



Оригинальная статья / Research article

Разработка методики количественного определения генистеина для аттестации стандартного образца

А. А. Жигалина✉, О. Ю. Стрелова, А. Н. Гребенюк

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Жигалина Анна Анатольевна. E-mail: zhigalina.anna@spcru.ru

ORCID: А. А. Жигалина – <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>; О. Ю. Стрелова – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; А. Н. Гребенюк – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 03.11.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

Резюме

Введение. Одно из актуальных направлений развития современной фармации – поиск новых высокоэффективных фармацевтических субстанций с широким спектром фармакологического действия и низкой токсичностью. В результате проведенных рядом авторов исследований были показаны положительные результаты применения генистеина для профилактики и при терапии сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза у женщин в период менопаузы. Он проявляет гипохолестеринемическое и антидиабетическое действие, а также радиозащитные свойства. Была проведена сравнительная оценка генистеина из жмыха семян сои культурной [*Glycine max* (L.) Merr.] и синтезированного ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА и кафедре ХТЛВ, СПХФУ. Исследования природного генистеина методом ГХ-МС показало наличие в образце примесь родственного изофлавона – дайдзеин. Синтезированный генистеин был оценен по показателям качественного анализа.

Цель. Цель нашего исследования являлась разработка методики количественного определения генистеина для его аттестации в качестве стандартного образца.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся генистеин 96 %, (abcr. Gute Chemie, Германия). Количественное определение методом неводного титрования проводили на рН-метре лабораторном F20 (METTLER TOLEDO, США) в среде диметилформамида (ДМФА) х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия). Исследование методом ВЭЖХ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония).

Результаты и обсуждение. За основу разработки методики количественного определения генистеина использовали рекомендованную ГФ РФ XIV издания метод неводного титрования в среде ДМФА, титрант 0,1 М раствора гидроксида натрия. Конечная точка титрования (КТТ) устанавливалась с помощью индикатора тимолового синего. Однако была отмечена сложность в визуальной фиксации изменением окраски индикатора. Было предложено использовать потенциометрическое определение конечной точки титрования. Для количественного определения генистеина в БАВ и лекарственных средствах предложена методика ВЭЖХ.

Заключение. Разработана методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде ДМФА. Интегральная кривая потенциометрического титрования не обладает достаточной информативностью. Поэтому рекомендуется строить дифференциальную кривую титрования для определения конечной точки титрования. Валидационная оценка полученных результатов показала, что методика является правильной (RSD, % = 1,25), сходимой (RSD, % = 1,21) и внутрилабораторно прецизионной (в первый день RSD, % = 1,21, во второй день RSD, % = 1,41).

Ключевые слова: генистеин, стандартный образец, неводное титрование

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. А. Жигалина и О. Ю. Стрелова придумали и разработали эксперимент. А. А. Жигалина, О. Ю. Стрелова, А. Н. Гребенюк участвовали в обработке данных, написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Жигалина А. А., Стрелова О. Ю., Гребенюк А. Н. Разработка методики количественного определения генистеина для аттестации стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):202–208. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-202-208>

Development of a Method for the Quantitative Determination of Genisten for the Certification of a Certified Reference Material

Anna A. Zhigalina✉, Olga Yu. Strelova, Alexander N. Grebenyuk

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

✉ Corresponding author: Anna A. Zhigalina. E-mail: zhigalina.anna@spcru.ru

ORCID: Anna A. Zhigalina – <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>; Olga Yu. Strelova – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; Alexander N. Grebenyuk – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Received: 06.09.2022

Revised: 03.11.2022

Published: 25.11.2022

© Жигалина А. А., Стрелова О. Ю., Гребенюк А. Н., 2022

© Zhigalina A. A., Strelova O. Yu., Grebenyuk A. N., 2022

Abstract

Introduction. One of the priority directions in the development of modern pharmacy is the search for new highly effective pharmaceutical substances with a high spectrum of pharmacological action and low toxicity. As a result of studies conducted by a number of authors, positive results have been shown for the use of genistein for the prevention and treatment of cardiovascular diseases and osteoporosis in menopausal women. It exhibits hypocholesterolemic and antidiabetic effects, as well as radioprotective properties. A comparative evaluation of genistein from soybean seed cake [*Glycine max* (L.) Merr.] and synthesized by SPC "Pharmzashchita" and the department of chemical technology of medicinal substances, SPCPU was carried out. Studies of natural genistein by GC-MS showed the presence of an admixture of a related isoflavone, daidzein, in the sample. The synthesized genistein was assessed in terms of qualitative analysis.

