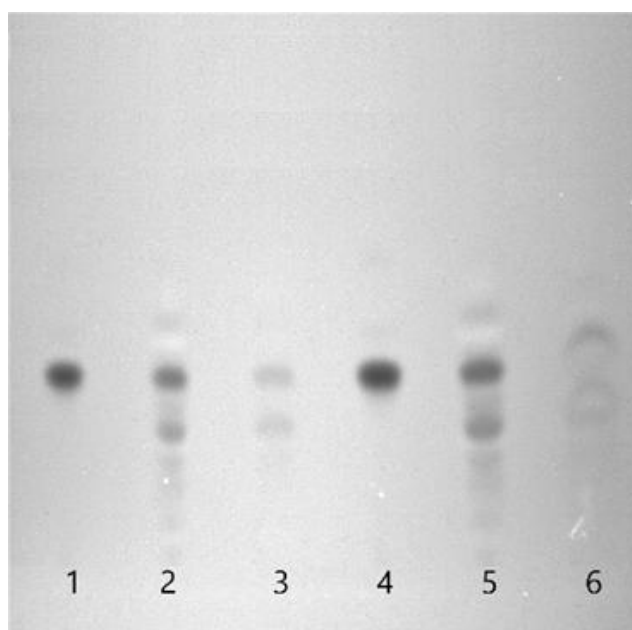


Рисунок 3.3 – Хроматограмма извлечений фиалки травы: 1 – СО рутина (3 мкл), 2 – извлечение №1 (3 мкл), 3 – извлечение №2 (3 мкл), 4 – СО рутина (5 мкл), 5 – извлечение №1 (5 мкл), 6 – извлечение №2 (5 мкл)

Используя оптимальную смесь подвижных фаз, на пластинках ВЭТСХ детектируется светло-желтая флуоресцентная зона при $R_f = 0,4$, которая соответствует рутину.

Программное обеспечение BioVision использовали для расчета концентрации (в пикселях) полос (Таблица 3.7). Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 1.

В результате перерасчета: процентное содержание рутина с помощью метода ВЭТСХ в извлечении №1 (3 мкл) – $3,08 \pm 0,01$ %, в извлечении №2 (3 мкл) – $1,59 \pm 0,01$ %. Процентное содержание рутина с помощью метода ВЭТСХ в извлечении №1 (5 мкл) – 3,09 %, в извлечении №2 (5 мкл) – 1,61 %.

Таблица 3.7 – Содержание рутина методом ВЭТСХ в траве фиалки, %

	Интенсивность, %	Процентное содержание рутина
СО рутина, 3 мкл	100	
Извлечение №1, 3 мкл	64,897	3,08
Извлечение №2, 3 мкл	33,496	1,59

Продолжение Таблицы 3.7

СО рутина, 5 мкл	100	
Извлечение №1, 5 мкл	65,039	3,09
Извлечение №2, 5 мкл	33,819	1,61

Результаты количественного определения рутина методом спектрофотометрии в исследуемых образцах травы фиалки представлены в Таблице 3.8. Результаты соответствуют нормам ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава».

Таблица 3.8 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом в траве фиалки, %

	Оптическая плотность рутина при длине волны 410 нм	Процентное содержание рутина
СО рутина	1,01902	
СО рутина, раствор сравнения	0,10641	
Извлечение №1	1,13656	3,43
Извлечение №1, раствор сравнения	0,47784	
Извлечение №2	0,52493	2,42
Извлечение №2, раствор сравнения	0,06082	

Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин с помощью спектрофотометрического метода в извлечении №1 – 3,43 %, в извлечении №2 – 2,42 %.

Исходя из полученных результатов, представленных в Таблицах 3.7 и 3.8, допустимо предположение, что одним из основных и преобладающих количественно флавоноидом в траве фиалки является рутин.

3.4 Выводы к Главе 3

1) Изучены подвижные фазы с различными органическими растворителями в различных соотношениях, экспериментальным путем подобрана ПФ с

оптимальным соотношением растворителей: этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода в соотношении 31:6,5:7 (v/v/v). Её использование в процессе хроматографии обеспечивало формирование компактных симметричных пятен индивидуальных веществ. Выявлено, что при детектировании хроматографических зон с помощью сканирования лучшие результаты достигаются без обработки детектирующим реактивом.

2) Разработана методика количественного определения рутина в ЛРС трава фиалки методом ВЭТСХ. Процентное содержание рутина составило $3,08 \pm 0,01$ %. Результаты соответствуют требованиям ГФ РФ XIV издания, ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава». Согласно результатам количественного определения методом спектрофотометрии содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в извлечении №1 составило 3,43 %, в извлечении №2 – 2,42 %.

3) Валидирована разработанная методика в соответствии с ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность, результаты валидации соответствуют требованиям нормативной документации [46]. Показатель R_f (коэффициент удерживания) для рутина составил 0,4. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил – 0,9977.

ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

4.1 Анализ лекарственного растительного сырья гречихи трава и софоры бутоны методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

На основании результатов успешно разработанной и валидированной методики, полученных при анализе извлечения из фиалки травы, провели анализ еще двух видов растительного сырья согласно литературным данным [5, 97, 103, 135], которые являются основными источниками промышленного получения рутина в России и за рубежом, – софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*) и гречихи посевной трава (*Fagopyri esculenti herba*) [40, 46].

4.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых компонентов

Для анализа гречихи травы и софоры бутонов были проанализированы подвижные фазы, представленные в Таблице 3.1. В качестве подвижной фазы была выбрана та же смесь растворителей, но с другим соотношением: этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (35:5:4), в результате чего наблюдались равные, обособленные пятна. Модификация подвижной фазы необходима для более четкого разделения соединений в многокомпонентных объектах. Раствор СО рутина готовили в соответствии с методикой, описанной в разделе 3.1.1 настоящей работы [46]. Концентрация рутина в полученном растворе составляет 0,05 %.

4.1.2 Идентификация и количественное определение рутина в гречихе траве и софоре бутонах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Нанесение образцов на ВЭТСХ-пластинки Silica gel 60 F254 осуществлялось с помощью специального аппликатора Nanomat 4, диспенсера и универсального держателя. На линию старта наносили по 3 мкл СО рутина и извлечений, полученных из ЛРС. Перед началом элюирования пластинки обязательно просушивали потоком горячего воздуха в течение 30 сек. Насыщение камеры парами элюента составляло 20 мин. Время элюирования могло варьировать от 18 до 20 мин., за это время фронт растворителя проходит 70 мм от начала пластины. После хроматографирования пластины просушивали для удаления ПФ в течение 5 минут.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводили на денситометре Vilver Quantum E5. Обнаружение рутина проводили при длине волны 365 нм (Рисунок 4.3). Программное обеспечение BioVision было использовано для измерения интенсивности светопоглощения пятнами [46].

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 1 [46].

4.1.3 Валидация

4.1.3.1 Методика

На основании серии проведенных испытаний была разработана методика обнаружения и количественного определения индивидуально идентифицированного соединения (рутина) в растительных объектах гречихи травы и софоры бутонов методом ВЭТСХ:

Пластинка. НРТLC plates (reversed phase) RP-18 F 254 (MERCK, Германия) 5x10.

Испытуемый раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 95 % и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу нагревают с обратным холодильником на водяной бане при температуре $99,9^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и, при необходимости, доводят до первоначальной массы спиртом 95 %. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом.

Раствор стандартного образца рутина. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают. При необходимости, содержимое растворяют с применением УЗ-бани в течение 1,5 мин [46].

Подвижная фаза (ПФ). этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода 35:5:4.

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 3 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца рутина с помощью специального аппликатора. Расстояние между образцами должно быть 10 мм; расстояние от края пластины – 15 мм; расстояние от нижнего края пластины – 25 мм.

Пластинку с нанесенными пробами сушат потоком горячего воздуха в течение 30 сек, затем помещают в (предварительно насыщенную, в течение 20 мин) камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 70 мм от начала пластинки, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в течение 5 минут и просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводят на денситометре с установленной ПО для измерения интенсивности светопоглощения.

Результат. Идентификация. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению и окраске должна соответствовать зоне адсорбции рутина на хроматограмме раствора стандартного образца рутина; показатель Rf для рутина составляет 0,34.

Количественное определение. Проводят измерение интенсивности пятна на хроматограмме испытуемого раствора относительно пятна стандартного образца рутина.

Содержание рутина в процентах (X) вычисляют по формуле 1:

$$X\% = \frac{Int_x * m_{co} * P * 100 * 100 \%}{Int_{co} * m_{лрс} * (100 - W)} \quad (1)$$

где Int_x – интенсивность анализируемого объекта, %;

Int_{co} – интенсивность СО, %;

m_{co} – навеска СО, г;

$m_{лрс}$ – навеска сырья, г;

P – содержание основного вещества в СО, доли;

100 – коэффициент учета влажности;

W – влажность сырья, %.

4.1.3.2 Результаты валидации

Разработанная методика была валидирована в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность [21]. Определенные показатели соответствуют условиям и требованиям нормативной документации. Методика характеризуется селективностью и воспроизводимостью, сочетают относительную простоту исследования с точностью [46].

Специфичность. Показатель Rf для рутина составил 0,34. Результаты сравнения анализируемых пятен по показателям: интенсивность, объем, вес пятен и площади пика представлены в Таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Определение специфичности

Критерии пригодности	Полученное значение для СО	Полученные значения для анализируемого образца рутина	Соответствие КП
Интенсивность пятна	100	98,996	Соответствует
Объем пятна	54 652 783	53 474 384	Соответствует
Вес пятна	49 116	49 107	Соответствует
Площадь пика	1 400	1 400	Соответствует
Примечание: *КП – критерий приемлемости.			

Диапазон применения (аналитическая область) методики. Для разработанной методики аналитическая область находится в пределах от 0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг). Данные представлены в Таблице 4.2 и на Рисунке 4.1.

Таблица 4.2 – Определение аналитической области методики

Номинальное значение определяемой аналитической характеристики	Диапазон применения методики в соответствии с ОФС	Диапазон применения методики в соответствии с практическим результатом	Соответствие КП
0,05 % (1,5 мкг)	0,04 % до 0,06 % (1,2 мкг до 1,8 мкг)	0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг)	Соответствует
Примечание: *КП – критерий приемлемости.			

Линейность. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил – 0,9979 (Рисунок 4.2). Интенсивность пятен для калибровочных растворов представлена в Таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Калибровочные уровни методики количественного определения рутина

№ раствора	Концентрация рутина в полученном растворе, %	Масса рутина, нанесенная на линию старта (в 3 мкл), мкг	Интенсивность, %
1	0,200	6,00	100
2	0,175	5,25	89,131
3	0,150	4,50	78,654
4	0,125	3,75	65,765
5	0,100	3,00	53,650
6	0,075	2,25	41,423
7	0,050	1,50	27,975
8	0,025	0,75	13,497
9	0,010	0,30	-

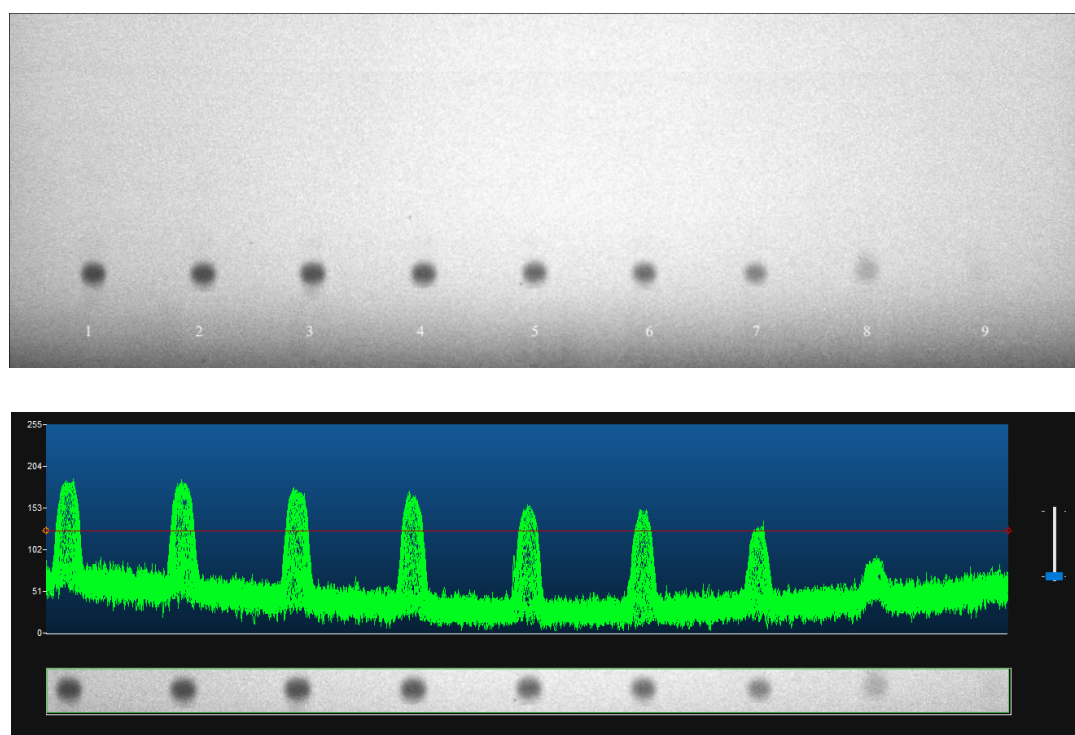


Рисунок 4.1 – Калибровочная хроматограмма с серией стандартных растворов (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 35:5:4 (v/v/v)). Нумерация пятен соответствует нумерации растворов в Таблице 4.3

