https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79
УДК 543.865/.867

Check for updates
CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ

О. В. Тринеева*

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., д. 1

***Контактное лицо:** Тринеева Ольга Валерьевна. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 26.02.2021 **Статья принята в печать:** 06.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Как известно, подбор оптимальных условий анализа извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также лекарственных растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения, характеризующихся сложным вариабельным составом биологически активных веществ (БАВ), методом ТСХ представляет определенные трудности. Для конструирования подвижных фаз для разделения смесей БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента применяются следующие подходы: литературные источники; стандартные подвижные фазы; метод «элюирования пятна»; схема, предложенная фирмой Camag (Швейцария); модель «ПРИЗМА»; вариокамеры и др. В зарубежной литературе встречаются публикации по обобщению имеющихся экспериментальных данных по определению различных природных групп БАВ в объектах растительного происхождения. Однако в подобных обзорах не выявлены закономерности хроматографического поведения отдельных БАВ в тонком слое, а также влияние различных факторов на воспроизводимость величин R_f. Изучение возможности теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографирования групп БАВ различной полярности, позволяющих провести их разделение, идентификацию и количественное определение методом ТСХ является актуальным и мало разработанным направлением хроматографии в целом.

Цель. Целью настоящей работы являлась разработка теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения различных групп БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента.

Материалы и методы. Для исследования закономерностей хроматографического поведения в тонком слое представителей основных классов БАВ, присутствующих в ЛРС (аминокислоты, флавоноиды, дубильные вещества, простые сахара, аскорбиновая кислота, жирорастворимые витамины), было изучено значение основного фактора, влияющего на параметры эффективности хроматографического процесса – полярности элюента. В качестве объектов исследования использовали готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной, выпускаемое отечественным производителем, соответствующее требованиям нормативной документации, а также плоды облепихи крушиновидной, собранные на территории Воронежской области, согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп в свежем и высушенном виде.

Результаты и обсуждение. Установлены закономерности элюирования и математические модели, описывающие хроматографическое поведение растительных БАВ в тонком слое сорбента. По совокупности полученных результатов с позиций эффективности хроматографического процесса были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия их ТСХ-анализа. Для исследования качественного состава БАВ и достижения четкого разделения зон на хроматограммах разработаны и апробированы на изучаемом ЛРС ТСХ-методики с применением простого, фронтального или двумерного хроматографирования.

Заключение. Показано, что определение и разделение в тонком слое сорбента гидрофильных и липофильных БАВ ЛРС при совместном присутствии требует различных подходов и приемов. В работе предложен алгоритм выбора подвижной фазы и приемов хроматографирования БАВ ЛРС. Выявленные математические модели, описывающие хроматографическое поведение БАВ, позволят подбирать условия, в которых возможно определять отдельные составляющие многокомпонентных смесей без предварительного разделения. Разработанные методики определения БАВ могут быть также использованы для стандартизации и оценки качества других видов ЛРС, фитопрепаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, полярность элюента, биологически активные вещества растительного происхождения

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Автор осуществлял обзор литературы, его систематизацию и анализ, проводил экспериментальные исследования, а также написал текст статьи, в том числе заключение и обсуждение результатов.

Для цитирования: Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):69–79. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79

Development of Theoretical Approaches to Determination of the Main Groups of Biologically Active Substances of Medicinal Plant Raw Materials by TLC Method

Olga V. Trineeva*

Voronezh State University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, 1, University sq., Voronezh, 394006, Russia

***Corresponding author:** Olga V. Trineeva. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 26.02.2021 **Revised:** 06.04.2021 **Published:** 25.05.2021

© Тринеева О. В., 2021
© Trineeva O. V., 2021

Abstract

Introduction. As is known, the selection of optimal conditions for the analysis of extracts from medicinal plant raw materials (MPM), as well as medicinal herbal preparations and pharmaceutical substances of plant origin, characterized by a complex variable composition of biologically active substances (BAS) by TLC, presents certain difficulties. For the design of mobile phases for the separation of mixtures of BAS of plant origin, in a thin layer of sorbent, the following approaches are used: literary sources; standard mobile phases; spot elution method; the scheme proposed by the firm Camag (Switzerland); model "PRISMA"; variocameras and others. In foreign literature, there are publications on the generalization of the available experimental data on the determination of various natural groups of BAS in objects of plant origin. However, such reviews did not reveal the regularities of the chromatographic behavior of individual BAS in a thin layer, as well as the influence of various factors on the reproducibility of R_f values. The study of the possibility of a theoretical approach to the choice of optimal conditions for chromatography of groups of BAS of different polarity, allowing them to separate, identify and quantify by TLC is a relevant and poorly developed area of chromatography in general.

Aim. The aim of this work was to develop a theoretical approach to the choice of optimal conditions for the chromatographic separation of various groups of BAS of plant origin in a thin layer of sorbent.

Materials and methods. To study the regularities of chromatographic behavior in a thin layer of representatives of the main classes of BAS present in MPM (amino acids, flavonoids, tannins, simple sugars, ascorbic acid, fat-soluble vitamins), the value of the main factor affecting the parameters of the efficiency of the chromatographic process, the polarity of the eluent, was studied. As objects of research, we used ready-made chopped raw material of nettle leaves, produced by a domestic manufacturer, that meets the requirements of regulatory documents, as well as sea buckthorn fruits collected on the territory of the Voronezh region, according to the rules for harvesting MPM of various morphological groups in fresh and dried form.

Results and discussion. The regularities of elution and mathematical models describing the chromatographic behavior of plant BAS in a thin layer of sorbent have been established. Based on the totality of the results obtained, from the standpoint of the efficiency of the chromatographic process, the optimal conditions for their TLC analysis were selected and theoretically substantiated. To study the qualitative composition of BAS and to achieve a clear separation of zones on chromatograms, TLC methods were developed and tested on the studied MPM using simple, frontal or two-dimensional chromatography.

Conclusion. It is shown that the determination and separation in a thin layer of the sorbent of hydrophilic and lipophilic BAS of MPM in the presence of a joint requires different approaches and techniques. The paper proposes an algorithm for the selection of the mobile phase and methods of chromatography of BAS of medicinal products. The revealed mathematical models describing the chromatographic behavior of BAS will make it possible to select the conditions under which it is possible to determine the individual components of multicomponent mixtures without preliminary separation. The developed methods for the determination of BAS can also be used for standardization and quality assessment of other types of MPM, phytopreparations and pharmaceutical substances of plant origin.