Aim. The aim of our study was to develop a method for the quantitative determination of genistein for its certification as a CRM.

Materials and methods. The object of the study was 96 % genistein (abbr. Gute Chemie, Германия). Quantitative determination by non-aqueous titration was carried out on a laboratory pH meter F20 (METTLER TOLEDO, USA) in a reagent grade DMFA medium (JSC "EKOS-1", Russia). The HPLC study was carried out on an Agilent 1200 Series high-performance liquid chromatograph LC-20 Prominence (Shimadzu, Japan).

Results and discussion. The method of non-aqueous titration in DMFA medium which recommended by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition, titrant 0.1 M sodium hydroxide solution, was used as the basis for the development of a method for the quantitative determination of genistein. The end point of the titration was set using thymol blue indicator. However, the difficulty in visual fixation by changing the color of the indicator was noted. It has been proposed to use a potentiometric end-point determination. For the quantitative determination of genistein in dietary supplements and drugs containing this substance a HPLC method was proposed.

Conclusion. A method for non-aqueous titration of genistein with potentiometric end-point determination in DMFA medium has been developed. The integral curve is not very informative for a clear definition of the titration end point. It is recommended to use a differential curve. The validation evaluation of the obtained results showed that the method is trueness (RSD, % = 1.25), precision (RSD, % = 1.21) and intermediate precision (on the first day of RSD, % = 1.21, on the second day of RSD, % = 1.41).

Keywords: genistein, certified reference material, non-aqueous titration

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova planned and carried out the experiment. Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova and Alexander N. Grebenyuk conducted data processing, discussion of the results, writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the CCP "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation" under the agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Zhigalina A. A., Strelova O. Yu., Grebenyuk A. N. Development of a method for the quantitative determination of genistein for the certification of a certified reference material. *Drug development & registration*. 2022;11(4):202–208. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-202-208>

ВВЕДЕНИЕ

Одно из актуальных направлений развития современной фармации – поиск новых высокоэффективных фармацевтических субстанций с широким спектром фармакологического действия и низкой токсичностью. Большой интерес, в связи с этим, представляют вещества природного происхождения, в частности генистеин. В результате проведенных рядом авторов исследований было показано, что генистеин оказывает положительное действие для профилактики и при терапии сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза у женщин в период менопаузы, проявляет гипохолестеринемическое, антидиабетическое действие и антитромбоцитарную активность [1–4]. В проведенных ранее исследованиях были обнаружены его радиозащитные свойства, которые максимальны при его введении до облучения. Показана возможность создания на его основе лекарственного препарата для сопровождения лучевой терапии опухолей [5, 6].

Препараты на основе сои содержат в своем составе комплекс изофлавонов, и при маркировке некоторых биологически активных добавок (БАД) не указывают, какие изофлавоны включены, указывается только суммарное количество. Отсутствие аттестованного отечественного стандартного образца генистеина затрудняет проведение процедуры оценки качества БАД или лекарственных средств на основе генистеина. Применение стандартных образцов (СО) обеспечивает метрологическую сопоставимость и совместимость результатов любого анализа, в том числе фармацевтического [7, 8].

В проведенной нами ранее работе была выполнена сравнительная оценка генистеина из жмыха семян сои культурной [*Glycine max* (L.) Merr.] и синтезированной ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА и кафедре химической технологии лекарственных веществ, СПХФУ [9, 10]. Исследования природного генистеина методом ГХ-МС показало наличие в образце примесь родственного изофлавона – дайдзеин [6]. Синтезированный генистеин был оценен его показатели качества

ва. Было подтверждено его химическое строение и определены спектральные характеристики методами ЯМР, ИК и рамановской спектроскопии, полученные данные могут быть использованы в нормативной документации для аттестации генистеина как СО [10].