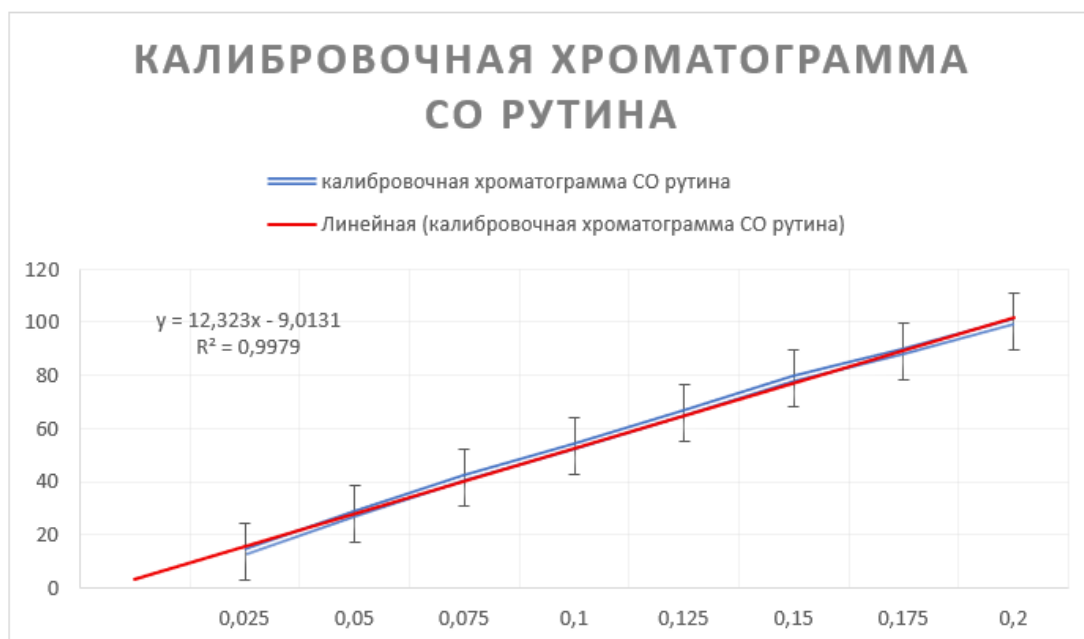


Рисунок 4.2 – График линейности рутина (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 35:5:4 (v/v/v))

Полученные результаты валидации соответствуют нормативной документации и подтверждают пригодность методики, предназначенной для идентификации и количественного определения ЛРС методом ВЭТСХ.

4.2 Результаты определения рутина фармакопейными методами

Результатом проведения качественной реакции идентификации флавоноидов в соответствии с ранее применяемым документом ВФС 42-341-74 «Бутоны софоры японской» было окрашивание спиртового экстракта с цинковой пылью в вишнево-красный цвет.

4.3 Результаты исследования и их обсуждение

Используя оптимальную смесь подвижных фаз, на пластинках ВЭТСХ детектируется светло-желтая флуоресцентная зона при $R_f = 0,34$, которая соответствует рутину (Рисунок 4.3).

Программное обеспечение BioVision была использована для расчета концентрации (в пикселях) полос.

В образцах извлечений №1 было проведено обнаружение и количественное определение рутина и кверцетина.

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 1.

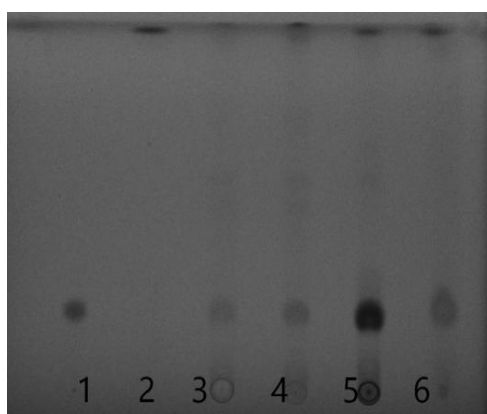


Рисунок 4.3 – Хроматограмма извлечений из гречихи травы и софоры бутонов:
1 – СО рутина, 2 – СО кверцетина; 3 – извлечение №2 травы гречихи;
4 – извлечение №1 травы гречихи; 5 – извлечение №1 бутонов софоры;
6 – извлечение №2 бутонов софоры

Таблица 4.4 – Содержание рутина и кверцетина в ЛРС гречихи травы и софоры бутоны, %

Образец	Интенс. Рутин, %	Конц. рутина, %	Интенс. Кверцетина , %	Конц. кверцетина %
Извлечение №1 травы гречихи	96,415	4,82		
Извлечение №1 бутонов софоры	123,238	6,16	97,389	4,87

Процентное содержание рутина в извлечении №1 гречихи травы составило $4,82 \pm 0,03$ %, в извлечении №1 софоры бутонов – $6,16$ %. Процентное содержание кверцетина в извлечении №1 софоры бутонов – $4,87 \pm 0,02$ % (Таблица 4.4).

4.4 Выводы к Главе 4

1) Разработана методика количественного определения рутина методом ВЭТСХ с учетом основных физико-химических свойств соединения, позволяющие проводить скрининговую оценку процентного содержания рутина, а не суммы флавоноидов в пересчете на рутин, в исследуемых объектах, и которые могут быть использованы при стандартизации софоры японской бутонов (*Sophorae japonicae alabastra*) и гречихи посевной травы (*Fagopyri esculenti herba*).

2) Предложены и теоретически обоснованы оптимальные условия определения рутина в ЛРС методом ВЭТСХ: неподвижная фаза – стеклянные пластинки, покрытые силикагелем, НРТLC plates (reversed phase) RP-18 F 254 (MERCK, Германия) 5x10; оптимальный объем пробы – 3 мкл спиртового извлечения ЛРС; подвижная фаза – этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода; насыщение камеры парами элюента – 20 мин [46, 80]. Время элюирования варьирует от 18 до 20 мин.

3) Подобраны условия для количественного определения рутина в фармакопейных объектах методом ВЭТСХ. Процентное содержание рутина в гречихе травы составило $4,82 \pm 0,03$ %, в софоры бутонах – $6,16 \pm 0,01$ %. Таким образом, представленные объекты могут быть использованы как источники промышленного получения рутина.

4) Валидирована разработанная методика в соответствии с ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность, результаты валидации соответствуют требованиям нормативной документации [46]. Показатель Rf (коэффициент удерживания) для рутина составил 0,34. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил – 0,9979.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ РУТОЗИДА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Использование метода ТСХ в практике фармацевтического анализа в лекарственных формах ограничивается качественным определением действующих веществ. Однако использование ВЭТСХ позволяет провести количественное определение биологически активных веществ в лекарственных средствах.

5.1 Анализ субстанции рутозида

Рутозид (рутин) относится к производным флавана, в структуре рутина присутствует 2-фенилхроман (Рисунок 5.1).

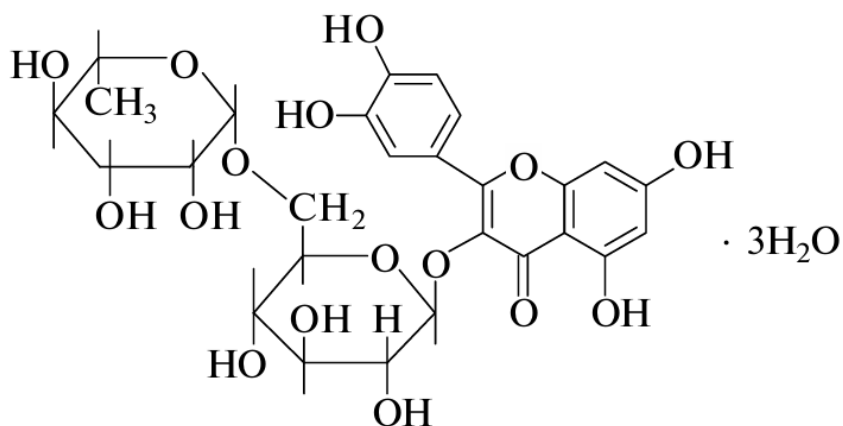


Рисунок 5.1 – Структурная формула рутина (3-Рутинозид кверцетина или 3-рамногликозил-3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонон)

Субстанция представляет собой зеленовато-желтый мелкокристаллический порошок, практически нерастворимый в воде и мало растворимый в спирте 95 %

[70]. Анализируемая субстанция соответствовала требованиям раздела «Описание» и «Растворимость» ГФ РФ XV издания, ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» [26].

5.1.1 Определение рутозида методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

5.1.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых веществ

По совокупности экспериментальных данных, описанных в предшествующих главах, были предложены и теоретически обоснованы оптимальные условия определения рутина методом ВЭТСХ: неподвижная фаза – стеклянные пластинки, покрытые силикагелем, НРТLC plates (reversed phase) RP-18 F 254 (MERCK, Германия) 5x10; оптимальный объем пробы – 3 мкл спиртового раствора рутозида; подвижная фаза – этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода (40:4,7:5,3); насыщение камеры парами элюента – 20 мин [80].

Для получения раствора СО и анализируемого спиртового раствора субстанцию и СО рутозида растворяли в спирте этиловом 95 % с помощью ультразвуковой бани по методике, описанной в разделе 2.4 настоящей работы [80]. Концентрация рутозида в полученном растворе – 0,05 %.

5.1.1.2 Идентификация и количественное определение рутозида методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Экспериментальная цель данной работы состояла в разработке и валидации простой и надежной процедуры ВЭТСХ для количественного определения рутозида в субстанции.

Нанесение образцов на ВЭТСХ-пластинки Silica gel 60 F254 (5×10 см) осуществлялось с помощью специального аппликатора Nanomat 4, диспенсера и универсального держателя. В ходе исследования выявлен оптимальный объем

пробы для анализа – 3 мкл. Расстояние между образцами было установлено 10 мм, расстояние от края пластины 15 мм; расстояние от нижнего края пластины составляло 25 мм. Перед началом элюирования пластинки обязательно просушивали потоком горячего воздуха в течение 30 сек. Насыщение камеры парами элюента составляло 20 мин. Время элюирования может варьировать от 14 до 16 мин., за это время фронт растворителя проходит 70 мм от начала пластины. После хроматографирования пластины просушивали для удаления ПФ в течение 5 минут.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводили на денситометре Vilver Quantum E5. Обнаружение рутозида возможно провести при длинах волн 254 нм и 365 нм. Для приведения единообразия методики, было использовано применение 365 нм (Рисунок 5.4). ПО BioVision было использовано для измерения интенсивности светопоглощения пятнами [46].

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 2 [46].

В результате перерасчета получено процентное содержание рутозида – 95 %. Результаты представлены в Таблице 5.7.

Образцы хроматограмм и детальное обсуждение выбора условий разделения представлено в разделе 5.1.3 настоящей работы.

5.1.1.3 Валидация

5.1.1.3.1 Методика

На основании серии проведенных испытаний была разработана методика идентификации и количественного определения рутозида методом ВЭТСХ:

Пластинка. HPTLC plates Silica gel 60 F254 (MERCK, Германия) 5x10.

Испытуемый раствор. Около 0,005 г (точная навеска) рутозида помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки,

перемешивают. При необходимости, содержимое растворяют с применением УЗ-бани в течение 1,5 мин.

Раствор стандартного образца рутина. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают. При необходимости, содержимое растворяют с применением УЗ-бани в течение 1,5 мин.

Подвижная фаза (ПФ). этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода 40:4,7:5,3.

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 3 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца рутина с помощью специального аппликатора. Расстояние между образцами должно быть 10 мм; расстояние от края пластины – 15 мм; расстояние от нижнего края пластины – 25 мм.

Пластинку с нанесенными пробами сушат потоком горячего воздуха в течение 30 сек, затем помещают в (предварительно насыщенную, в течение 20 мин) камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 70 мм от начала пластинки, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в течение 5 минут и просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм. Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводят на денситометре с установленной ПО для измерения интенсивности светопоглощения.

Результат. Идентификация. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению и окраске должна соответствовать зоне адсорбции рутина на хроматограмме раствора стандартного образца рутина; показатель R_f для рутина составляет 0,36.

Количественное определение. Проводят измерение интенсивности пятна на хроматограмме испытуемого раствора относительно пятна стандартного образца рутина. Содержание рутина в процентах (X) вычисляют по формуле (2):

$$X\% = \frac{Intx * Cco * P}{Intco} \quad (2)$$

где Int_x – интенсивность анализируемого объекта, %;

Int_{co} – интенсивность CO, %;

C_{co} – концентрация CO, %;

P – содержание основного вещества в CO, доли.

5.1.1.3.2 Результаты валидации

Разработанная методика были валидирована в соответствии с ГФ РФ XV, ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность [14, 21]. Методика характеризуется селективностью и воспроизводимостью, сочетает относительную простоту исследования с точностью [46].

Специфичность. Показатель R_f для рутина составил 0,36. Результаты сравнения анализируемых пятен по показателям: интенсивность, объем, вес пятен и площади пика представлены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Определение специфичности

Критерии пригодности	Полученное значение для CO	Полученные значения для анализируемого образца рутина	Соответствие КП
Интенсивность пятна	100	98,754	Соответствует
Объем пятна	54 951 783	53 874 853	Соответствует
Вес пятна	49 099	49 017	Соответствует
Площадь пика	1 400	1 400	Соответствует
Примечание: *КП – критерий приемлемости.			

Полученные результаты подтверждали специфичность методики количественного определения рутина.

Диапазон применения (аналитическая область) методики. Аналитическая область методики установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели (Рисунок 5.2).