Keywords: thin layer chromatography, eluent polarity, biologically active substances of plant origin

Conflict of interest. The author declares that he has no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. The author carried out a review of the literature, its systematization and analysis, and conducted experimental studies. The author wrote the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Trineeva O. V. Development of theoretical approaches to determination of the main groups of biologically active substances of medicinal plant raw materials by TLC method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):69–79. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79

ВВЕДЕНИЕ

В научной литературе давно известны и описаны примеры теоретических подходов к решению задач разделения многокомпонентных смесей [1–4] методом ТСХ. Особенные трудности представляет подбор оптимальных условий анализа извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также лекарственных растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения, которые, как известно, имеют сложный вариабельный состав биологически активных веществ (БАВ). Для конструирования подвижных фаз для разделения смесей БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента применяются следующие подходы: литературные источники; стандартные подвижные фазы; метод «элюирования пятна»; схема, предложенная фирмой Camag (Швейцария); модель «ПРИЗМА»; вариокамеры [1–3] и др. В практической работе при использовании подвижных фаз, полученных из литературных источников, для разделения определенной группы соединений необходимо учитывать: тип сорбента; марку сорбента; толщину слоя сорбента; условия промывания и активирования пластинок перед работой; тип камеры, в которой осуществлялось элюирование; насыщение камеры; время насыщения камеры, а в некоторых случаях и пластинки; температуру и относительную влажность воздуха лабораторного помещения; наличие и содержание стабилизаторов в растворителях. Только при учете всех перечисленных выше факторов можно воспроизвести разделение с приемлемым разрешением и селективностью. Наиболее широко используются схема, предложенная фирмой Camag, и модель «ПРИЗМА» [5].

Схема оптимального выбора подвижной фазы, предложенная фирмой Camag, включает четыре ступени: исследуемая смесь на первом этапе подвергается разделению в 12 растворителях, имеющих различную силу. На втором этапе производится увеличение или уменьшение силы растворителя, в слу-

чае использования которого наблюдалось разделение компонентов смеси с помощью добавления воды или *н*-гексана. На третьем этапе, в случае необходимости, добавляется модификатор кислой или основной природы в трехкомпонентную систему. На четвертом этапе производится выбор оптимальной по селективности элюирующей системы посредством вариации компонентов подвижной фазы, полученной на третьем этапе [5].

Модель «ПРИЗМА» была разработана Ш. Нейреди для подбора и оптимизации элюирующих систем в прямофазовой и обращеннофазовой планарной хроматографии. Эта модель представляет собой трехмерный вариант треугольника Л. Снайдера, который является основанием призмы. Модель дает принципиальную возможность, комбинируя составом – 2-5-компонентного элюента, осуществить разделение исследуемых смесей с высоким разрешением и селективностью. В практической работе первоначально испытывается смесь растворителей, взятая в соотношении (1:1:1), и если величины R_f компонентов исследуемой смеси лежат в диапазоне выше 0,7, то к четырехкомпонентному элюенту добавляют дополнительно *н*-гексан, а в случае $R_f < 0,2$ к элюенту добавляется вода. Затем проверяют селективность в точках 8:1:1, 1:8:1 и 1:1:8. Если полученные результаты по разделению смеси будут удовлетворительными, проверяют селективность разделения в точках 7 : 2 : 1, 2 : 7 : 1 и 1 : 2 : 7, а также в их окрестностях, добиваясь наилучшей селективности и эффективности разделения. После нахождения оптимального соотношения компонентов элюента можно провести дополнительную оптимизацию (по селективности и разрешению), увеличивая или уменьшая силу элюента и/или количество модификатора [5].

В зарубежной литературе также встречаются публикации по обобщению имеющихся экспериментальных данных по определению различных природных групп БАВ в объектах растительного происхождения [6–12]. Однако в подобных обзорах не выявлены закономерности хроматографического поведения отдельных БАВ в тонком слое, а также влияние различных факторов на воспроизводимость величин R_f.

К недостаткам таких подходов можно отнести следующее: отсутствие учета газовой фазы в хроматографической камере; трудности при разделении сильнополярных соединений, к которым относятся большинство групп растительных БАВ; расхождение между расчетными данными и результатами, полученными на практике [5], а также длительность и трудоемкость.

Изучение возможности теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографирования групп БАВ различной полярности, позволяющих провести их разделение, идентификацию и количественное определение методом ТСХ, является актуальным и мало разработанным направлением хроматографии в целом.

В связи с вышесказанным целью являлась разработка теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения различных групп БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования закономерностей хроматографического поведения в тонком слое представителей основных классов БАВ, присутствующих в ЛРС [аминокислоты, флавоноиды, дубильные вещества, простые сахара, аскорбиновая кислота, жирорастворимые витамины (ЖРВ)], было изучено значение основного фактора, влияющего на параметры эффективности хроматографического процесса – полярности элюента (*P*).

В качестве стандартных образцов для выявления закономерностей хроматографического поведения основных представителей различных групп БАВ использовались коммерчески доступные индивидуальные вещества: α-токоферол (≥ 97 %, ICN Biomedical, США), рутин (≥ 94 %, Sigma, США), ретинола ацетат (ФС 42-7811-97), эргокальциферол (ФСП 42-0008018000), β-каротин (ВФС 42-0008018000), танин, галловая кислота, кверцетин, простые сахара (рамноза, глюкоза, ксилоза, фруктоза), аскорбиновая кислота (АсК), аминокислоты (пролин, глицин, глутаминовая кислота, метионин, фенилаланин, аргинин, валин, лейцин) (≥ 98 %, ЗАО «Вектон», Россия). В работе использовали реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», Россия), отвечающие требованиям соответствующей НД. В эксперименте использованы хроматографические пластины марки Sorbfil ПТСХ-АФ-А и ПТСХ-АФ-В высокоэффективные размером 10 × 10 см (тип сорбента: силикагель СТХ-1А, СТХ-1ВЭ; зернение: 5–17, 8–12 мкм; толщина слоя: 90–120, 80–100 мкм соответственно; связующее: силиказоль). Нанесение проб осуществлялось микрошприцами (МШ-1 и МШ-10, Россия).

Выбор проявителя, позволяющего получить стойкое окрашивание с разделяемой группой БАВ, осуществляли с учетом анализа литературных источников [1–13]. Зоны БАВ на хроматограммах обнаруживали способом опрыскивания хроматограмм раствором обнаруживающего реагента с помощью пульверизатора («spraying»).