Таким образом, синтетический метод получения генистеина предпочтителен для разработки СО и его дальнейшей аттестации.

Целью нашего исследования являлось разработка методики количественного определения генистеина для его аттестации в качестве СО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся генистеин 96 %, (abcr. Gute Chemie, Германия). В качестве титранта использовали натрия гидроксид, ч.д.а. (ООО «Вектор», Россия), в качестве растворителя была использована смесь бензола, х.ч. (ГОСТ 5955-75, АО «ЭКОС-1», Россия) и метанола, х.ч. (ГОСТ 6995-77, АО «ВЕКТОН», Россия), для среды титрования был использован диметилформамид (ДМФА), х.ч., (АО «ЭКОС-1», Россия), индикатором служил тимоловый синий, ч.д.а. (ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Количественное определение проводили на рН-метре лабораторном F20 (METTLER TOLEDO, США) в среде ДМФА.

Приготовление титранта 0,1 М раствора гидроксида натрия

0,4 г натрия гидроксида растворяют в 10 мл метанола, далее попеременно добавляют бензол и метанол так, чтобы соотношение было 1:4, не допуская расслаивания раствора [11].

Стандартизация 0,1 М раствора гидроксида натрия

10 мл свежеперегнанный ДМФА вносят в плоскодонную колбу на 100 мл, добавляют 2 капли индикатора тимолового синего, и титруют 0,1 М раствором гидроксида натрия до перехода окраски в синий цвет, устанавливают объем титранта, пошедшего на нейтрализацию. Далее бюретку снова заполняют до нулевой отметки. Отвешивают около 0,05 г бензойной кислоты (точная навеска) и вносят в ту же колбу для титрования, перемешивают до растворения и вновь титруют тем же 0,1 М раствором натрия гидроксида до перехода окраски в синий цвет. Для расчета концентрации берут объем титранта, пошедшего только на бензойную кислоту. Расчет ведут в соответствии с ГФ РФ XIV издания [11].

Методика количественного определения генистеина методом неводного титрования с предварительной нейтрализацией ДМФА

10 мл ДМФА вносят в мерный стакан на 50 мл, добавляют 2 капли индикатора тимолового синего и титруют 0,1 М раствором гидроксида натрия до перехо-

да окраски в синий цвет с использованием магнитной мешалки. Далее бюретку снова заполняют до нулевой отметки. Отвешивают около 0,05 г генистеина (точная навеска) и вносят мерный стакан на 50 мл, перемешивают до растворения, устанавливают электрохимическую ячейку так, чтобы электроды были полностью в растворе, ожидают, когда на приборе установится равновесие и титруют тем же титрантом при непрерывном перемешивании. Каждый раз при добавлении определенного объема титранта ожидали установления равновесия в ячейке для записи показаний прибора. Для расчета концентрации берут объем титранта, пошедшего только на генистеин (таблица 1).

Таблица 1. Результаты неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования

Table 1. Results of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration

| Номер образца Sample number | C, % |
|--------------------------------|--------|
| 1 | 97,2 |
| 2 | 97,82 |
| 3 | 97,88 |
| 4 | 98,27 |
| 5 | 98,66 |
| 6 | 99,29 |
| 7 | 100,28 |
| 8 | 100,76 |

Для определения БАВ на основе генистеина была разработана методика количественное определение методом ВЭЖХ.