Для разработанной методики аналитическая область находится в пределах от 0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг). Данные представлены в Таблице 5.2.

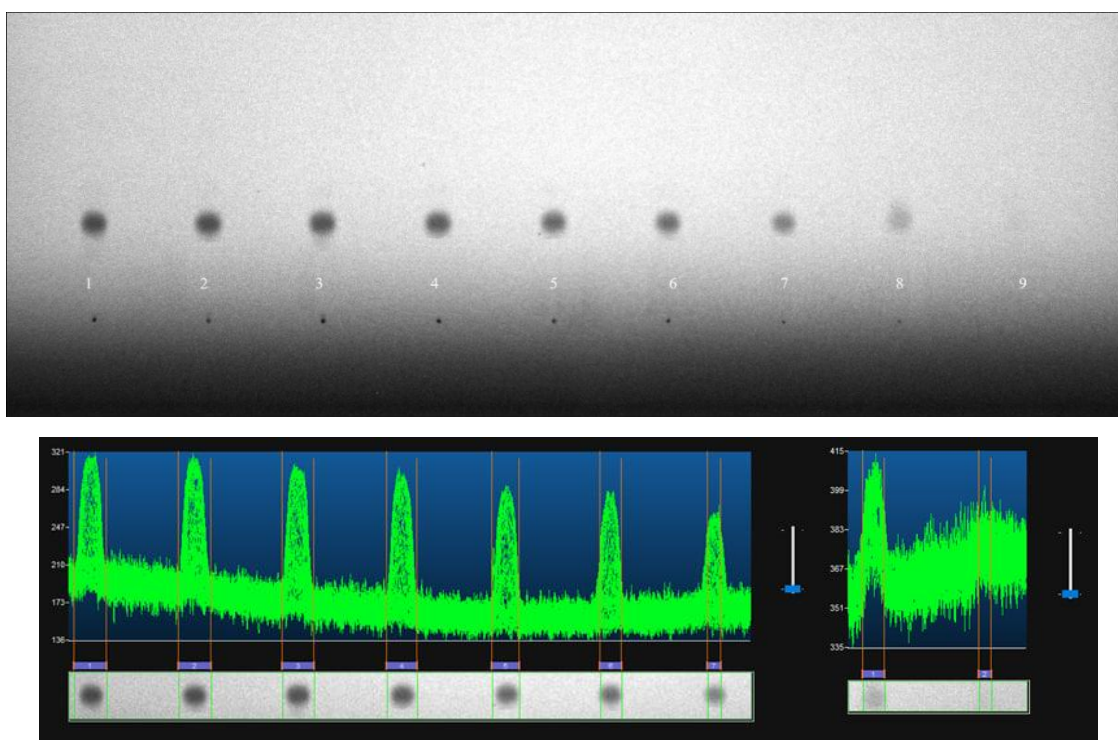


Рисунок 5.2 – Калибровочная хроматограмма с серией стандартных растворов (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 40:4,7:5,3 (v/v/v).

Нумерация пятен соответствует нумерации растворов в Таблице 5.3

Таблица 5.2 – Определение аналитической области методики

Номинальное значение определяемой аналитической характеристики	Диапазон применения методики в соответствии с ОФС	Диапазон применения методики в соответствии с практическим результатом	Соответствие КП
0,05 % (1,5 мкг)	0,04 % до 0,06 % (1,2 мкг до 1,8 мкг)	0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг)	Соответствует
Примечание: *КП – критерий приемлемости.			

Линейность. Линейность методики проверялась экспериментальным измерением аналитических сигналов. В рамках валидации проводили анализ калибровочных образцов (Рисунок 5.3), соответствующих калибровочным уровням, которые представлены в Таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Калибровочные уровни методики количественного определения рутина

№ раствора	Концентрация рутина в полученном растворе, %	Масса рутина, нанесенная на линию старта (в 3 мкл), мкг	Интенсивность, %
1	0,200	6,00	100
2	0,175	5,25	89,097
3	0,150	4,50	78,311
4	0,125	3,75	65,416
5	0,100	3,00	53,359
6	0,075	2,25	41,865
7	0,050	1,50	27,089
8	0,025	0,75	13,383
9	0,010	0,30	-

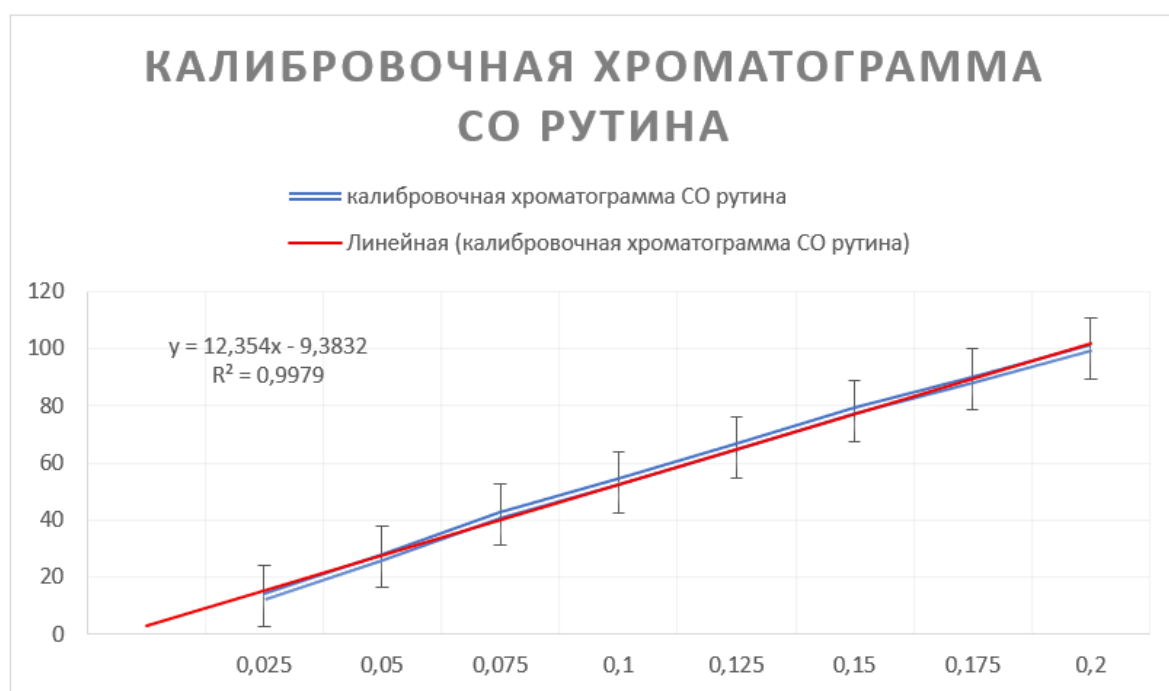


Рисунок 5.3 – График линейности рутина (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 40:4,7:5,3 (v/v/v))

Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил – 0,9979. Полученные результаты подтверждали линейность методики количественного определения рутина [87].

Правильность. Полученные результаты, приведенные в Таблице 5.4, подтверждали правильность методики количественного определения рутина.

Таблица 5.4 – Правильность методики количественного определения рутина

Линейная зависимость Номинальная концентрация рутина, %	Интенсивность, %	Фактическое содержание в образце, %	Среднее значение расчетного содержания, % (n = 3)	RSE, %	Соответствие правильности
0,200	100	0,190	0,190	-5	Соответствует
	100	0,190			
	100	0,190			
0,175	89,097	0,169	0,169	-3,4	Соответствует
	89,148	0,169			
	89,045	0,169			
0,150	78,311	0,149	0,149	-0,67	Соответствует
	78,716	0,149			
	78,017	0,148			
0,125	65,416	0,124	0,124	-0,8	Соответствует
	64,858	0,123			
	65,024	0,124			
0,100	53,359	0,101	0,100	0	Соответствует
	52,241	0,099			
	52,947	0,100			
0,075	41,865	0,079	0,079	0,05	Соответствует
	42,307	0,080			
	41,014	0,078			
0,050	27,089	0,051	0,051	2	Соответствует
	27,403	0,052			
	26,216	0,049			

Продолжение Таблицы 5.4

0,025	13,383	0,025	0,026	4	Соответствует
	13,910	0,026			
	13,629	0,026			
0,010	-	-	-	-	Не соответствует
	-	-			
	-	-			

Прецизионность. Повторяемость (сходимость) оценивалась по результатам шести определений концентраций для образцов со 100 % содержанием определяемого вещества.

Полученные результаты, представленные в Таблице 5.5, подтвердили прецизионность методики количественного определения рутина.

Таблица 5.5 – Прецизионность методики количественного определения рутина [46]

Концентрация раствора рутина, %	Vol. %	Среднее значение интенсивности, %	Стандартное отклонение, %	RSD, %	Соответствие прецизионности
Повторяемость (день 1)					
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	
0,025	98,619	98,484	0,707	0,719	Соответствует
	98,395				
	99,742				
	98,712				
	97,429				
	98,006				
0,05	98,789	98,184	0,502	0,514	Соответствует
	98,654				
	97,423				
	98,108				
	97,671				
	98,457				

Продолжение Таблицы 5.5

0,075	99,459	98,888	0,315	0,319	Соответствует
	98,964				
	98,758				
	99,018				
	98,461				
	98,667				
Внутрилабораторная прецизионность (день 2)					
		(n=12)	(n=12)	(n=12)	
0,025	98,689	98,361	0,560	0,569	Соответствует
	98,010				
	97,940				
	98,651				
	98,143				
	97,996				
0,05	97,309	98,563	0,768	0,779	Соответствует
	98,907				
	99,876				
	98,997				
	99,106				
	99,459				
0,075	98,476	98,613	0,411	0,417	Соответствует
	98,631				
	98,114				
	97,930				
	98,137				
	98,743				

Таким образом, проведенная валидация методики количественного определения рутина в субстанции методом ВЭТСХ показала, что методика удовлетворяет критериям приемлемости по параметрам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность [46].

5.1.2 Определение рутозида фармакопейными методами

Подлинность рутозида подтверждали в соответствии с методиками раздела «Идентификация» ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат»:

1. Результатом проведения Цианидиновой пробы было постепенное окрашивание раствора в красный цвет.

2. Методика определения рутозида методом ТСХ представлена в разделе 2.5 настоящей работы. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению и окраске соответствовала зоне адсорбции рутозида на хроматограмме раствора стандартного образца рутозида.

3. Идентификацию рутозида спектрофотометрическим методом проводили в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях». Удельное поглощение при максимуме поглощения (358 нм) составило 315 нм (безводное вещество).

Помимо представленной в фармакопейной статье реакции были проведены следующие качественные реакции:

1) Реакция на кислотные свойства: способность растворяться в разбавленных щелочах. 5 мг субстанции растворили в 5 мл 1 Н раствора натрия гидроксида. В результате образовался раствор желто-оранжевого цвета.

2) Реакция образования азокрасителя: 10 мг субстанции растворили в 1 мл 10 % раствора натрия гидроксида, прибавили 2-3 капли соли диазония. Соль диазония готовили по следующей методике: 0,5 г стрептоцида растворили в 2 мл хлороводородной кислоты разведенной, прибавили 1 мл 0,1М раствора натрия нитрита. В результате реакции образовался азокраситель темно-красного цвета.

3) Реакция на сахарный компонент с реактивом Фелинга, что позволяет отличить рутин от кверцетина (агликона): 1 г рутина кипятили со 100 мл 0,5 % раствора хлористоводородной кислоты, фильтровали. К 5 мл фильтрата прибавили 0,3 мл раствора натрия гидроксида и 3 мл реактива Фелинга. При кипячении образовался красный осадок оксида меди(II).

Количественное определение рутозида проводили в соответствии с методиками раздела «Количественное определение» ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» титриметрическим методом. Результаты анализа представлены в Таблице 5.6.

Таблица 5.6 – Количественное определение рутозида титриметрическим методом

Масса навески, г	Объем, ушедший на титрование, с учетом контрольного опыта, мл	Процентное содержание, %
0,2002	6,6	100,65
0,2000	6,5	99,22
0,2001	6,5	99,17
0,2002	6,5	99,12
0,2000	6,6	100,75

Процентное содержание рутозид титриметрическим методом составило 99,78 %, что соответствует требованиям нормативной документации.

5.1.3 Обсуждение результатов исследования субстанции рутозида

Используя подобранную смесь подвижной фазы, на стеклянных пластинках с силикагелем при УФ-365 нм детектировали светло-желтую флуоресцентную зону при $R_f = 0,36$, которая соответствует рутину (Рисунок 5.4). Хроматографические пластины, как правило, после элюирования обрабатывают детектирующим реагентом. В 3 главе настоящей работы описано об отсутствии необходимости проявлять рутин.

Программа анализа BioVision была использована для количественной оценки и сравнения площади каждого пятна с захваченными изображениями хроматограммы. С помощью ПО BioVision был проведен расчет концентрации (в пикселях) полос (Таблица 5.7).