Апробация разработанных теоретических подходов к разделению изучаемых групп БАВ, а также идентификация и количественное определение были проведены на ЛРС крапивы двудомной как вида – источника гидрофильных групп БАВ и ЛРС облепихи крушиновидной, содержащего обширный спектр соединений липофильной природы. В качестве объектов исследования использовали готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной (*Folia Urticae*), выпускаемое отечественным производителем, соответствующее требованиям нормативной документации, а также плоды облепихи крушиновидной (*Fructus Hippophaae rhamnoides*), собранные на территории

Воронежской области, согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп в свежем и высушенном виде. Сушку плодов производили при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 14 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор растворителей, различающихся как по силе, так и по селективности, очень велик [1–3]. Проведена работа по подбору элюентов для определения основных природных групп БАВ (на примере основных представителей) в тонком слое сорбента. В эксперименте для исследуемых БАВ изучено более двадцати типов элюирующих систем в широком диапазоне полярности и установлены зависимости величины R_f от полярности системы (рисунок 1, а–в). Изучены элюенты, предложенные в литературе [13–18], а также новые хроматографические системы.

При детальном исследовании влияния полярности системы на величину R_f для каждого отдельного БАВ был определен интервал значений полярности элюента, в котором наблюдалась линейная зависимость (рисунок 2, а–в). Обобщенные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры установленных линейных зависимостей величины R_f БАВ от *P* системы (где $y = R_f$, а $x = P$)

Table 1. Parameters of the established linear dependences of the R_f value of the BAS on the *P* system (where $y = R_f$, and $x = P$)

№	БАВ BAS	Диапазон линейности Linearity range	R^2	Уравнение линейной зависимости Linear equation	Диапазон *P* системы для получения оптимальных величин R_f System *P* range for optimum R_f values
БАВ липофильной природы *Lipophilic BAS*					
1	β-каротин β-carotene	0–2,0	0,9756	$y = 2,5383x + 0,1729$	0,05–0,17
2	Эргокальциферол Ergocalciferol	0,58–1,10	0,9701	$y = 1,0455x – 0,5100$	0,77–1,06
3	Ретинола ацетат Retinol acetate	0,73–1,10	0,9907	$y = 0,3880x – 0,0847$	0,20–1,10
4	α-токоферол α-tocopherol	0,40–1,10	0,9830	$y = 0,9647x – 0,2976$	0,62–0,93
БАВ гидрофильной природы *BAS of hydrophilic nature*					
5	Рутин Routine	4,90–6,30	0,9740	$y = 0,4762x – 2,1095$	5,06–5,69
6	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	4,0–4,70	0,9850	$y = 0,7524x – 3,0127$	4,40–4,80
7	Аргинин Arginine	3,90–8,01	0,9545	$y = 0,1293x – 0,5408$	6,50–8,82
8	Глицин Glycine	3,90–5,54	0,9243	$y = 0,3074x – 1,2072$	4,90–5,88
9	Глутаминовая кислота Glutamic acid	5,13–6,00	0,9615	$y = 0,6191x – 2,7941$	5,00–5,48
10	Валин Valin	3,90–5,27	0,9646	$y = 0,4669x – 1,8293$	4,56–5,20
11	Лейцин Leucine	3,90–5,27	0,9789	$y = 0,5433x – 2,1007$	4,42–4,97
12	Метионин Methionine	3,90–5,27	0,9817	$y = 0,4770x – 1,8580$	4,52–5,15
13	Пролин Proline	3,90–5,54	0,9056	$y = 0,2982x – 1,1963$	5,02–6,02
14	Фенилаланин Phenylalanine	3,90–5,27	0,9851	$y = 0,5243x – 2,0039$	4,39–4,97
15	Глюкоза Glucose	5,13–6,33	0,9616	$y = 0,2321x – 0,7789$	4,65–5,94
16	Ксилоза Xylosis	4,42–5,22	0,9727	$y = 0,0750x + 0,1409$	2,12–6,12
17	Рамноза Rhamnose	3,54–4,64	0,9937	$y = 0,4367x – 1,3736$	3,83–4,52
18	Галловая кислота Gallic acid	3,54–5,36	0,9777	$y = 0,0827x + 0,5407$	До 0,72
19	Кверцетин Quercetin	4,89–5,36	0,9529	$y = 0,8792x – 4,0492$	4,95–5,29