Около 0,02 г (точная навеска) генистеина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 50 мл метаноле (HPLC for Gradient Analysis, CAS № 75-05-8, США) и доводят объем раствора до метки и перемешивают. Хроматографируют испытуемый раствор и определяют площадь пика исследуемого образца. Определение проводили в режиме изократического элюирования, при этом использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостный хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), снабженный диодно-матричным детектором (УФ-детектор модель SPD-M20A). Неподвижная фаза – колонка C18 из нержавеющей стали (25,0 см × 4,6 мм), заполненная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм. Подвижная фаза – ацетонитрил (HPLC for Gradient Analysis, CAS № 75-05-8, Thermo Fisher Scientific, США), и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты. Условия хроматографирования: скорость потока – 0,5 мл/мин; температура термостата колонки – 400 °С; длина волны детектирования – 264 нм; объем пробы – 10 мкл; время анализа – 20 мин [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из подходов к количественному определению вещества как стандартного образца является использование абсолютного метода, такого как титри-

метрия. Данный метод необходим для включения в нормативную документацию по показателю «Количественное определение». Это относительно быстрый метод, позволяет оценивать содержание с большой точности и не требует наличие СО. Генистеин по своей природе изофлавоон, который не растворим в воде, и является очень слабой кислотой. Исходя из этих особенностей его свойств, было выбрано неводное титрование с потенциометрическим определением конечной точки титрования. Неводное титрование флавоноидов рекомендуется проводить в среде диметилформамида, точку эквивалентности устанавливают по индикатору или потенциометрически. Так, в частности, для количественного определения субстанции рутозида в ГФ РФ XIV издания предложен метод неводного титрования в среде ДМФА, титрант 0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида, с потенциометрической точкой определения конца титрования [11].

В начале нашего исследования конечная точка титрования (КТТ) устанавливалась с помощью индикатора тимолового синего. Однако была отмечена сложность в визуальной фиксации изменением окраски индикатора: генистеин очень слабая кислота ($pK_{a1} = 7,63$; $pK_{a2} = 9,67$; $pK_{a3} = 10,80$), резкого изменения pH в растворе при титровании не происходит, поэтому сложно установить, до какой окраски индикатора необходимо титровать.

Было предложено использовать потенциометрическое определение конечной точки титрования. При проведении титрования с контрольным опытом были обнаружены скачки на кривых титрования, так как среда ДМФА влияет на ход титрования, для нивелирования данных скачков было предложено титровать с предварительной нейтрализацией ДМФА без контрольного опыта.

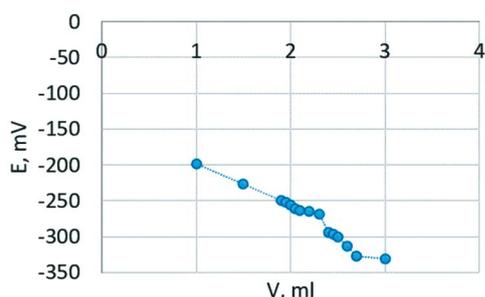


Рисунок 1. Общий вид интегральной кривой титрования генистеина

Figure 1. General view of the integral titration curve of genistein

По результатам титрования построены интегральные и дифференциальные кривые (рисунки 1 и 2).

Как видно из представленного рисунка 1, при титровании скачок изменения потенциала (E , mV) нечеткий, поэтому интегральная кривая является ма-

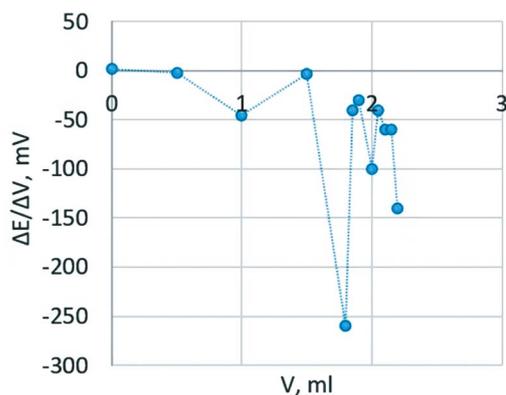


Рисунок 2. Общий вид дифференциальной кривой титрования генистеина

Figure 2. General view of the differential titration curve of genistein

лоинформативной для определения КТТ. Рекомендуется строить дифференциальную кривую (рисунок 2).