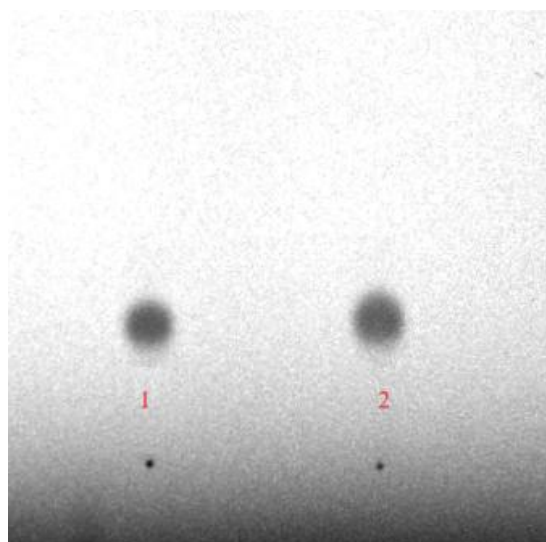


Рисунок 5.4 – Хроматограмма СО рутина (1) и субстанции рутозида (2)

Таблица 5.7 – Процентное содержание субстанции рутозид методом ВЭТСХ

Образец	Интенсивность рутина, %	Концентрация рутина, % (мг)
СО рутина	100	0,0500 (50,00 мг)
АФС рутозид	99,96	0,0475 (47,50 ± 0,18 мг)

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 2.

В результате перерасчета получено процентное содержание рутозида с помощью метода ВЭТСХ – 95 %, что соответствует нормам, заявленным в ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат». Согласно фармакопейной статье, вещество должно содержать не менее 95,0 % и не более 101,0 % рутозида в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей.

5.2 Анализ таблеток, содержащих рутозид

5.2.1 Определение действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Хроматографические методы анализа широко используются в контроле качества многокомпонентных лекарственных препаратов. Как следствие необходимо существование валидированной методики для разделения действующих веществ и их последующего анализа. ТСХ является одним из доступных методов разделения и идентификации веществ, однако для количественного определения применения основ данного метода является недостаточным. ВЭТСХ способствует не только разделению веществ и их идентификации, но и проведению количественного анализа.

5.2.1.1 Оптимальные условия разделения и анализа исследуемых веществ

Экспериментальным путем подобрана оптимальная методика растворения таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид» в спирте 95 % с применением УЗ-бани.

Измельченную таблетку «Аскорбиновая кислота + Рутозид», массой 0,3298г, содержащий в своем составе 0,05 г рутозида и 0,05 г аскорбиновой кислоты, растворяли по принципу, изложенному в ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» по методике для веществ с неизвестной растворимостью [23]. Измельченную таблетку растворяли последовательно в 10, 20, 50 и 100 мл этилового спирта 95 % до растворения. Полное растворение наблюдалось при нагревании раствора в течение 2-3 минут на плите TLC Plate Heater III (Camag) при температуре 70°C.

Таким образом была выявлена оптимальная методика получения спиртового раствора таблеток «Аскорбиновая кислота + Рутозид»: точную навеску (0,330 г) измельченных таблеток растворяли в 100 мл этилового спирта 95 % с применением

УЗ-бани, при нагревании в течение 2-3 минут на плите TLC Plate Heater III (Camag). Концентрация рутозида в полученном растворе составляет 0,05 %.

Растворы СО рутина и аскорбиновой кислоты готовили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.4 настоящей работы. Концентрация рутина и аскорбиновой кислоты в полученных растворах составляет 0,05 %.

В результате эксперимента было выявлено наиболее оптимальное условие разделения и анализа лекарственного препарата «Аскорбиновая кислота + Рутозид». Пластину хроматографировали в системе растворителей с этилацетатом: муравьиной кислотой безводной: воды в соотношении 40: 4,7: 5,3. Представленная ПФ соответствует условиям хроматографирования субстанции рутозида.

5.2.1.2 Идентификация и количественное определение действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид»

Образцы, объемом 3 мкл наносили на ВЭТСХ-пластинки Silica gel 60 F254 (5×10 см) с помощью специального аппликатора Nanomat 4, диспенсера и универсального держателя. Расстояние между образцами было установлено 10 мм, расстояние от края пластины 15 мм; расстояние от нижнего края пластины составляло 25 мм. Перед началом элюирования пластинки обязательно просушивали потоком горячего воздуха в течение 30 сек. Насыщение камеры парами элюента – 20 мин. Время элюирования может варьировать от 12 до 20 мин., за это время фронт растворителя проходит 70 мм от начала пластины. После хроматографирования пластины просушивали для удаления ПФ в течение 5 минут.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводили на денситометре Vilver Quantum E5. Обнаружение рутозида проводили при длине волны 365 нм (Рисунок 5.5). Программное обеспечение BioVision было использовано для измерения интенсивности светопоглощения пятнами. Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 2 в пересчете на среднюю массу таблетки [46].

Также идентификация рутозида и аскорбиновой кислоты проводилась согласно ВФС 42-2577-95 *Tabulettae "Ascorutinum"* Таблетки «Аскорутин» (взамен ФС 42-2222-89) химическим методом по следующим методикам: 0,2 г порошка растертых таблеток взбалтывали с 8 мл воды и фильтровали. К одной части фильтрата прибавили 1 мл кислоты фосфорно-молибденовой раствора 5 %, спиртового. В результате наблюдалось синее окрашивание (аскорбиновая кислота).

К 0,1 г порошка растертых таблеток прибавили 5 мл 95 % этанола, перемешали, прибавили 5 капель кислоты хлористоводородной концентрированной и 0,09 г магниевой стружки. В результате наблюдалось появление малинового окрашивания (рутозид).

5.2.1.3 Валидация

5.2.1.3.1 Методика

На основании серии проведенных испытаний была разработана методика идентификации и количественного определения рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» методом ВЭТСХ:

Пластика. НPTLC plates Silica gel 60 F254 (MERCCK, Германия) 5x10.

Испытуемый раствор. Около 0,330 г (точная навеска) измельченных таблеток растворяют в 100 мл этилового спирта 95 % с применением УЗ-бани, при нагревании в течение 2-3 минут [53].

Раствор стандартного образца рутина. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают. При необходимости, содержимое растворяют с применением УЗ-бани в течение 1,5 мин.

Раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты. Около 0,005 г (точная навеска) СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют спирт 95 % до метки, перемешивают.

Подвижная фаза (ПФ). этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода 40:4,7:5,3.

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 3 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца рутина с помощью специального аппликатора. Расстояние между образцами должно быть 10 мм; расстояние от края пластины – 15 мм; расстояние от нижнего края пластины – 25 мм.

Пластинку с нанесенными пробами сушат потоком горячего воздуха в течение 30 сек, затем помещают в (предварительно насыщенную, в течение 20 мин) камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 70 мм от начала пластинки, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в течение 5 минут и просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм. Цифровизацию пластин и получение хроматограмм проводят на денситометре с установленной ПО для измерения интенсивности светопоглощения.

Результат. Идентификация. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению и окраске должна соответствовать зоне адсорбции рутина на хроматограмме раствора стандартного образца рутина; показатель R_f для рутина составляет 0,36, показатель R_f для аскорбиновой кислоты составляет 0,83.

Количественное определение. Проводят измерение интенсивности пятна на хроматограмме испытуемого раствора относительно пятна стандартного образца рутина / аскорбиновой кислоты. Содержание рутина / аскорбиновой кислоты в процентах (X) вычисляют по формуле (2) в пересчете на среднюю массу таблетки.

5.2.1.3.2 Результаты валидации

Разработанная методика была валидирована в соответствии с ГФ РФ XV, ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям

специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность. Методика характеризуется селективностью и воспроизводимостью, сочетает относительную простоту исследования с точностью [46].

Такие характеристики как специфичность, аналитическая область, линейность соответствуют условиям и результатам валидации методики на субстанцию рутозида, описанным в разделе 5.1.1.3.2 настоящей работы.

Для определения правильности методики были приготовлены матричные смеси с тремя разными концентрациями (Таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Методика приготовления матричных смесей

Компонент	Масса вещества в смеси 1, г	Масса вещества в смеси 2, г	Масса вещества в смеси 3, г
Рутозид	0,075	0,05	0,025
Аскорбиновая кислота	0,05	0,05	0,05
Вспомогательные вещества	До получения массой 0,33 г	До получения массой 0,33 г	До получения массой 0,33 г

Общая масса матричной смеси соответствовала требованиям ВФС 42-2577-95 *Tabulettae "Ascorutinum"* Таблетки «Аскорутин» (взамен ФС 42-2222-89). Полученные смеси растворяли в соответствии с методикой в пункте 4.4.1 настоящей работы. Измерения проводили относительно СО рутина 0,05 % [46].

Полученные результаты, приведенные в Таблице 5.9, подтверждали правильность методики количественного определения рутина.

Повторяемость (сходимость) оценивалась по результатам трех определений концентраций для образцов со 100 % содержанием определяемого вещества. Для каждой матричной смеси были приготовлены растворы СО рутина с соответствующим его содержанием.

Таблица 5.9 – Правильность методики количественного определения рутина

Номинальная концентрация рутина, %	Интенсивность, %	Фактическое содержание в образце, %	Среднее значение расчетного содержания, % (n = 3)	RSE, %	Соответствие правильности
СО рутина 0,05 %	100	0,0475	0,0475	5	Соответствует
Матр. см. 1	150,604	0,072	0,072	-4	Соответствует
	149,964	0,071			
	150,862	0,072			
Матр. см. 2	99,896	0,048	0,048	-4	Соответствует
	99,134	0,047			
	99,903	0,048			
Матр. см. 3	53,234	0,025	0,024	-4	Соответствует
	50,934	0,024			
	51,386	0,024			

Примечание: *Матр. см. – матричная смесь.

Таблица 5.10 – Прецизионность методики количественного определения рутина

Концентрация раствора рутина, %	Vol. %	Среднее значение интенсивности, %	Стандартное отклонение, %	RSD, %	Соответствие прецизионности
Повторяемость (день 1)					
		(n=3)	(n=3)	(n=3)	
СО рутина 0,075 %	100				
Матр. см. 1	97,261	96,826	0,445	0,459	Соответствует
	96,215				
	97,004				
СО рутина 0,050 %	100				
Матр. см. 2	98,174	98,547	0,342	0,347	Соответствует
	98,467				
	99,001				
СО рутина 0,025 %	100				
Матр. см. 3	97,416	97,039	0,306	0,315	Соответствует
	96,667				
	97,034				

Продолжение Таблицы 5.10

Внутрилабораторная прецизионность (день 2)					
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	
СО рутина 0,075 %	100				
Матр. см. 1	98,034	97,358	0,629	0,646	Соответствует
	97,991				
	97,643				
СО рутина 0,050 %	100				
Матр. см. 2	97,780	98,145	0,636	0,648	Соответствует
	98,467				
	96,982				
СО рутина 0,025 %	100				
Матр. см. 3	98,406	97,294	0,659	0,677	Соответствует
	96,476				
	97,765				

Полученные результаты, представленные в Таблице 5.10, подтверждали прецизионность методики количественного определения рутина.

Таким образом, проведенная валидация методики количественного определения рутина в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» методом ВЭТСХ показала, что методика удовлетворяет критериям приемлемости по параметрам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность.

5.2.2 Определение действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» фармакопейными методами

Идентификацию действующих веществ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили в соответствии с нормативной документацией на препарат. Методики описаны в разделе 2.5 настоящей работы. Результатом идентификации рутозида было появление малинового окрашивания.

В результате идентификации аскорбиновой кислоты наблюдали появление синего окрашивания.

В соответствии с нормативной документацией на препарат идентификацию и количественное определение рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили спектрофотометрическим методом. УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора СО рутозида имели максимумы при одной и той же длине волны – при 257 ± 2 нм и 358 ± 2 нм [46].

Количественное определение аскорбиновой кислоты в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» проводили методом йодатометрического титрования. Содержание аскорбиновой кислоты составило 47 мг считая на среднюю массу таблетки, что соответствовало требованиям НД.

5.2.3 Обсуждение результатов исследования анализируемых таблеток, содержащих рутозид

Используя подобранную смесь подвижной фазы, на стеклянных пластинках с силикагелем при УФ-365 нм детектировали светло-желтую флуоресцентную зону при $R_f = 0,36$, которая соответствует рутину (Рисунок 5.5).

Хроматографические пластины, как правило, после элюирования обрабатывают детектирующим реагентом. В пункте 4.1.6 настоящей работы описано об отсутствии необходимости проявлять рутозид. Согласно исследованиям [5, 33] для проявления аскорбиновой кислоты используют детектирующие растворы, представленные в Таблице 5.11.

Таблица 5.11 – Характеристика основных детектирующих растворов, используемых для обнаружения аскорбиновой кислоты методом ТСХ

Детектирующий раствор	Окрашивание зон на хроматограммах
2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия раствор 0,2 %, спиртовой	белое пятно

Продолжение Таблицы 5.11

фосфорно-молибденовой кислоты раствор 5 %, спиртовой	синее пятно на белом фоне
0.01 М раствор нитрата серебра	темно-серое на белом фоне

Однако, аскорбиновая кислота флуоресцирует при УФ (365 нм) без обработки детектирующим реагентом. Таким образом, необходимости его использовать нет.

На хроматограмме раствора СО рутина обнаруживается зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета (Рисунок 5.5). На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются две зоны адсорбции: одна зона желтого цвета, на уровне СО рутина (в видимом свете), вторая зона выше (УФ 365 нм), что соответствует аскорбиновой кислоте ($R_f = 0,83$).

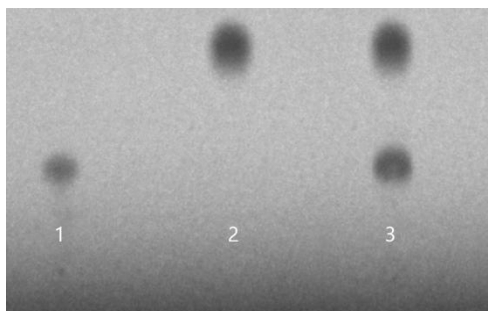


Рисунок 5.5 – Хроматограмма СО рутина (1), СО аскорбиновой кислоты (2) и рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» (3)

Для количественной оценки и сравнения площади пятен была использована программа анализа BioVision. С помощью ПО BioVision был проведен расчет концентрации (в пикселях) полос для рутозида и аскорбиновой кислоты (Таблица 5.12).