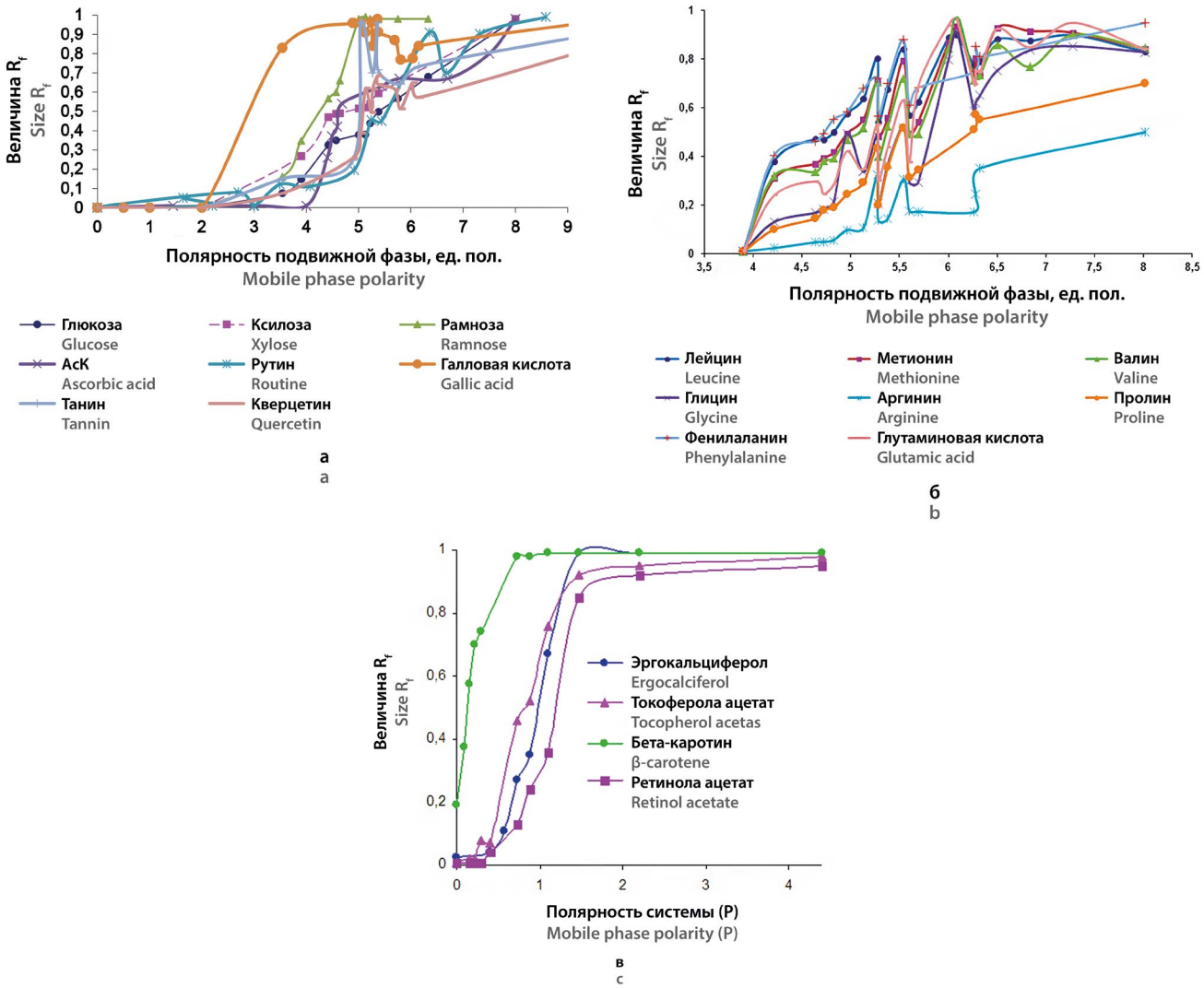

Рисунок 1. **Вид зависимости величины R_f БАВ от полярности элюента:**
а – простые сахара, полифенольные соединения, АсК; б – аминокислоты; в – ЖРВ

Figure 1. **The type of dependence of the R_f value of BAS on the polarity of the eluent:**
a – simple sugars, polyphenolic compounds, ascorbic acid; b – amino acids; c – fat-soluble vitamins

Таким образом, установлены закономерности элюирования и математические модели, описывающие хроматографическое поведение растительных БАВ в тонком слое сорбента (таблица 1). С помощью предложенных зависимостей можно подбирать различные системы для определения БАВ, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения, а также прогнозировать возможность разделения сложных многокомпонентных смесей при заданной величине полярности элюента.

По совокупности полученных результатов с позиций эффективности хроматографического процесса [высота, эквивалентная теоретической тарелке (H), и число теоретических тарелок (N), коэффициент распределения (K)] были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования изучаемых БАВ в тонком слое сорбента: элюент, проявитель, сорбент, объем пробы, чувствительность определения, полярность системы. Обобщенные данные представлены в таблице 2.

Основные параметры, отражающие эффективность хроматографирования исследуемых БАВ методом ТСХ в системах, описанных в таблице 2, представлены в таблице 3.

Таким образом, проведенные исследования показали, что определение и разделение в тонком слое сорбента гидрофильных и липофильных БАВ ЛРС при совместном присутствии требует различных подходов и приемов. Предложенный алгоритм выбора подвижной фазы и приемов проведения хроматографического анализа БАВ ЛРС приведен на рисунке 3.

Для исследования качественного состава БАВ и достижения четкого разделения зон на хроматограммах разработанные ТСХ-методики с применением простого, фронтального или двумерного хроматографирования апробированы на изучаемом ЛРС. Результаты представлены в таблице 4.

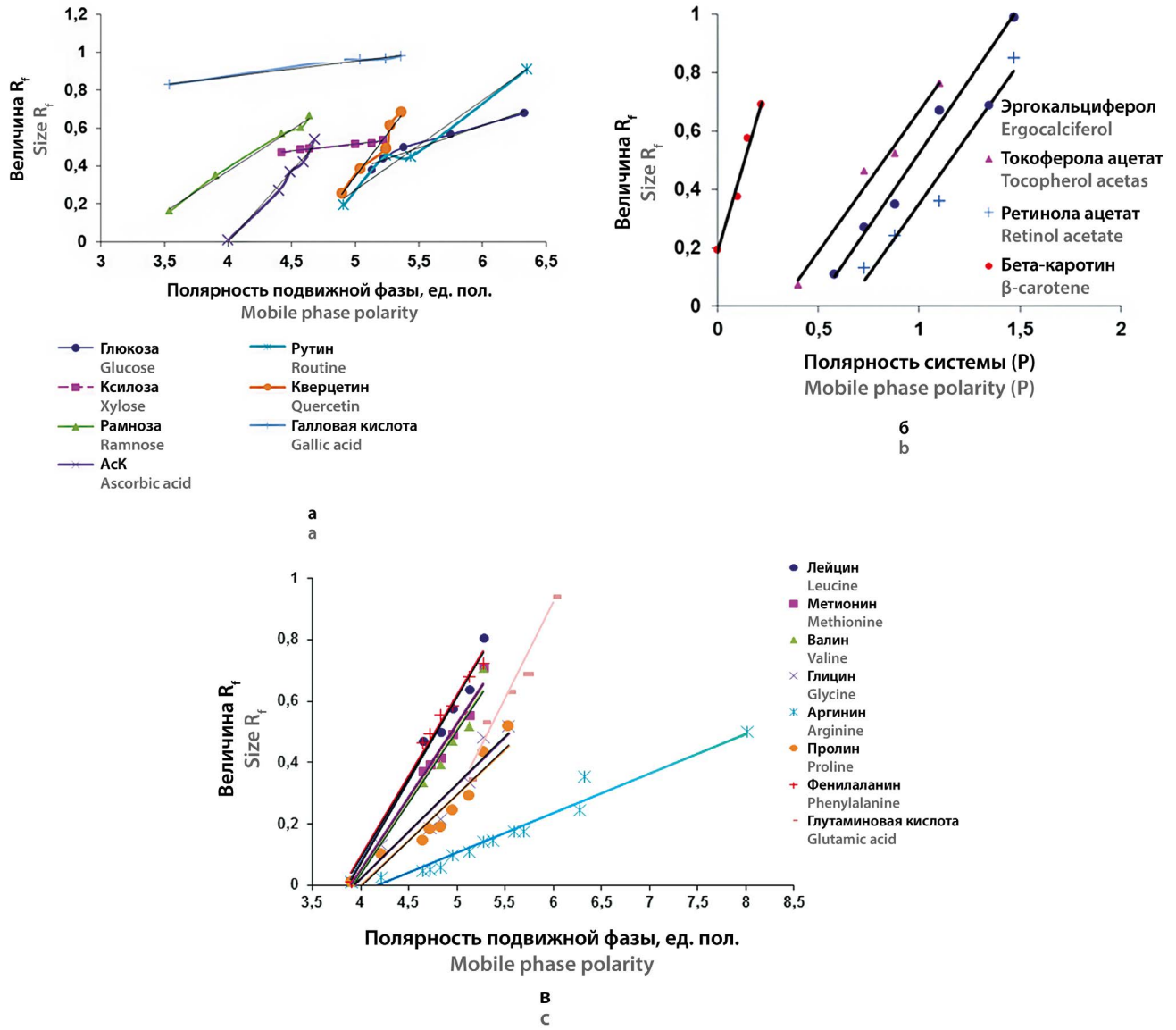

Рисунок 2. **Линейные зависимости величины R_f БАВ от значения полярности элюента:**
а – простые сахара, полифенольные соединения, АсК; б – ЖРВ; в – аминокислоты