Статистическая обработка данных (таблица 2) была проведена в соответствии с ГФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента». Методика была валидирована в соответствии с ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методов» по показателям правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности [11, 14, 15]. Все выборки были проверены на нормальное распределение и был сделан вывод, что массив аналитических данных близок к нормальному, поэтому все расчеты проводились параметрическими методами. Среднее и медиана приблизительно равны. Эксцесс по модулю меньше 1, коэффициент асимметрии по модулю меньше 0,5, что в пределах нормы.

Проведена статистическая обработка данных, полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Статистическая обработка данных результатов неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением КТТ

Table 2. Statistical processing of data from the results of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of final point of titration

| Метрологические характеристики Metrological characteristics | | | | | | | |
|--|------|----------|------|-------|-----------------------------|----------------|--------|
| \bar{X} | P | $f(n-1)$ | S | S^2 | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ | ϵ , % | RSD, % |
| 98,8 | 95 % | 7 | 1,25 | 1,56 | 1,04 | 1,06 | 1,26 |

После проведения статистической обработки данных содержание вещества составило $98,8 \% \pm 1,04$.

Оценку правильности методики подтвердили результатами анализа модельных растворов, результаты представлены в таблице 3 и 4.

Критерием оценки при определении правильности служило рассчитанное значение коэффициента вариации, которое, согласно международным требованиям, должно быть не более 2 % [11].

Таблица 3. Оценка правильности методики неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением КТТ

Table 3. Evaluation of the correctness of the method of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration

| Номер образца Sample number | Введено, г Entered, g | Найдено, г Found, g | Коэффициент открываемости, % Open Rate, % |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------|--|
| 1 | 0,0505 | 0,0506 | 100,20 |
| 2 | 0,0521 | 0,0506 | 97,12 |
| 3 | 0,0503 | 0,0491 | 97,61 |
| 4 | 0,0517 | 0,0520 | 100,58 |
| 5 | 0,0506 | 0,0495 | 97,83 |
| 6 | 0,0504 | 0,0495 | 98,21 |
| 7 | 0,0502 | 0,0495 | 98,61 |
| 8 | 0,0511 | 0,0507 | 99,22 |

Таблица 4. Статистическая обработка данных по оценке правильности методики неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением КТТ

Table 4. Statistical processing of data on the assessment of the correctness of the method of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration

| Метрологические характеристики Metrological characteristics | | | | | | | |
|--|------|----------|------|-------|-----------------------------|----------------|--------|
| \bar{X} | P | $f(n-1)$ | S | S^2 | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ | $\epsilon, \%$ | RSD, % |
| 98,7 | 95 % | 7 | 1,24 | 1,53 | 1,04 | 1,05 | 1,25 |

Сходимость методики оценивалась по результатам анализа четырех отдельно приготовленных растворов, соответствующих 100 % рабочей концентрации генистеина из одного образца субстанции при одинаковых условиях проведения анализа (таблица 5). Согласно требованиям, значение коэффициента вариации при оценке сходимости должно быть не более 2,0 %. Согласно таблице 5 методика характеризуется удовлетворительной сходимостью. Значение коэффициента вариации составило 1,21 %, что менее 2 % [11].

Промежуточная прецизионность методики оценивалась при проведении анализов в разные дни и с использованием другой посуды (таблица 6). Согласно установленным требованиям, критерием оценки промежуточной прецизионности методики является коэффициента вариации, при оценке промежуточной прецизионности должно быть не более 2,0 % [11].

Согласно таблице 5 методика характеризуется удовлетворительной промежуточной прецизионностью.

При проведении ВЭЖХ была определена линейность методики на 5 модельных растворах разной концентрации генистеина, построен график линейной зависимости (рисунок 3). Значение коэффици-

ента корреляции составляет 0,9981, что отвечает условию критерия приемлемости (не менее 0,99) [11, 17]. На рисунке 4 показана хроматограмма генистеина (0,0805 мг/мл), время удерживание составило 11,59 мин.