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 2 в пересчете на среднюю массу таблетки.

Таблица 5.12 – Процентное содержание рутозида и аскорбиновой кислоты в таблетках методом ВЭТСХ [46]

Образец	Интенсивность, %	Концентрация, % (мг)
СО рутина	100	0,0500 (50,0 мг)
Рутозид в ЛС	98,455	0,04724 (47,24 ± 0,91 мг)
СО аскорбиновой кислоты	100	0,0500 (50,0 мг)
Аскорбиновая кислота в ЛС	99,548	0,04729 (47,29 ± 0,97 мг)

В результате перерасчета полученное процентное содержание СО рутина с помощью метода ВЭТСХ составило 100 %, рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» – 0,04724 %.

В соответствии с нормативной документацией на препарат содержание рутозида должно быть от 46,25 до 53,75 мг, считая на среднюю массу таблетки, по результатам исследования получаем $47,24 \pm 0,91$ мг рутозида, что соответствует требованиям.

5.3 Выводы к Главе 5

1) Разработана методика количественного определения субстанции рутозида методом ВЭТСХ, применяемая также к анализу рутозида в лекарственном средстве таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид». Содержание рутозида в таблетках – $47,24 \pm 0,91$ мг. Результаты соответствуют требованиям НД.

2) Разработанная методика анализа рутина методом ВЭТСХ в лекарственном средстве валидирована в соответствии с ГФ РФ XV издания, ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность [46]. Показатель R_f (коэффициент удерживания) для рутина составил 0,36. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил – 0,9979. Результаты валидации соответствуют требованиям нормативной документации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЭТСХ является перспективным и многофункциональным аналитическим инструментом для обеспечения качества и подлинности ЛРС и фитопрепаратов, сочетая в себе простоту, экономичность, высокую пропускную способность и способность работать со сложными растительными объектами, предоставляя при этом надежные и документированные результаты. Используя один из современных физико-химических методов анализа, разработаны методики идентификации и количественного определения рутина в лекарственных средствах методом ВЭТСХ.

ВЫВОДЫ

1) Изучено современное состояние и перспективы применения ВЭТСХ в контроле качества лекарственных средств в РФ и зарубежом. В настоящее время метод ВЭТСХ широко используется ведущими лабораториями мира для анализа ЛРС и лекарственных растительных препаратов. ВЭТСХ является важным инструментом для анализа однокомпонентных и многокомпонентных объектов, в том числе фитопрепаратов, позволяющим работать с широким спектром соединений с высокой точностью и экономической эффективностью, способствующий проведению анализа одновременно по нескольким показателям.

2) Разработана методика качественного и количественного определения рутина методом ВЭТСХ на примере фармакопейного ЛРС (фиалки трава, *Violae herba*). Подобраны оптимальные хроматографические условия: состав подвижной фазы, объем анализируемого раствора, условия детектирования, позволяющие однозначно определить рутин в ЛРС среди всей суммы флавоноидов. Процентное содержание рутина в фиалке траве – $3,08 \pm 0,01\%$. Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом в том же извлечении составило 3,43%. Полученные данные показывают, что рутин является основным флавоноидом в представленном ЛРС.

3) Валидирована методика определения рутина в ЛРС в соответствии с ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность. Показатель R_f (коэффициент удерживания) для рутина составил 0,4. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой – 0,9977. Полученные результаты валидации показывают возможность рекомендовать методику для ее включения в ФС «Фиалки трава».

4) Проведен анализ определения рутина в растительных объектах с помощью разработанной методики ВЭТСХ. Разработанная методика была адаптирована для определения рутина в фитообъектах, являющихся источником рутина (гречихи посевная трава, *Herba Fagopyri esculenti* и софоры японской бутоны, *Alabastra*

Sophorae japonicae). Процентное содержание рутина в гречихе траве – $4,82 \pm 0,03$ %, в софоре бутонах – $6,16 \pm 0,01$ %. Полученные результаты валидации показывают возможность рекомендовать методику для стандартизации описанных объектов, а полученное содержание показывает перспективность их применения в качестве получения рутина.

5) Разработанная методика была успешно применена для количественного определения рутина в многокомпонентном препарате, содержащем 50 мг аскорбиновой кислоты и 50 мг рутозида. В результате исследования было получено содержание рутина – $47,24 \pm 0,91$ мг, что соответствует требованиям нормативной документации. Результаты количественного определения субстанции рутозида методом ВЭТСХ соответствует требованиям ГФ РФ XV изд., ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» и ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Полученные результаты показывают легкость идентификации рутозида в многокомпонентных смесях, другие вещества не мешают разделению.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Расширение применения методов контроля качества в анализе лекарственных средств является актуальной проблемой для решения задач фармацевтической промышленности. В рамках диссертационной работы были изучены возможности применения ВЭТСХ в контроле качества лекарственных средств, содержащих рутин, и в растительных источниках его получения. Подобраны оптимальные условия хроматографирования. Разработаны методики идентификации и количественного определения рутина в лекарственных средствах и в растительных источниках его получения. Полученные результаты могут использоваться для стандартизации гречихи посевной трава (*Herba Fagopyri esculenti*) и софоры японской бутоны, (*Alabastra Sophorae japonicae*) – являющихся основными источниками получения рутина.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Предложенный подход, апробированный для внедрения ВЭТСХ в фармакопейный анализ рутин-содержащих лекарственных средств, рекомендуется к применению при решении сопоставимых задач контроля качества иных лекарственных препаратов растительного происхождения и ЛРС, содержащих другие группы БАВ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФС – активная фармацевтическая субстанция
- БАВ – биологически активное вещество
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
- ЕАЭС – Евразийский экономический союз
- КП – критерий приемлемости
- Матр. см. – матричная смесь
- ЛРС – лекарственное растительное сырье
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛС – лекарственное средство
- ПО – программное обеспечение
- ПФ – подвижная фаза
- СО – стандартный образец
- СФМ – спектрофотометрия
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УЗ – ультразвуковая

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азимов, А. Краткая история химии: развитие идей и представлений в химии / А. Азимов. – Санкт-Петербург : Амфора, 2000. – Текст : непосредственный.
2. Айвазов, Б. В. Введение в хроматографию / Б. В. Айвазов. – Москва : Высшая школа, 1983. – Текст : непосредственный.
3. Анализ воздействия на организм с помощью тонкослойной хроматографии в продуктах питания / И. Кабесудо, М. О. Салазар, И. А. Рамалло, Р.Л.Е. Фурлан // Food Chem. – 2022. – Т. 390. – С. 132937. – DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132937.
4. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В.В. Бражников, С.А. Волков [и др.]. – Москва: Химия, 1993. – 463 с.
5. Анисимова, М. М. Качественный и количественный анализ флавоноидов травы гречихи посевной / М. М. Анисимова, В. А. Куркин, В. Н. Ежков // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – Т. 12. – № 1-8. – С. 2011-2014. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kachestvennyy-i-kolichestvennyy-analiz-flavonoidov-travy-grechih-posevnoy> (дата обращения: 01.02.2025).
6. Анисимова, М. М. Фармакогностическое исследование травы гречихи посевной : *Fagopyrum sagittatum* Gilib : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Анисимова Мария Михайловна ; Самарский государственный медицинский университет. – Самара, 2011. – 166 с. – Текст : непосредственный.
7. Антонова, С. В. Количественный анализ культуральных жидкостей штаммов-продуцентов промышленных антибиотиков различных классов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии : специальность 05.11.11 «Хроматография и хроматографические приборы» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Антонова Светлана Владимировна ; Ин-т физ. химии и электрохимии РАН им. А.Н. Фрумкина. – Москва, 2009. – 161 с. – Текст : непосредственный.

8. Ассоциация HPTLC : официальный сайт. Атлас ВЭТСХ. Международная ассоциация по развитию высокоэффективной тонкослойной хроматографии. – Текст : электронный. – URL: <https://www.hptlc-association.org/atlas/hptlc-atlas.cfm?atlasCommand=plant&uuid=WSK6770M> (дата обращения: 04.04.2025).
9. Бадзюк, И. Л. Возможности применения метода тонкослойной хроматографии в судебно-экспертных исследованиях следов моторного масла / И. Л. Бадзюк // Право и управление. – 2023. – №7. – С. 282-285. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vozmozhnosti-primeneniya-metoda-tonkosloynoy-hromatografii-v-sudebno-ekspertnyh-issledovaniyah-sledov-motornogo-masla> (дата обращения: 30.11.2024)
10. Безъязычная, А. А. Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Безъязычная Антонина Александровна ; ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ. – Курск, 2019 – 196 с.
11. Березкин, В. Г. О вкладе Н.А. Измайлова и М.С. Шрайбер в развитие тонкослойной хроматографии / В. Г. Березкин // ЖАХ. – 2008. – Т. 63. – № 4. – С. 438-443.
12. Березкин, В. Г. Применение нового варианта капиллярной тонкослойной хроматографии для анализа антибиотиков группы тетрациклина / В. Г. Березкин, Л. А. Онучак, Е. Н. Евтюгина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. – № 4. – С. 570-576.
13. Боков, Д. О. Тонкослойная хроматография в анализе амариллисовых алкалоидов / Д. О. Боков, И. А. Самылина // Фармация. – 2016. – Т. 65. – № 7. – С. 8-12.
14. Валидация в производстве лекарственных средств. Учебное пособие / В. В. Береговых, Н. В. Пятигорская, В. В. Беляев [и др.]. – Москва: Издательский дом «Русский Врач», 2010. – 286 с. – ISBN 978-5-7724-0146-0.

15. Виноградова, Н.И. Естественнонаучные методы судебно-экспертных исследований: Курс лекций / Н.И. Виноградова, Е.А. Матвиенко. – Москва: Щит-М, 2013. – 416 с.
16. ВФС 42-2577-95. Таблетки «Аскорутин»; Государственная фармакопея СССР.
17. ВФС 42-341-74. «Бутоны софоры японской»; Европейская фармакопея.
18. Высокоэффективная тонкослойная хроматография при анализе тритерпеновых сапонинов *Gynostemma pentaphyllum* / А. А. Низамова, Э. Х. Галиахметова, Н. В. Кудашкина [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2021. – Т. 16. – №5 (95). – С. 21-26. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vysokoeffektivnaya-tonkosloynaya-hromatografiya-pri-analize-triterpenovyh-saponinov-gynostemma-pentaphyllum> (дата обращения: 17.12.2024).
19. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. №749. – Москва, 2018.
20. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. №749. – Москва, 2018. – Том IV, ФС.2.5.0044.15. Фиалки трава. – Текст : непосредственный.
21. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV издательство. – ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик».
22. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023.
23. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – ОФС.1.2.1.0005. Растворимость. – Текст : непосредственный.
24. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – ОФС.1.2.1.2.0003. Тонкослойная хроматография. – Текст : непосредственный.

25. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – ФС.2.1.0089. Дексаметазон. – Текст : непосредственный.
26. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – ФС.2.1.0175. Рутозид тригидрат. – Текст : непосредственный.
27. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV изд.: утверждена приказом Министерства здравоохранения 20 июля 2023 г. № 377. – Москва, 2023. – ФС.2.1.0680 Прогестерон. – Текст : непосредственный.
28. Гурковская, Е. А. Тонкослойная хроматография: Прошлое! Настоящее. Будущее? / Е.А. Гурковская, И.И. Малахова, В.Д. Красиков // Лаборатория и производство. – 2023. – №3 (25). – С. 44-52.
29. Долгоносов, А. М. Колоночная аналитическая хроматография: практика, теория, моделирование / А. М. Долгоносов, О. Б. Рудаков, А. Г. Прудковский. – Изд. 2-е, испр. – Санкт-Петербург : Лань, 2015. – 468 с. – ISBN 978-5-8114-1870-1.
30. Европейская Фармакопея: публикуется в соответствии с Конвенцией о разработке Европейской Фармакопеи. – 11-е изд.
31. Европейская Фармакопея: публикуется в соответствии с Конвенцией о разработке Европейской Фармакопеи. – 11-е изд. : Рутозид тригидрат. – Текст : электронный. – URL: <https://www.edqm.eu/en/> (дата обращения : 04.04.2025 г.).
32. Европейская Фармакопея: публикуется в соответствии с Конвенцией о разработке Европейской Фармакопеи. – 11-е изд. : 2.8.25. High-performance thin-layer chromatography of herbal drugs and herbal drug preparations. – Текст : электронный. – URL: <https://www.edqm.eu/en/> (дата обращения : 04.04.2025 г.).
33. Европейская Фармакопея: публикуется в соответствии с Конвенцией о разработке Европейской Фармакопеи. – 11-е изд. : WILD PANSY (FLOWERING AERIAL PARTS) *Violae herba cum flore* 01/2008:1855. – Текст : электронный. – URL: <https://www.edqm.eu/en/> (дата обращения : 04.04.2025 г.).