Figure 2. **Linear dependences of the R_f value of BAS on the polarity of the eluent:**
a – simple sugars, polyphenolic compounds, ascorbic acid; b – fat-soluble vitamins; c – amino acids

Для проведения количественного определения БАВ в исследуемом ЛРС при совместном присутствии с применением различных вариаций разработанных ТСХ-методик на следующем этапе сразу же после проявления хроматографических зон на калибровочных хроматограммах с сериями стандартных растворов пластины сканируют и обрабатывают компьютерной программой Sorbfil Videodensitometer (ЗАО «Сорбполимер», Россия). Установлены линейные зависимости между содержанием БАВ (*x*) и площадью хроматографической зоны (*y*) в диапазоне изучаемых концентраций. Разработанные методики количественной оценки данных ТСХ были апробированы на изучаемом ЛРС. Характеристики методик и результаты определения представлены в таблице 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенная в данной работе возможность теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения различных групп БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента дает воспроизводимые результаты и позволяет с минимальными затратами решать поставленные задачи. Проведенные исследования, в зависимости от целей и объекта анализа, позволяют подбирать условия, в которых возможно определять отдельные БАВ в сложных многокомпонентных смесях без предварительного разделения на отдельные компоненты.

Таблица 2. Характеристики разработанных методик разделения и идентификации изучаемых БАВ в тонком слое сорбента

Table 2. Characteristics of the developed methods of separation and identification of the studied BAS in a thin layer of sorbent

№	БАВ BAS	Условия анализа Analysis conditions				
		Элюент Eluent	Детектирующий реагент Detection reagent	R_f	*P*	ПО, г Detection limit, g
БАВ липофильной природы *Lipophilic BAS*						
1	β-каротин β-carotene	гексан : бензол (29:1) hexane : benzene (29:1)	–	0,38 ± 0,01	0,10	$1 \cdot 10^{-5}$
2	Эргокальциферол Ergocalciferol	гексан : хлороформ (4:1) hexane : chloroform (4:1)	5%-й спиртовый раствор ФМК 5 % alcohol solution of phosphoromolybdic acid	0,35 ± 0,01	0,88	$7 \cdot 10^{-9}$
3	Ретинола ацетат Retinol acetate	гексан : хлороформ (3:1) hexane : chloroform (3:1)	10%-й спиртовый раствор ФМК с конц. хлористоводородной кислотой (25:1) 10 % alcohol solution of phosphoromolybdic acid with concentrated hydrochloric acid (25:1)	0,36 ± 0,01	1,10	$1 \cdot 10^{-7}$
4	α-токоферол α-tocopherol	хлороформ chloroform	конц. азотная кислота concentrated nitric acid	0,59 ± 0,02	4,40	$1 \cdot 10^{-6}$
5	ЖРВ при совместном присутствии Fat solubile vitamins with joint presence	элюент 1 (высота пробега 8 см) – гексан : хлороформ (19:1); элюент 2 (высота пробега 6 см) – гексан : хлороформ (3:1) eluent 1 (run height 8 cm) – hexane : chloroform (19:1); eluent 2 (run height 6 cm) – hexane : chloroform (3:1)	5%-й спиртовый раствор ФМК 5 % alcohol solution phosphoromolybdic acid	–	элюент 1 – 0,22; элюент 2 – 1,10 eluent 1 – 0.22; eluent 2 – 1.10	–
БАВ гидрофильной природы *BAS of hydrophilic nature*						
6	Рутин Routine	этилацетат : ледяная уксусная кислота : вода (7,5:1,5:1,5) ethylacetate : glacial acetic acid : water (7.5:1.5:1.5)	5%-й спиртовый раствор NaOH 5 % alcohol solution of NaOH	0,46 ± 0,01	5,24	$5 \cdot 10^{-7}$
7	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	этилацетат : ледяная уксусная кислота (85:15) ethylacetate : glacial acetic acid (85:15)	5%-й спиртовый раствор ФМК или 0,2%-й спиртовый раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия 5 % alcohol solution of phosphomolybdic acid or 0.2 % alcohol solution of 2.6-sodium dichlorophenolindophenolate	0,42 ± 0,01	4,59	$4 \cdot 10^{-7}$
8	Аргинин Arginine	*н*-бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2) *n*-butanol : acetic acid : water (4:1:2)	1%-й спиртовый раствор нингидрина 1 % alcohol solution of ninhydrin	0,55 ± 0,02	5,13	$1 \cdot 10^{-8}$
9	Глицин Glycine			0,29 ± 0,02		$1 \cdot 10^{-8}$
10	Глутаминовая кислота Glutamic acid			0,68 ± 0,01		$1 \cdot 10^{-8}$
11	Валин Valin			0,11 ± 0,01		$5 \cdot 10^{-8}$
12	Лейцин Leucine			0,34 ± 0,01		$3 \cdot 10^{-8}$
13	Метионин Methionine			0,35 ± 0,01		$3 \cdot 10^{-8}$
14	Пролин Proline			0,52 ± 0,01		$10 \cdot 10^{-8}$
15	Фенилаланин Phenylalanine			0,64 ± 0,02		$3 \cdot 10^{-8}$
16	Глюкоза Glucose	*н*-бутанол : ледяная уксусная кислота : вода (4:1:2) *n*-butanol : glacial acetic acid : water (4:1:2)	сульфаниламид и *о*-фталевая кислота sulfanilamide and *o*-phthalic acid	0,29 ± 0,02	5,69	$2,5 \cdot 10^{-6}$
17	Ксилоза Xylosis			0,45 ± 0,01		$2,5 \cdot 10^{-6}$
18	Рамноза Rhamnose			0,55 ± 0,02		$5 \cdot 10^{-6}$