Таблица 5. Оценка сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения генистеина

Table 5. Evaluation of the accuracy and intermediate precision of the method for the quantitative determination of genistein

| Масса навески генистеина в 1 день, г Mass of genistein in 1 day, g | Объем титранта, мл Titrant volume, ml | | Масса навески генистеина во 2 день, г Mass of genistein in 2 day, g |
|---|--|-----------------|--|
| | 1 день 1 day | 2 день 2 day | |
| 0,0506 | 2,05 | 1,8 | 0,0498 |
| 0,0504 | 2,05 | 1,75 | 0,0505 |
| 0,0502 | 2,05 | 1,75 | 0,0501 |
| 0,0511 | 2,1 | 1,75 | 0,0496 |
| \bar{X} | 2,1 | 1,8 | \bar{X} |
| S | 0,025 | 0,025 | S |
| RSD, % | 1,21 | 1,41 | RSD, % |
| $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} (P = 95 \%)$ | 0,0398 | 0,040 | $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} (P = 95 \%)$ |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была разработана методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде ДМФА. Установлено, что интегральная кривая потенциометрического титрования не обладает достаточной информативностью, так как она не позволяет определить скачок потенциала. Поэтому рекомендуется строить дифференциальную кривую титрования для определения конечной точки титрования. Валидационная оценка полученных результатов показала, что методика является правильной (RSD, % = 1,25), сходимой (RSD, % = 1,21) и внутрилабораторно прецизионной (в первый день RSD, % = 1,21, во второй день RSD, % = 1,41).

Определено, что методика неводного титрования с индикатором не позволяет получить корректные результаты, так визуально сложно установить конечную точку титрования из-за нечеткого изменения окраски.

Была разработана методика ВЭЖХ количественного определения генистеина для дальнейшего исследования БАД и лекарственных препаратов на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

- Зверев Я.Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):181–194. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.

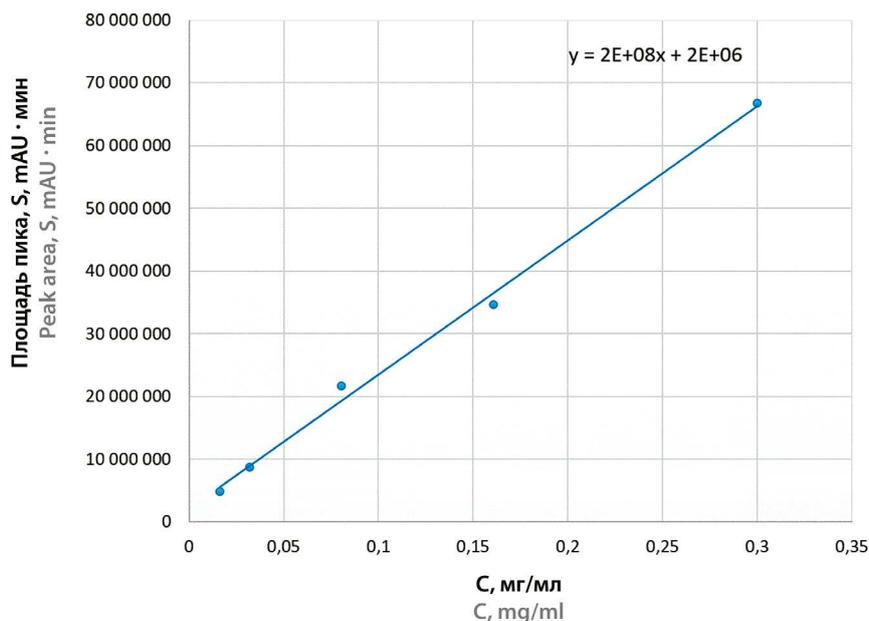


Рисунок 3. График линейность зависимости площади пика (S) от концентрации раствора генистеина

Figure 3. Graph of the linearity dependence of the peak area (S) on the concentration of the genistein solution