34. Естественно-научные методы и средства судебно-экспертных исследований / Д. В. Кайргалиев, И. Н. Мельников, Д. В. Васильев [и др.]; под ред. Г.К. Лобачевой. – Краснослободск: ИП Головченко Е. А., 2014. – 152 с.
35. Жумагазеева, А. Ж. Разработка технологии сухого экстракта с биологически активными веществами гинкго билоба и софоры японской / А.Ж. Жумагазеева, А.Б. Легостева // Евразийский Союз Ученых. Серия:медицинские, биологические и химические науки.– 2022. – № 5(98). – С. 3-8. – URL: <https://bio-med.euroasia-science.ru/index.php/Euroasia/article/view/825>.
36. Здорник, А. Контроль качества растительных препаратов промышленного и аптечного производства с использованием системы ВЭТСХ / А. Здорник, Е. Хохлова // Фармацевтическая отрасль. – 2016. – № 6 (59). – С. 82-87.
37. Ильина, М. Б. Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Ильина Маргарита Борисовна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2025. – 150 с.
38. Кабиров, Г. Ф. Тонкослойная хроматография – экспресс метод анализа химических соединений / Г. Ф. Кабиров, Р. Г. Кадырова, Р. Р. Муллахметов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 205. – С. 88-94.
39. Кадырова, Р. Г. Тонкослойная хроматография. Идентификация и разделение углеводов, витаминов и токсичных соединений: монография / Р. Г. Кадырова. – Казань: Казанский государственный энергетический университет, 2010. – 96 с.
40. Карташова, М. Е. Фармакогностическое исследование ноней русской и перспективы её применения в медицине : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Карташова Марина Елвардовна ; ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Новосибирск, 2025. – 165 с.

41. Кахраманова, С. Д. Изучение состава биологически активных соединений грудного сбора № 1 и лекарственного растительного препарата на его основе : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Кахраманова Сабина Джейхуновна; Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). – Москва, 2024. – 155 с.
42. Кобахидзе, Т. И. Высокоэффективная тонкослойная хроматография как перспективный метод в контроле качества лекарственного растительного сырья / Т. И. Кобахидзе, Г. В. Раменская, В. И. Гегечкори // Вестник Южно-Казахстанской Медицинской Академии. – 2020. – Т. IV. – №4 (91). – С. 157.
43. Кобахидзе, Т. И. ВЭТСХ – перспективный метод количественного определения в фармацевтическом анализе / Т. И. Кобахидзе, М. В. Белова, С. П. Дементьев // Естественные и технические науки. – 2024. – № 2(189). – С. 116-121.
44. Кобахидзе, Т. И. Количественное определение рутина в траве фиалки методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / Т. И. Кобахидзе, Г. В. Раменская // Биологические науки: традиции, достижения, инновации : Сборник материалов I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения профессора К.А. Кузьминой, Саратов, 22 марта 2023 года / Редколлегия : Н.А. Дурнова, Н.В. Полуконова, М.А. Березуцкий, А.М. Мыльников, А.С. Федонников. – Саратов: Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского, 2023. – С. 65-66.
45. Количественное определение рутина в флавоноид-содержащем растительном сырье методом ВЭТСХ / Т. И. Кобахидзе, С. Агатонович-Куштрин, В. И. Гегечкори [и др.] // Фармация. – 2024. – Т. 73. – № 2. – С. 13-17. – DOI: 10.29296/25419218-2024-02-02.
46. Количественное определения рутина методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии в контроле качества лекарственных средств / Т. И. Кобахидзе, С. Агатонович-Куштрин, С. П. Дементьев, Д. В. Чугаев, М. В. Белова // Естественные и технические науки. – 2025. – № 2 (201). – С. 118-125.

47. Количественное определение рутина методом хроматографии в тонком слое сорбента / О.В. Тринеева, И.И. Сафонова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48. – № 2. – С. 48-52.
48. Куркин, В. А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств (обзор) / В. А. Куркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – № 4. – С. 27-41.
49. Куркин, В. А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений / В. А. Куркин // Фармация. – 2002. – Т. 50. – № 2. – С. 8-16.
50. Куркина, А. В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А. В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
51. Макарова, М. Н. Молекулярная биология флавоноидов (химия, биохимия, фармакология): руководство для врачей / М. Н. Макарова, В. Г. Макаров. – Санкт-Петербург, 2010. – 428 с.
52. Малахова, И. И. Количественная высокоэффективная тонкослойная хроматография аминокислот : специальность 05.11.11 «Хроматография и хроматографические приборы» : диссертация ... кандидата химических наук / Малахова Ирина Ивановна; Институт физической химии РАН. – Санкт-Петербург, 2003. – 184 с.
53. Матвиенко, У. А. Сравнительный фармакогностический анализ и изучение фармакологической активности некоторых видов рода астрагал (*Astragalus* L.) : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Матвиенко Ульяна Андреевна; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Саратов, 2024. – 203 с.
54. Методы анализа загрязнений воздуха / Ю. С. Другов, А. Б. Беликов, Г. А. Дьякова, В. М. Тульчинский. – Москва: Химия, 1984. – 384 с.
55. Методы и средства судебно-экспертных исследований / А. А. Курин, Д. В. Кайргалиев, А. В. Кочубей [и др.]. – Волгоград : Волгоградская академия

Министерства внутренних дел Российской Федерации, 2011. – 240 с. – ISBN 978-5-7899-0803-7.

56. Муравьева, Д. А. Фармакогнозия: учебник / Д. А. Муравьева, И. А. Самылина, Г. П. Яковлев. – Москва: Медицина, 2002. – 656 с.

57. Новый метод тонкослойной хроматографии с управляемой газовой фазой / Е. Г. Сумина, С. Н. Штыков, В. Г. Березкин [и др.] // ЖАХ. – 2009. – Т. 64. – № 12. – С. 1256-1264.

58. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. – Санкт-Петербург: НПО «Мир и семья», 2003. – 984 с.

59. Определение аминокислотного состава микробных матов водных экосистем Байкальского региона с помощью тонкослойной хроматографии / О. М. Калашникова, Е. Н. Шаповалова, Д. Д. Бархутова [и др.] // Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. – 2004. – Т. 45. – № 6. – С. 393-398.

60. Определение а-токоферола и эргокальцеферола методом тонкослойной хроматографии / Е. В. Бородина, Т. А. Китаева, Е. Ф. Сафонова [и др.] // ЖАХ. – 2007. – Т. 62. – № 11. – С. 1181-1185.

61. Определение флавоноидов и исследование влияния условий хранения на их содержание в плодах облепихи методом ТСХ / О. В. Тринеева, И. И. Сафонова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12. – № 5. – С. 806-813.

62. Оценка противовоспалительного и антиоксидантного действия супрамолекулярного комплекса рутина / К. Р. Баратов, Г. Г. Рахмонова, Л. У. Махмудов [и др.]. // *Universum: химия и биология* : электронный научный журнал. – 2020. – № 9(75). – URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/10681> (дата обращения: 01.12.2024).

63. Патент RU 2101705 С1 Российская Федерация, МПК 6G01 № 33/50. Способ определения галактозы в сыворотке крови : № 95100537/14 : заявл. 12.01.1995 : опубл. 10.01.1998 / Кадырова Р. Г., Зухрабов М. Г.

64. Патент RU 2469316 С1 Российская Федерация, МКП G01N30/92. Способ количественного определения рутина методом тонкослойной хроматографии : №

2011118413/28 : заявл. 06.05.2011 : опубл. 10.12.2012 / Чечета О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И., Сафонова И. И.; заявитель и патентообладатель: ГБОУ ВПО «ВГУ». – Бюл. №34.

65. Патент RU 2505307 C1 Российская Федерация, МПК А61К 36/70 (2006.01). Способ получения рутина : № 2012122119/15 : заявл. 29.05.2012 : опубл. 27.01.2014 / Павловская Н. Е., Гнеушева И. А., Полехина Н. Н., Солохина И. Ю., Горькова И. В.. – Текст : электронный. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2505307C1/ru> (дата обращения : 04.04.2025 г.).

66. Применение метода ВЭТСХ-денситометрии в количественном определении суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого / И. М. Моргунов, Н. П. Антонова, Е. П. Шефер, С. С. Прохватилова, Т. А. Голомазова // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – № 13(2). – С. 173-183. – DOI: 10.30895/1991-2919-2023-446.

67. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина, Г. А. Толстикова. – Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2007. – 232 с.

68. Пругло, Г. Ф. Хроматографические методы анализа: учебное пособие / Г. Ф. Пругло, О. В. Фёдорова, Р. А. Смит. – ВШТЭ СПбГУПТД : Санкт-Петербург, 2017. – 85 с.

69. Разделение и идентификация соединений ряда фенотиазина методом тонкослойной хроматографии / З. А. Темердашев, Н. В. Киселева, Р. А. Клищенко, А. В. Удалов // ЖАХ. – 2006. – Т. 61. – № 1. – С. 6-9.

70. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сборник научных трудов. – Пятигорск : Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2011. – 945 с. – ISBN 978-5-94122-079-3.

71. Ракитский, В. Н. Безопасность пищевой продукции: современные приёмы многокомпонентного определения пестицидов / В. Н. Ракитский, Н. Е. Федорова // Здравоохранение РФ. – 2021. – Т. 65. – № 4. – С. 388-393. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bezopasnost-pischevoy-produktsii-sovremennye->

priyomu-mnogokomponentnogo-opredeleniya-pestitsidov (дата обращения: 30.11.2024).

72. Россинская, Е. Р. Естественнонаучные методы судебно-экспертных исследований: Учебник / Е. Р. Россинская; Под ред. Е. Р. Россинской. – Москва: Норма: НИЦ ИНФРА-М, 2015. – 304 с.

73. Рувики : официальный сайт. Высокоэффективная тонкослойная хроматография – URL: https://ru.ruwiki.ru/wiki/Высокоэффективная_тонкослойная_хроматография.

74. Рукавицына, Н. П. Современные подходы к составлению фармакопейных стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Рукавицына Надежда Петровна; Самарский государственный медицинский университет. – Москва, 2017. – 253 с.

75. Санникова, Е. Г. Определение рутина в листьях ивы трёхтычинковой методом планарной хроматографии / Е. Г. Санникова, Т. Д. Мезенова // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4. – № 1(14). – С. 85-90. – DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-85-90.

76. Терещук, Л. В. Обзор рынка отечественных косметических средств по уходу за кожей / Л. В. Терещук, Е. А. Тыщенко, М. С. Семенова // Практический маркетинг. – 2005. – №4(98). – С. 30-40.

77. Тонкослойная хроматография при исследовании наркотических средств / В. И. Внуков, Д. В. Кайргалиев, Д. В. Васильев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-2. – С. 302. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=19878> (дата обращения: 30.11.2024).

78. Тринеева, О. В. Методы качественного и количественного определения терпено-индольных алкалоидов растения рода *Catharanthus* (обзор) / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, А. Д. Халахакун // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2019. – № 4. – С. 109-120.

79. Тринеева, О. В. Разработка методики идентификации рутина в растительных объектах методом ТСХ / О. В. Тринеева, И. И. Сафонова, А. И. Сливкин // Материалы XII международной научно-практической конференции «Студенческая медицинская наука XXI века». – Витебск, 2012. – С. 132-133.
80. Тринеева, О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... доктора фармацевтических наук / Тринеева Ольга Валерьевна; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2017. – 441 с.
81. Ультрамикрометод определения молекулярного веса одноцепочечных белков и пептидных цепей субъединиц белка с помощью тонкослойной гельхроматографии / Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, М. А. Аниськова [и др.] // Биоорг. Химия. – 1975. – № 1 (3). – С. 396-401.
82. Фармакопея США. Национальный формуляр : USP 47 : NF 42 : <203> High-performance thin-layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin. – Текст : электронный. – URL: <https://www.uspnf.com/purchase-uspnf> (дата обращения : 04.04.2025 г.).
83. Фармакопея США. Национальный формуляр : USP 47 : NF 42 : Рутин. – Текст : электронный. – URL: <https://www.uspnf.com/purchase-uspnf> (дата обращения : 04.04.2025 г.).
84. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов, Е. Н. Музафаров; отв. ред. Е.И. Маевский. – Пущино: Synchronbook, 2013. – 310 с. – ISBN 978-5-91874-043-9.
85. Флавоноиды: классификация, биологические свойства и перспективы использования в медицине / Е. Е. Курдюков, Д. А. Плешакова, Н. Н. Глебова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2023. – №11 (137). – С. 114. – URL: <https://research-journal.org/archive/11-137-2023->

november/10.23670/IRJ.2023.137.143 (дата обращения: 01.12.2024). – DOI: 10.23670/IRJ.2023.137.143.

86. Хроматография в тонких слоях / Под. ред. Э. Шталя. – Москва: Мир, 1965. – 508 с.

87. Чепило, Д. А. Разработка стандартных образцов для контроля качества антигипертензивных лекарственных средств – ингибиторов АПФ : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Чепило Дмитрий Андреевич; Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). – Москва, 2022. – 141 с.

88. Чечета, О. В. Выбор оптимальных параметров хроматографического определения рутина методом ТСХ / О. В. Чечета, А. И. Сливкин, И. И. Сафонова // Материалы 4-й Всеросс. с междунар. уч. науч.-метод. конф. «Фармобразование-2010». Часть II. – Воронеж, 2010. – С. 407-410.

89. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец ; Перевод со словац. А. П. Сергеева, А. Н. Ушакова. – Москва: Мир. ч. II, 1980. – 295 с.

90. Шатилина, А. А. Создание стандартных образцов для контроля качества лекарственных средств из группы пищеварительных ферментов : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Шатилина Анастасия Андреевна; Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). – Москва, 2024. – 123 с.

91. Шилова, Р. П. Раздельное определение пестицидов методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» / Р. П. Шилова // Гигиена и санитария. – 1974. – №7. – С. 52-53. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/razdelnoe-opredelenie-pestitsidov-metodom-tonkosloynoy-hromatografii-na-plastinkah-silufol> (дата обращения: 30.11.2024).