Окончание таблицы 2

№	БАВ BAS	Условия анализа Analysis conditions				
		Элюент Eluent	Детектирующий реагент Detection reagent	R_f	*P*	ПО, г Detection limit, g
19	Галловая кислота Gallic acid	элюент 1 (высота пробега 9 см) – диэтиловый эфир : уксусная кислота : гексан : этилацетат (20:20:20:40); элюент 2 (высота пробега 7 см) – этилацетат : муравьиная кислота : уксусная кислота : вода (67:7,5:7,5:18) eluent 1 (run height 9 cm) – diethyl ether : acetic acid : hexane : ethyl acetate (20:20:20:40); eluent 2 (run height 7 cm) – ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water (67:7.5:7.5:18)	1%-й спиртовый раствор железо-аммонийных квасцов 1 % alcoholic solution of ammonium iron alum	элюент 1 – 0,83 ± 0,02 eluent 1 – 0.83 ± 0.02	элюент 1 – 3,54; элюент 2 – 9,68 eluent 1 – 3.54; eluent 2 – 9.68	$3 \cdot 10^{-7}$
20	Кверцетин Quercetin			элюент 1 – 0,08 ± 0,01; элюент 2 – 0,84 ± 0,02 eluent 1 – 0.08 ± 0.01; eluent 2 – 0.84 ± 0.02		$1 \cdot 10^{-6}$
21	Танин Tannin			элюент 1 – 0,15 ± 0,01; элюент 2 – 0,91 ± 0,01 eluent 1 – 0.15 ± 0.01; eluent 2 – 0.91 ± 0.01		$5,5 \cdot 10^{-7}$

Примечание. *P* – полярность системы, рассчитанная по Л. Снайдеру; ПО – предел обнаружения.

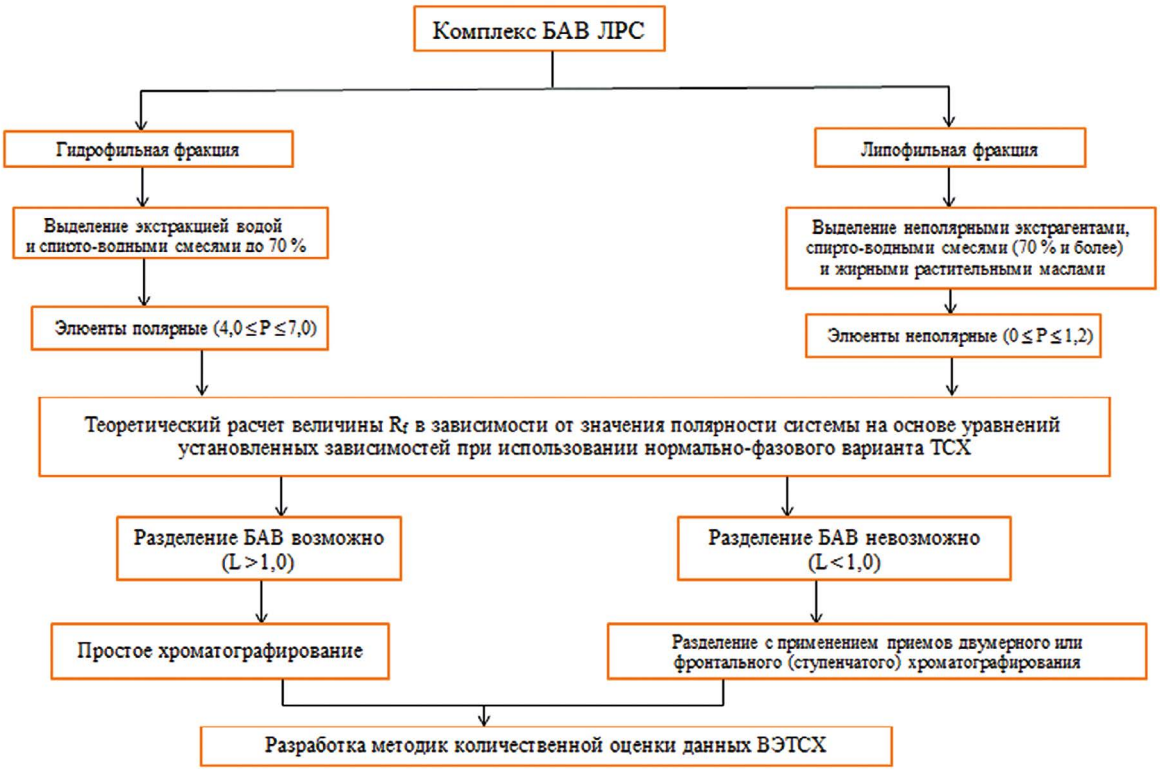

Рисунок 3. Алгоритм выбора подвижной фазы и приемов проведения хроматографического определения и разделения БАВ ЛРС (L – коэффициент селективности сорбции, показывающий эффективность разделения зон на хроматограммах в ТСХ)

Разработанные новые, простые в исполнении, экономически доступные, экспрессные методики разделения, идентификации и количественного определения БАВ с применением различных вариаций метода ВЭТСХ могут быть также использованы для стандартизации и оценки качества других видов ЛРС (апробированы на примере сырья крапивы двудомной и облепихи крушиновидной), фитопрепаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения.