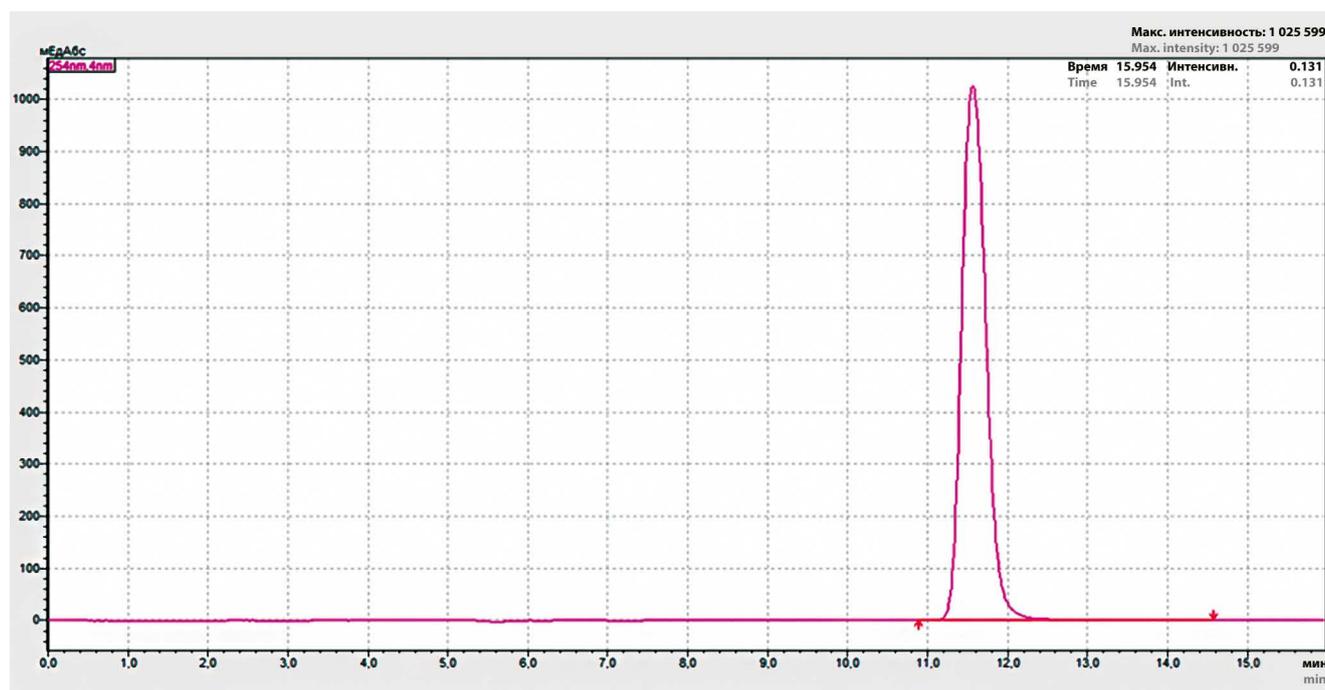


Рисунок 4. ВЭЖХ-хроматограмма генистеина (0,0805 мг/мл)

Figure 4. HPLC chromatogram of genistein (0.0805 mg/ml)

- Thangavel P, Puga-Olguín A, Rodríguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):1–17. DOI: 10.3390/molecules24213892.
- Garbiec E., Cielecka-Piontek J., Kowalówka M., Hołubiec M., Zalewski P. Genistein – opportunities related to an interesting molecule of natural origin. *Molecules*. 2022;27(3):1–22. DOI: 10.3390/molecules27030815.
- Yamagata K., Yamori Y. Potential effects of soy isoflavones on the prevention of metabolic syndrome. *Molecules*. 2021;26(19):1–20. DOI: 10.3390/molecules26195863.
- Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badruddeen, Ahsan F. An Overview on Genistein and its Various Formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
- Стрелова О. Ю., Волкова К. В., Гребенюк А. Н., Теслов Л. С. Оценка показателей качества перспективной фармацевтической