92. Шпигун, О. А. Ионная хроматография и ее применение в анализе вод / О. А. Шпигун, Ю. А. Золотов. – Москва, МГУ, 1990. – 197 с.

93. Шульга, Н. А. Разработка способов получения примесей некоторых лекарственных средств и их аттестация в качестве стандартных образцов : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Шульга Николай Андреевич; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2025. – 151 с.
94. Agatonovic-Kustrin, S. Development and validation of a simple high performance thin layer chromatography method combined with direct 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay to quantify free radical scavenging activity in wine / S. Agatonovic-Kustrin, D. W. Morton, A. P. Yusof // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 197. – Pt. A. – P. 285-290. – DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.128.
95. Andersen, Ø. M. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications / Ø. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton; London; New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. – 1197 p.
96. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates / M. Saleem, M. Nazir, M. S. Ali [et al.] // *Nat.Prod.Rep.* – 2010. – Vol. 27. – P. 238-254.
97. Balbaa, S. I. Qualitative and quantitative study of the flavonoid content of the different organs of *Sophora japonica* at different stages of development / S. I. Balbaa, A. Y. Zaki, A. M. el-Shamy // *Planta Med.* – 1974. – № 25(4). – P. 325-330. – DOI: 10.1055/s-0028-1097951.
98. Bhusan, R. Thin layer chromatography of peptides and proteins: A review / R. Bhusan, V. K. Mahesh, P. V. Mallikharjun // *Biomed. Chrom.* – 1989. – Vol. 3 (3). – P. 95-104.
99. Bosca, B. Novel simultaneous determination of alliin and allicin in *Allium* sp. using digital subtraction HPTLC / B. Bosca, A. C. Mot // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2023. – Vol. 1222. – P. 123700. – DOI: 10.1016/j.jchromb.2023.123700.
100. Characterization of Nucleobases in Seabuckthorn Leaves: An HPTLC Approach / M. Jigni, H. Prashant, S. Priyanka [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography & Related*

Technologies. – 2017. – Vol. 40. – № 1. – P. 50-57. – DOI: 10.1080/10826076.2017.1283517.

101. Consden, R. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper / R. Consden, A.H. Gordon, A. J. P. Martin // *J. Biochem.* – 1944. – Vol. 38. – P. 224-232.

102. Determination of Pesticide Residue in Brinjal Sample Using HPTLC and Developing a Cost-Effective Method Alternative to HPLC / H. Muzammil, A. Kiran, I. Munawar [et al.] // *Journal of Chemistry.* – 2020. – № 2. – P. 1-12. – DOI: 10.1155/2020/8180320.

103. Determination of Rutin, Quercetin and Genistein in Sophorajaponica Thunb / Q. Jin, L. N. Shen, S. F. Li [et al.] // *Journal of Traditional Chinese Medicine.* – 2015. – Vol. 8. – P. 1176-1178.

104. Development and Validation of a Quantitative Analysis of Water-Soluble Vitamins Using High-Performance Thin-Layer Chromatography and Its Application to the Analysis of Nutraceuticals / K. M. Y. K. Sikdar, M. K. Islam, T. Sostaric [et al.] // *Separations.* – 2024. – № 11(7). – P. 207. – DOI: 10.3390/separations11070207.

105. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study / M. G. Hertog, E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout // *Lancet.* – 1993. – Vol. 342. – P. 1007-1011.

106. Ernst, C. Efficient and sensitive profiling of RNA-protein interactions using TLC-CLIP / C. Ernst, J. Duc, D. Trono // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol. 51(13). – P. e70. – DOI: 10.1093/nar/gkad466.

107. Farkas, O. Study of the interaction of structurally similar bioactive compounds by thin-layer chromatography / O. Farkas, E. Gere-Pásztzi, E. Forgács // *J Chromatogr Sci.* – 2003. – Vol. 41(4). – P. 169-172. – DOI: 10.1093/chromsci/41.4.169.

108. Ghorbani, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin / A. Ghorbani // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – Vol. 96. – P. 305-312. – DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.001.

109. Guevara, G. Analysis of Intermediates of Steroid Transformations in Resting Cells by Thin-Layer Chromatography (TLC) / G. Guevara, J. Perera, J.M. Navarro-Llorens //

Methods Mol Biol. – 2017. – Vol. 1645. – P. 347-360. – DOI: 10.1007/978-1-4939-7183-1_24.

110. Hatzack, F. High-performance thin-layer chromatography method for inositol phosphate analysis / F. Hatzack, S.K. Rasmussen // *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* – 1999. – Vol. 736. – № 1-2. – P. 221-229. – DOI: 10.1016/s0378-4347(99)00465-x.

111. Hemaiswarya, S. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases / S. Hemaiswarya, A. K. Kruthiventi, M. Doble // *Phytomedicine.* – 2008. – Vol. 15. – P. 639-652.

112. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*-advantages and limitations / C. M. Loescher, D. W. Morton, S. Razic, S. Agatonovic-Kustrin // *J Pharm Biomed Anal.* – 2014. – Vol. 98. – P. 52-59. – DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.023.

113. High performance thin layer chromatography (HPTLC) method development and validation for the simultaneous determination of paracetamol, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in tablet formulation / A. Arage, T. Layloff, A. Hymete, A. Ashenef // *Acta Chromatographica.* – 2022. – Vol. 35. – № 2. – P. 170-178. – DOI: 10.1556/1326.2022.01028.

114. HPTLC and FTIR Fingerprinting of Olive Leaves Extracts and ATR-FTIR Characterisation of Major Flavonoids and Polyphenolics / S. Agatonovic-Kustrin, V. Gegechkori, S. P. Dementyev, T. I. Kobakhidze, D. W. Morton // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26(22). – P. 6892. – DOI: 10.3390/MOLECULES26226892.

115. HPTLC Method Development of Herbal drugs and its Validation: An Overview / A. Vyas, V. Jain, U. Sahu, N. Kumar, N. Joshi // *Research Journal of Pharmacy and Technology.* – 2023. – № 16(8). – P. 3964-3966. – DOI: 10.52711/0974-360X.2023.00652.

116. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands / M. G. Hertog, P. C. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout // *Nutr.Cancer.* – 1993. – Vol. 20. – P. 21-29.

117. International Conference on Harmonization. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological. Biological Products (Q6A). – 1999. – 35 p.
118. International Conference on Harmonization. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological. Biological Products (Q6B) / European Medicines Agency. – 1999. – 17 p.
119. Kobakhidze, T. HPTLC analysis of the quality control of *Violae herba* / T. Kobakhidze // Semmelweis International Students Conference 2023 of Semmelweis University Budapest. – 2023. – Vol. 1. – № 1-344. – P. 37.
120. Kobakhidze, T. HPTLC method for the determination of biologically active substances in important medicinal plants / T. Kobakhidze // Guangdong Pharmaceutical University, GDPU, 2021. – P. 72.
121. MacNeil, J.D. Quantitative thin-layer chromatography of pesticides / J. D. MacNeil, R. W. Frei // *J Chromatogr Sci.* – 1975. – Vol. 13(6). – P. 279-285. – DOI: 10.1093/chromsci/13.6.279.
122. Maksimova, E. F. Methacrylatebased monolithic layers for planar chromatography of polymers / E. F. Maksimova, E. G. Vlakh, T. B. Tennikova // *Journal of Chromatography A.* – 2011. – Vol. 1218. – P. 2425-2431.
123. MERCK «Тонкослойная хроматография» : Электронный ресурс. – URL: <http://vitus.by/upload/iblock/8c9/8c981ef9de430fb2b9e40ccb7b687be2.pdf>.
124. Mohammad, A. Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: Review of the current state / A. Mohammad, A. Moheman, G. El-desoky // *Central European Journal of Chemistry.* – 2012. – Vol. 10. – P. 731-750. – DOI: 10.2478/s11532-012-0019-0.
125. Monolithic porous polymer layer for the separation of peptides and proteins using thin-layer chromatography coupled with MALDITOF-MS / R. Bakry, G. K. Bonn, D. Mair, F. Svec // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79. – P. 486-493.
126. Monolithic superhydrophobic polymer layer with photopatterned virtual channel for the separation of peptides using two-dimensional thin layer chromatography-desorption electrospray ionization mass spectrometry / Y. Han, P. Levkin, I. Abarientos [et al.] // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82. – P. 2520-2528.

127. Naguib, I. A. Impurity profiling high-performance-thin-layer chromatography method involving the assay of essential human micronutrient niacin with eco-scale assessment / I. A. Naguib, M. E. Draz, F. F. Abdallah // *Biomed Chromatogr.* – 2020. – Vol. 34(8). – P. e4858. – DOI: 10.1002/bmc.4858.
128. Pallauf, K. A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms / K. Pallauf, N. Duckstein, G. Rimbach // *Proceedings of the Nutrition Society.* – 2017. – Vol. 76(2). – P. 145-162. – DOI: 10.1017/S0029665116000720.
129. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review / G. F. Ferrazzano, I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, A. Pollio // *Molecules.* – 2011. – № 16(2). – P. 1486-1507.
130. Quantitative thin-layer chromatography of industrial amino acids / I. I. Malakhova, B. V. Tyaglov, E. V. Degterev, V. D. Krasikov, W. G. Degtiar // *J. Planar. Chromatogr.* – 1996. – Vol. 9. – P. 375-378.
131. Recent advances in antitubercular natural products / A. Garcia, V. Bocanegra-Garcia, J. P. Palma-Nicolas, G. Rivera // *Eur.J.Med.Chem.* – 2012. – Vol. 49. – P. 1-23.
132. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats / S. K. Panchal, H. Poudyal, T. V. Arumugam, L. Brown // *J.Nutr.* – 2011. – Vol. 141. – P. 1062-1069.
133. Simultaneous extraction, optimization, and analysis of flavonoids and polyphenols from peach and pumpkin extracts using a TLC-densitometric method / A. Altemimi, D. G. Watson, M. Kinsel [et al.] // *Chemistry Central Journal.* – 2015. – № 9. – P. 39. – DOI: 10.1186/s13065-015-0113-4.
134. Solid-Phase Microextraction Techniques and Application in Food and Horticultural Crops / S. Agatonovic-Kustrin, V. Gegechkori, T. Kobakhidze, D. Morton // *Molecules.* – 2023. – № 28(19). – P. 6880.
135. Study on chemical constituents and pharmacological activities of *Sophora japonica* / G. L. Sun, Q. Zhao, X. N. Dong [et al.] // *Chinese Journal of Veterinary Medicine.* – 2016. – Vol. 7. – P. 3-5.

136. To metabolomics and beyond: a technological portfolio to investigate cancer metabolism / F. Danzi, R. Pacchiana, A. Mafficini [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. 137. – DOI: 10.1038/s41392-023-01380-0.
137. UPLC-ESI-MS/MS and HPTLC Method for Quantitative Estimation of Cytotoxic Glycosides and Aglycone in Bioactivity Guided Fractions of *Solanum nigrum* L / C. Karishma, P. Sarvesh, K. Washim, A. Sayeed // *Frontiers in Pharmacology.* – 2017. – Vol. 8. – P. 434. – DOI: 10.3389/fphar.2017.00434.
138. Using TLC-MALDI-TOF to Interrogate In Vitro Peptidyl Proximal Preferences of PARP14 and Glycohydrolase Specificity / Z. Javed, H. H. Nguyen, K. K. Harker [et al.] // *Molecules.* – 2023. – № 28(16). – P. 6061. – DOI: 10.3390/molecules28166061.
139. Wang, Z. HPTLC + SRES screening of pesticide for point-of-care application as shown with thiram in juice / Z. Wang, L. Zhang, Y. Chen // *Food Chem X.* – 2023. – Vol. 18. – P. 100670. – DOI: 10.1016/j.fochx.2023.100670.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Анализ рутина в ЛРС методом ТСХ в соответствии с ГФ РФ

№	Источник сырья	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Визуализация пятен	Результат	Источник литературы
1	Гинкго двулопастного листья <i>Ginkgo biloba folia</i>	пластинка со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором	Хлороформ: метанол: вода (26:14:3)	УФ 254 нм	СО рутина – темно- коричневого цвет	[22]
				раствор диазореактива. Дневной свет	СО рутина – желто- оранжевый цвет	
2	Хвоща полевого трава <i>Equiseti arvensis herba</i>	пластинка со слоем силикагеля	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (7,5:7,5:18:67)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2.* УФ 365 нм</i>	СО рутина – желтый, зелено-желтый или оранжевый цвет	
3	Душицы обыкновенной трава <i>Origanum vulgare herba</i>	пластинка со слоем силикагеля	Вода: муравьиная кислота безводная: этилацетат: толуол (2:5:20:10)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – желто- оранжевый или оранжевый цвет	
4	Липы цветки <i>Tiliae flores</i>	пластинка со слоем силикагеля	Вода: муравьиная кислота безводная: толуол: этилацетат (8:10:14:60)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – желтый или оранжево-желтый цвет	

Продолжение Таблицы А.1

5	Горца перечного трава <i>Polygoni hydropiperis herba</i>	пластинка со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором	Бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:2)	алюминия хлорида спиртовым раствором 1%. УФ 365 нм	СО рутина – флюоресценция желто-зеленого цвета	[19]
6	Горца почечуйного трава <i>Polygoni persicariae herba</i>	пластинка со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (10:2:3)	УФ 254 нм	СО рутина –сине- фиолетовый цвет	
				алюминия хлорида спиртовым раствором 1%. УФ 365 нм	СО рутина – флюоресценция желто-зеленого цвета	
7	Зверобоя трава <i>Hyperici herba</i>	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (85:10:5)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флюоресценция желтого цвета	
8	Календулы лекарственной цветки <i>Calendulae officinalis flores</i>	пластинка со слоем силикагеля	муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – желтый, желто-оранжевый или оранжевый цвет	
9	Бузины черной цветки <i>Sambuci nigrae flores</i>	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: метанол: вода (77:12:11)	алюминия хлорида спиртовым раствором 2%. УФ 365 нм	СО рутина – флуоресценция ярко- желтого цвета	