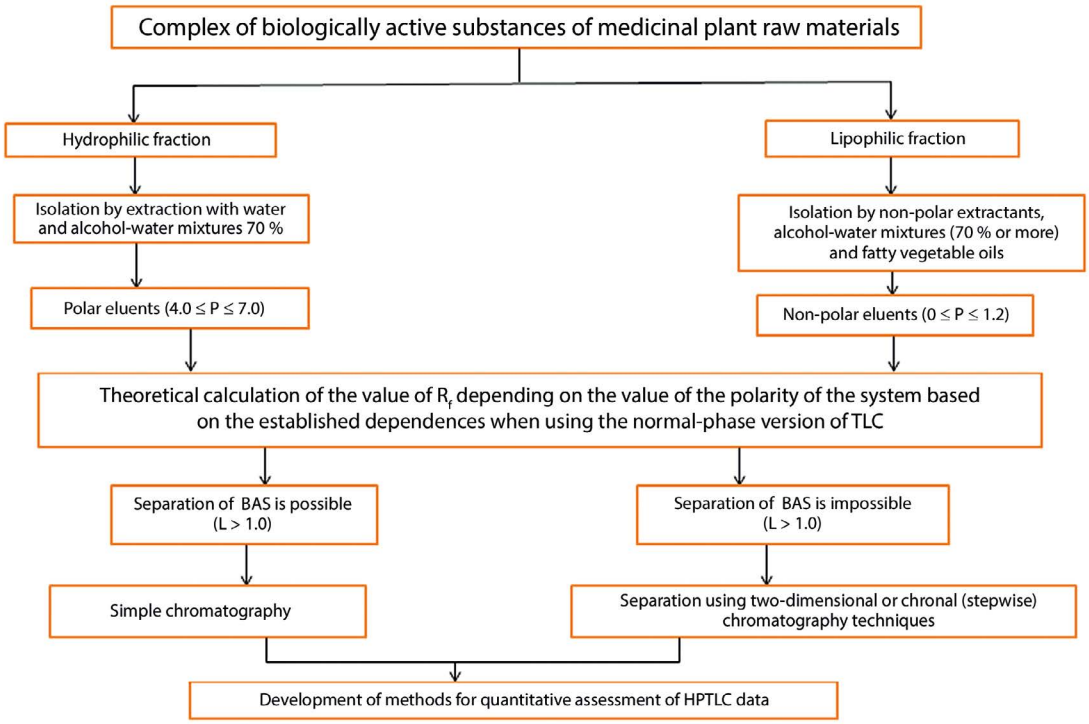

Figure 3. Algorithm for the selection of the mobile phase and methods for the chromatographic determination and separation of BAS of MPM (L is the coefficient of selectivity of sorption, showing the efficiency of separation of zones on chromatograms in TLC)

Таблица 3. Параметры эффективности хроматографирования исследуемых БАВ методом ТСХ

Table 3. Parameters of the efficiency of chromatography of the studied BAS by TLC

№	БАВ BAS	H, мм	N	K
1	β-каротин β-carotene	0,78	108,97	0,38 ± 0,01
2	α-токоферол α-tocopherol	0,55	156,00	0,69 ± 0,02
3	Рутин Routine	0,71	100,80	0,46 ± 0,01
4	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	0,10	767,00	0,42 ± 0,01
5	Глюкоза Glucose	0,70	127,14	0,29 ± 0,02
6	Ксилоза Xylosis	0,42	211,90	0,45 ± 0,01
7	Рамноза Rhamnose	0,35	254,29	0,55 ± 0,02
8	Аргинин Arginine	0,44	179,55	0,11 ± 0,01
9	Глицин Glycine	0,89	87,64	0,34 ± 0,01
10	Глутаминовая кислота Glutamic acid	0,36	186,11	0,35 ± 0,01
11	Валин Valine	0,37	210,81	0,52 ± 0,01
12	Лейцин Leucine	0,17	458,82	0,64 ± 0,02
13	Метионин Methionine	0,35	222,86	0,55 ± 0,02
14	Пролин Proline	0,30	256,67	0,29 ± 0,02
15	Фенилаланин Phenylalanine	0,65	116,92	0,68 ± 0,01

ЛИТЕРАТУРА

1. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир; 1999. 405 с.
2. Красиков В. Д. Основы планарной хроматографии. СПб.: Химиздат; 2005. С. 45–52.
3. Мелькина О., Манухов И., Антонова С., Пушков А., Малахова И., Красиков В., Яненко А., Синевкий С. Определение L-гомосерина в культуральных жидкостях: экспресс-метод на основе ВЭТСХ. *Аналитика*. 2013;6(13):28–34.
4. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative thin-layer chromatography. Heidelberg: *Springer*. 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-10729-0.
5. Trineeva O. V., Safonova E. F., Sinkevich A. V., Slivkin A. I. Assay of amino acids in medicinal plants by TLC (using stinging nettle leaves and common sea buckthorn fruits as examples). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(5):323–328. DOI: 10.1007/s11094-015-1278-9.
6. Kagan I. A., Flythe M. D. Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;85:51411. DOI: 10.3791/51411.
7. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2676–2683. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
8. Zaushintsena A., Milentyeva I., Babich O., Noskova S., Kiseleva T., Popova D., Bakin I., Lukin A. Quantitative and qualitative profile of biologically active substances extracted from purple echinacea (Echinacea Purpurea L.) growing in the Kemerovo region: functional foods application. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(1):84–92. DOI: 10.21603/2308-4057-2019-1-84-92.
9. Tomczyk M., Bazylko A., Staszewska A. Determination of polyphenolics in extracts of Potentilla species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis*. 2009;21(2):174–179. DOI: 10.1002/pca.1174.
10. Trifonova O. V., Evdokimova O. V., Sadchikova N. P., Matyushin A. A. Biologically active substances in Bidens tripartita L. J. changes in quantitative and qualitative composition of during granulation process. *Pharm. Sci. & Res*. 2018;10(11):2872–2875.

Таблица 4. Идентификация зон БАВ на хроматограммах извлечений из ЛРС

Table 4. Identification of BAS zones on chromatograms of extracts from MPM

№	БАВ BAS	Объекты исследования Research objects		
		Листья крапивы двудомной Nettle leaves	Плоды облепихи крушиновидной высушенные Dried sea buckthorn fruits	Плоды облепихи крушиновидной свежие Fresh sea buckthorn fruits
1	Органические кислоты Organic acids	Щавелевая, винная, аскорбиновая кислота Oxalic, tartaric, ascorbic acid	Щавелевая, винная, лимонная, яблочная, аскорбиновая кислота Oxalic, tartaric, citric, malic, ascorbic acid	Щавелевая, винная, яблочная, аскорбиновая кислота Oxalic, tartaric, malic, ascorbic acid
2	Флавоноиды Flavonoids	Рутин, кверцетин Rutin, quercetin	Рутин, гиперозид, кверцетин Rutin, hyperoside, quercetin	
3	Аминокислоты Amino acids	Аргинин, пролин, глицин, глутаминовая кислота, валин, лейцин, фенилаланин Arginine, proline, glycine, glutamic acid, valine, leucine, phenylalanine	Аргинин, пролин, глицин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин Arginine, proline, glycine, glutamic acid, leucine, phenylalanine	Пролин, глицин, глутаминовая кислота, лейцин Proline, glycine, glutamic acid, leucine
4	Дубильные вещества Tannins	Танин, галловая кислота Tannin, gallic acid	Галловая кислота Gallic acid	
5	Простые сахара Simple sugars	Глюкоза, ксилоза, рамноза Glucose, xylose, rhamnose		

Таблица 5. Параметры разработанных методик ТСХ для идентификации и количественного определения БАВ в ЛРС (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

Table 5. Parameters of the developed TLC methods for identification and quantitative determination of biologically active substances in medicinal product (in terms of absolutely dry raw materials)