- субстанции на основе синтетического генистеина. *Бутлеровские сообщения*. 2016;48(12):94–101.
7. Леонтьев Д. А., Подпружников Ю. В., Воловик Н. В. Роль стандартных образцов в обеспечении качества лекарственных средств: регуляторные и метрологические аспекты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;3(16):180–188.
 8. Щепочкина О. Ю., Гегечкори В. И., Прокофьева В. И., Чепило Д. А., Левко А. А., Чадова Н. Н., Шестаков В. Н. Современные подходы к разработке стандартных образцов лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(7):49–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.
 9. Чикунов И. Е. Отчет о научно-исследовательской работе по теме Генистеин. Химки: ФМБА НПЦ «ФАРМЗАЩИТА»; 2012. 22 с.
 10. Жигалина А. А., Дударев В. Г., Тихонова В. В., Стрелова О. Ю. Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):20–31. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31.
 11. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ; 2018. 1814 с.
 12. Нгуен К. Б., Абышев А. З. Валидация методик количественного определения субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2н-1-добензопиран-2,2'-диола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):59–65. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-59-65.
 13. Кутюва А. М., Давыдова В. Н., Перова И. Б., Эллер К. И. Определение профиля флавоноидов в гипогликемическом сборе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Тонкие химические технологии*. 2020;15(3):39–46. DOI: 10.32362/2410-6593-2020-15-3-39-46.
 14. Старчак Ю. А., Гаврилин М. В., Шинева Н. В. Трансфер аналитических методик (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):182–187. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187.
 15. Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
 16. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
 8. Shhepochkina O. Ju., Gegechkori V. I., Prokof'eva V. I., Chepilo D. A., Levko A. A., Chadova N. N., Shestakov V. N. Modern Approaches to the Development of Drug Standards (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(7):49–54. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.
 9. Chikunov I. E. Genistein Research Report. Himki: FMBA NPC «FARMZAShITA»; 2012. 22 p. (In Russ.)
 10. Zhigalina A. A., Dudarev V. G., Tikhonova V. V., Strelova O. Yu. Development of Genistein Synthesis for Use as a Certified Reference Material. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):20–31. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31.
 11. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V. 1. M.: FEMB. 2018; 1814 p. (In Russ.)
 12. Nguyen C. B., Aбышев A. Z. Validation methods for quantitative determination of 4,4'-dimethyl-7,7'-ethylendioxy-2h-1-dibenzo-pyran-2,2'-dione substance. *Drug development & registration*. 2019;8(1):59–65. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-59-65.
 13. Kutovaya A. M., Davydova V. N., Perova I. B., Eller K. I. Flavonoid-profile determination for a hypoglycemic collection by high-performance liquid chromatography. *Fine Chem. Technol.* 2020;15(3):39–46. (In Russ.) DOI: 10.32362/2410-6593-2020-15-3-39-46.
 14. Starchak Yu. A., Gavrilin M. V., Shineva N. V. Transfer of Analytical Procedures (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(3):182–187. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187.
 15. Epshtein N. A. Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
 16. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphical and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

REFERENCE

1. Zverev Ya. F. Antitumor activity of flavonoids. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):181–194. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
2. Thangavel P., Puga-Olguín A., Rodríguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):1–17. DOI: 10.3390/molecules24213892.
3. Garbiec E., Cielecka-Piontek J., Kowalówka M., Holubiec M., Zalewski P. Genistein – opportunities related to an interesting molecule of natural origin. *Molecules*. 2022;27(3):1–22. DOI: 10.3390/molecules27030815.
4. Yamagata K., Yamori Y. Potential effects of soy isoflavones on the prevention of metabolic syndrome. *Molecules*. 2021;26(19):1–20. DOI: 10.3390/molecules26195863.
5. Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badruddeen, Ahsan F. An Overview on Genistein and its Various Formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
6. Strelova O. Ju., Volkova K. V., Grebenjuk A. N., Teslov L. S. Assessment of quality indicators of a promising pharmaceutical substance based on synthetic genistein. *Butlerovskie soobshhenija*. 2016;48(12):94–101. (In Russ.)
7. Leont'ev D. A., Podpruzhnikov Ju. V., Volovik N. V. The role of reference standards in quality assurance for medicines: regulatory and metrological aspects. *Drug development & registration*. 2016;3(16):180–188. (In Russ.)