Продолжение Таблицы А.1

10	Боярышника цветки <i>Crataegi flores</i>	Высокоэффективная хроматографическая пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: бутанон- 2: муравьиная кислота: вода (30:10:5:5)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желтого цвета	[19]
11	Мать-и-мачехи обыкновенной листья <i>Tussilaginis farfarae folia</i>	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4:6)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желтого цвета	
12	Полыни горькой трава <i>Artemisiae absinthii herba</i>	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4:6)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина –желтый, желто-оранжевый или оранжевый цвет	
13	Тимьяна обыкновенного трава <i>Thymi vulgaris herba</i>	пластинка со слоем силикагеля	Бензол: уксусная кислота: вода (4:1:2)	алюминия хлорида спиртовым раствором 2%. УФ 365 нм	СО рутина – флуоресценция желтого цвета в средней трети пластинки	
14	Земляники лесной листья <i>Fragariae vescae folia</i>	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (70:15:15)	УФ 365 нм	СО рутина – темный цвет	
				алюминия хлорида спиртовым раствором 5%. Дневной свет	СО рутина – желтый цвет	

Продолжение Таблицы А.1

15	Хмеля обыкновенного соплодия Humuli lupuli fructus	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (5:1:1)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – желтый или желто-зеленый цвет	[19]
16	Череды трехраздельной трава Bidentis stripartitae herba	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4:6)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. дневной свет УФ 365 нм</i>	СО рутина – желтый, желто-оранжевый или оранжевый цвет	
17	Фиалки трава Violae herba	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (65:15:20)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флюоресценция желто-оранжевого цвета	
18	Золототысячника трава Centaurii herba	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (65:15:20)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желтого цвета	
19	Эрвы шерстистой трава Aerva lanata herba	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (12:2,5:3)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желтого, желто- оранжевого или оранжевого цвета	

Продолжение Таблицы А.1

20	Ромашки аптечной цветки <i>Chamomillae recutita flores</i>	пластинка со слоем силикагеля	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4:6)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желтого или желто- оранжевого цвета	[19]
21	Арника Горная <i>Arnica montana</i>	Пластины ВЭТСХ, силикагель	Этилацетат: муравьиная кислота: вода (90:6:9)	Полиэтиленгликоль. УФ 366 нм	СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета Rf = 0.08	[8]
22	Бледная поганка <i>Amanita phalloides ad praeparationes homoeopathicas</i>	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Уксусная кислота ледяная: вода: бутанол (17:17:66)	УФ 254 нм	СО рутина – тусклая зона в средней трети хроматограммы	[30]
				1% раствор коричневого альдегида в метаноле. соляная кислота. Дневной свет	СО рутина – фиолетовый цвет	
			Уксусная кислота ледяная: вода: метанол: метиленхлорид (4:6:30:60)	5% раствор коричневого альдегида в метаноле. пары соляной кислоты. Дневной свет	СО рутина – желтый цвет	
23	Репейника трава <i>Agrimoniae herba</i>	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета	

Продолжение Таблицы А.1

24	Арники цветки Arnicae flos	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота: вода: этилацетат (6:9:90)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – желтый или оранжевый цвет	[30]
25	Ясени листья Fraxini folium	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета	
26	Дерезы ягоды Lysii fructus	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (11:11:27:100)	<i>Реактив для детектирования 1. (примечание – 0,5% раствор) Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета	
27	Белокудренника черного трава Ballotae nigrae herba	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (7,5:7,5:18:67)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция оранжево-желтого цвета	
28	Смородины черной листья Ribis nigri folium	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – желто- оранжевый цвет	

Продолжение Таблицы А.1

29	Гречихи трава Fagopyri herba	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 365 нм	СО рутина – желто- оранжевый цвет	[30]
30	Золототысячника трава Centaurii herba	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Вода: муравьиная кислота безводная: этилформиат (4:8:88)	Раствор анисового альдегида. Дневной свет	СО рутина – желтый цвет	
31	Пустырника японского трава Leonuri japonici herba	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота: вода: метилэтилкетон: этилацетат (10:10:30:50)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> (примечание – 0,5% раствор) <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 366 нм	СО рутина – оранжевый цвет	
32	Одуванчика лекарственного корни Taraxaci officinalis radix	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 365 нм	СО рутина – желтовато- коричневый цвет	
33	Бузины цветки Sambuci flos	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: метилэтилкетон: этилацетат (10:10:30:50)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> (примечание – 0,1% раствор) <i>Реактив для детектирования 2.</i> (примечание – 0,5% раствор) Дневной свет УФ 365 нм	СО рутина – темно- желтый цвет (дневной свет) СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета (УФ)	

Продолжение Таблицы А.1

34	Хвоща трава Equiseti herba	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (7,5:7,5:18:67)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета	[30]
35	Гинкго листья Ginkgonis folium	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (7.5:7.5:17.5:67.5)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желто-коричневого цвета	
36	Боярышника плоды Crataegi fructus	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 366 нм</i>	СО рутина – желтый или оранжевый тусклый цвет	
37	Вербены лимонной лист Verbenae citriodoraе folium	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (11:11:27:100)	Раствор анисового альдегида. Дневной свет	СО рутина – темный коричнево-желтый цвет	
38	Липы цветки Tiliae flos	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: метилэтилкетон: этилацетат (10:10:30:50)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 366 нм</i>	СО рутина – желтый, оранжевый или голубоватый цвет	

Продолжение Таблицы А.1

39	Мальвы листья Malvae folium	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота безводная: вода: этилформиат: 3- пентанон (4:11:14:20:50)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 365 нм	СО рутина – флуоресценция желтого цвета	[30]
40	Мате листья Mate folium	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Толуол: вода: муравьиная кислота безводная: этилформиат (3:6:8:60)	УФ 254 нм <i>Реактив для детектирования 1.</i> <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 366 нм	Слабо-вырезанная зона СО рутина – флуоресценция оранжевого цвета	
41	Оливы листья Oleae folium	пластинка со слоем силикагеля R	Вода: метанол: метиленхлорид (1.5:15:85)	Раствор ванилина. Дневной свет.	СО рутина – коричнево-желтый цвет	
42	Мяты перечной листья Menthae piperitae folium	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Уксусная кислота: муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (7:7:18:68)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 366 нм	СО рутина – флуоресценция оранжево-желтого цвета	
43	Малины листья Rubi idaei folium	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 366 нм	СО рутина – желтый или оранжевый цвет	

Продолжение Таблицы А.1

44	Сафлора цветы Carthami flos	пластинка со слоем силикагеля R	Уксусная кислота: муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (11:11:27:100)	Дневной свет <i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – светло- желтый цвет СО рутина – флуоресценция желтого цвета	[30]
45	Истода корни Polygalae radix	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (11:11:26:100)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 366 нм</i>	СО рутина – оранжевый цвет	
46	Серпухи венценосной трава Serratulae coronatae herba	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 366 нм</i>	СО рутина – желтый или оранжевый цвет	
47	Софоры японской цветки Sophorae japonicae flos	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – оранжево-желтый цвет	
48	Софоры японской бутоны Sophorae japonicae flos immaturus	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – насыщенный оранжево-желтый цвет	

Продолжение Таблицы А.1

49	Зверобоя трава Hyperici herba	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (10:10:80)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 366 нм</i>	СО рутина – флуоресценция оранжевого или желтого цвета	[30]
50	Аниса звездчатого плоды Anisi stellati fructus	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (11:11:26:100)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция коричнево-желтого цвета	
51	Тимьяна трава Thymi herba	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (1:1:15)	<i>Реактив для детектирования 1. (примечание – 0,5% раствор) Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм.</i>	СО рутина – флуоресценция оранжево-желтого цвета	
52	Вербены трава Verbenaе herba	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота ледяная: вода: этилацетат (11:11:27:100)	Раствор анисового альдегида. Дневной свет	СО рутина – темный коричнево-желтый цвет	
53	Фиалки трава с цветками Violaе herba cum flore	пластинка со слоем силикагеля R	Муравьиная кислота безводная: уксусная кислота: вода: этилацетат (11:11:27:100)	<i>Реактив для детектирования 1. Реактив для детектирования 2. УФ 365 нм</i>	СО рутина – флуоресценция желтовато- коричневого цвета	

Продолжение Таблицы А.1

54	Чабреца трава Serpylli herba	пластинка со слоем силикагеля F254 R	Муравьиная кислота безводная: вода: этилацетат (1:1:15)	<i>Реактив для детектирования 1.</i> (примечание – 0,5% раствор) <i>Реактив для детектирования 2.</i> УФ 365 нм	СО рутина – флуоресценция оранжево-желтого цвета	[30]
55	Гречиха посевная Fagopyrum esculentum	Silufol UV 254	Хлороформ: метанол: вода (26:14:3)	УФ 254 нм УФ 365 нм	Rf = 0,4	[6]
		Сорбфил ПТСХ-П- А-УФ, Сорбфил ПТСХ-ЛФ-Л-УФ	н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:2)	УФ 254 нм УФ 365 нм	Rf = 0,4	
56	Плоды облепихи Hippophaes fructus	Сорбфил с полимерной подложкой ПТСХ- П-А-УФ	Этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (7,5:1,5:1,5)	10 % спиртовый раствор NaOH. Дневной свет	Rf = 0,53	[61]
57	Софоры японской бутоны Sophora japonica alabastra	Silufol UV-254	Бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:5)	алюминия (III) хлорида раствором спиртовым 2%, УФ	Rf = 0.41±0,01	[35]
			Хлороформ: ацетон: метанол (36:1:1)	алюминия (III) хлорида раствором спиртовым 2%, УФ	Rf = 0.41±0,01	
58	Ива трехтычинковая Salix triandra	«Sorbfil» ПТСХ-П- А-УФ	н-бутанол: уксусная кислота ледяная: вода (4:1:1)	Пары аммиака. Дневной свет	Rf = 0,64±0,02	[75]

Продолжение Таблицы А.1

59	Персик Reach	Стекланные пластины для ТСХ, покрытые силикагелем 60 F254 (Merck)	Этилацетат: ацетон (5:4)	2- аминоэтилдифенилборной кислоты эфир УФ 254 нм	СО рутина – флуоресценция желто-оранжевого цвета	[133]
			Гексан: хлороформ (10:10)	2- аминоэтилдифенилборной кислоты эфир УФ 254 нм	СО рутина – флуоресценция желто-оранжевого цвета	
			Этилацетат: муравьиная кислота: вода (10:2:3)	2- аминоэтилдифенилборной кислоты эфир УФ 254 нм	СО рутина – флуоресценция желто-оранжевого цвета (лучшее разделение из трех)	
Примечание: * Реактив для детектирования 1. Дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 %. Реактив для детектирования 2. Макрогола 400 раствор спиртовой 5 %.						

Анализ данных Приложения А (Таблицы А.1) выявил, что необходимым условием разделения флавоноидов в извлечениях из ЛРС является создание кислого рН в используемой ПФ. Это достигается введением либо муравьиной кислоты, либо ледяной уксусной кислоты. Предлагаемые системы достаточно полярны, что достигается введением в ПФ этилацетата или этилформиата, воды, метанола. Сделанные наблюдения будут учтены при выборе условий хроматографирования в нашей работе.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

УТВЕРЖДАЮ

И.о. первого проректора – проректора
по учебной работе ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный
университет»



Е.Е. Чупандина

17 мая 2025 г.

АКТ №1500-200

о внедрении результатов диссертации Кобахидзе Тамары Ильиничны в
учебный процесс фармацевтического факультета ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный университет»

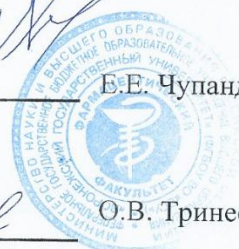
Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Кобахидзе Тамара Ильиничны на тему «Высокоэффективная тонкослойная хроматография в анализе растительных источников и лекарственных средств, содержащих рутины» внедрены в учебный процесс фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» при изучении дисциплин «Общая фармацевтическая химия», «Фармакогнозия», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 «Фармация».

Декан фармацевтического факультета

Е.Е. Чупандина

И.о. заведующего кафедрой
фармацевтической химии и
фармакогнозии

О.В. Тринеева



ПРИЛОЖЕНИЕ В

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)



Литвинова Т.М.

20 25 г.

05 МАЙ 2025

АКТ № 657*

о внедрении результатов диссертации Кобахидзе Тамары Ильиничны в учебный процесс Института Фармации им А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Кобахидзе Тамара Ильиничны

на тему «Высокоэффективная тонкослойная хроматография в анализе растительных источников и лекарственных средств, содержащих рутин» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева и кафедры фармацевтического естествознания Института Фармации им А.П. Нелюбина

при изучении дисциплин «Общая фармацевтическая химия», «Фармакогнозия», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация

Директор Института
Фармации им. А.П. Нелюбина

(Подпись)

Раменская Г.В.

Заведующий учебной частью
кафедры фармацевтической и
токсикологической химии им. А.П.
Арзамасцева

(Подпись)

Кузина В.Н.

Заведующий учебной частью
кафедры фармацевтического
естествознания

(Подпись)

Бобкова Н.В.

Начальник Учебного управления

(Подпись)

Юдина Л.Ю.