№	БАВ BAS	Диапазон линейности, мг/мл Linearity range mg/ml	R^2	Уравнение прямой Linear equation	Результаты определения БАВ, % BAS determination results, %	
					Листья крапивы двудомной Nettle leaves	Плоды облепихи крушиновидной высушенные Dried sea buckthorn fruits
1	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	1,5–4,5	0,9941	$y = 9233{,}6x - 1550{,}1$	0,053 ± 0,015	0,047 ± 0,001
2	Глутаминовая кислота Glutamic acid	0,5–3,5	0,9707	$y = 18190x + 13560$	0,011 ± 0,001	0,330 ± 0,036
3	Кверцетин Quercetin	1,0–6,0	0,9916	$y = 3{,}6734x + 1{,}1792$	0,643 ± 0,040	–
4	Танин Tannin	0,5–4,5	0,9721	$y = 4{,}4805x + 0{,}7287$	0,724 ± 0,016	–
		5,0–7,0	0,9531	$y = 6{,}0083x - 0{,}1537$		
5	Галловая кислота Gallic acid	0,3–1,5	0,9660	$y = 16{,}601x - 5{,}3268$	0,579 ± 0,056	0,041 ± 0,001
		1,5–4,0	0,9154	$y = 4{,}8778x + 13{,}128$		
6	Глюкоза Glucose	15,0–35,0	0,9947	$y = 16{,}327x - 158{,}66$	14,070 ± 1,263	35,569 ± 3,446
7	Ксилоза Xylose	15,0–30,0	0,9744	$y = 3{,}7854x + 23{,}337$	0,273 ± 0,056	Менее 0,05 %
8	Рамноза Ramnose	10,0–30,0	0,9734	$y = 3{,}3692x + 8{,}744$	2,315 ± 0,131	1,705 ± 0,098

11. Ramu B., Chittela K. B. High performance thin layer chromatography and its role pharmaceutical industry: Review. *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018;5(3):29–34.
12. Creţu G., Morlock G. E., Grosu A. R., Nechifor A. C. A high-performance thin-layer chromatographic method for chlorogenic acid and hyperoside determination from berry extracts. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013;18(5):8657–8665.
13. Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дисс. ... д-р фарм. наук. Москва; 2017. 441 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/teoreticheskie-i-metodologicheskie-podkhody-k-standartizatsii-i-otsenke-kachestva-lekarstven. Ссылка активна на 26.03.2021.
14. Rybakova O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determining tocopherols by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(8):471–474. DOI: 10.1007/s11094-008-0152-4.
15. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Quantitative determination of rutin by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(2):134–138. DOI: 10.1007/s11094-014-1064-0.
16. Checheta O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Thin-layer chromatography characteristics of β-carotene. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(5):321–323. DOI: 10.1007/s11094-012-0790-4.
17. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Separation and determination of a mixture of fat-soluble vitamins A, D_2, and E and β-carotene by gradient thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(2):120–125. DOI: 10.1007/s11094-016-1408-z.
18. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Development of a technique for codetermination of tannin and gallic acid in medicinal plant raw material. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):361–367. DOI: 10.1007/s11094-019-02006-y.

REFERENCES

1. Gejss F. *Osnovy tonkoslojnoj hromatografii* [Fundamentals of thin layer chromatography]. Moscow: Mir; 1999. 405 p. (In Russ.)
2. Krasikov V. D. Osnovy planarnoj hromatografii [Fundamentals of Planar Chromatography]. St. Petersburg: Himizdat; 2005. P. 45–52. (In Russ.)
3. Melkina O., Manukhov I., Antonova S., Pushkov A., Malakhova I., Krasikov V., Yanenko A., Sineokii S. *Opredelenie L-gomoserina v kul'tural'nykh zhidkostyakh: ekspress-metod na osnove VETSKh* [Determination of L-Homoserine in Cultural Broths Using Hptlc As an Express Method]. *Analitika = Analytics*. 2013;6(13):28–34. (In Russ.)
4. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative thin-layer chromatography. Heidelberg: *Springer*. 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-10729-0.
5. Trineeva O. V., Safonova E. F., Sinkevich A. V., Slivkin A. I. Assay of amino acids in medicinal plants by TLC (using stinging nettle leaves and common sea buckthorn fruits as examples). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(5):323–328. DOI: 10.1007/s11094-015-1278-9.
6. Kagan I. A., Flythe M. D. Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;85:51411. DOI: 10.3791/51411.
7. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2676–2683. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
8. Zaushintsena A., Milentyeva I., Babich O., Noskova S., Kiseleva T., Popova D., Bakin I., Lukin A. Quantitative and qualitative profile of biologically active substances extracted from purple echinacea (Echinacea Purpurea L.) growing in the Kemerovo region: functional foods application. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(1):84–92. DOI: 10.21603/2308-4057-2019-1-84-92.
9. Tomczyk M., Bazylko A., Staszewska A. Determination of polyphenolics in extracts of Potentilla species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis*. 2009;21(2):174–179. DOI: 10.1002/pca.1174.
10. Trifonova O. V., Evdokimova O. V., Sadchikova N. P., Matyushin A. A. Biologically active substances in Bidens tripartita L. J. changes in quantitative and qualitative composition of during granulation process. *Pharm. Sci. & Res*. 2018;10(11):2872–2875.
11. Ramu B., Chittela K. B. High performance thin layer chromatography and its role pharmaceutical industry: Review. *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018;5(3):29–34.
12. Creţu G., Morlock G. E., Grosu A. R., Nechifor A. C. A high-performance thin-layer chromatographic method for chlorogenic acid and hyperoside determination from berry extracts. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013;18(5):8657–8665.
13. Trineeva O. V. *Teoreticheskie i metodologicheskie podkhody k standartizatsii i otsenke kachestva lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i maslyanykh ekstraktov na ego osnove* [Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant raw materials and oil extracts based on it] [dissertation]. Moscow; 2017. 441 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/teoreticheskie-i-metodologicheskie-podkhody-k-standartizatsii-i-otsenke-kachestva-lekarstven. Accessed: 26.03.2021. (In Russ.)
14. Rybakova O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determining tocopherols by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(8):471–474. DOI: 10.1007/s11094-008-0152-4.
15. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Quantitative determination of rutin by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(2):134–138. DOI: 10.1007/s11094-014-1064-0.
16. Checheta O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Thin-layer chromatography characteristics of β-carotene. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(5):321–323. DOI: 10.1007/s11094-012-0790-4.
17. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Separation and determination of a mixture of fat-soluble vitamins A, D_2, and E and β-carotene by gradient thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(2):120–125. DOI: 10.1007/s11094-016-1408-z.
18. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Development of a technique for codetermination of tannin and gallic acid in medicinal plant raw material. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):361–367. DOI: 10.1007/s11094-019-02006-y.