

О. В. Тринеева, И. И. Сафонова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Разработана экономичная и экспрессная методика идентификации и количественного определения рутина методом хроматографии в тонком слое сорбента, которая может быть рекомендована к апробации и использованию в фармацевтической, косметологической и пищевой отраслях промышленности. Экспериментально подобраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования рутина в тонком слое сорбента с количественной интерпретацией данных ВЭТСХ на персональном компьютере.

**Ключевые слова:** рутин; количественное определение; высокоэффективная тонкослойная хроматография.

Биофлавоноиды — обязательные компоненты пищи человека и животных, и их недостаток в рационах вызывает нарушения в организме, проявляющиеся в основном повышенной ломкостью и хрупкостью капиллярных стенок [1]. Наибольшее распространение в клинической практике из этого обширного класса природных соединений получил рутин [1 – 5].

Анализ литературы за последние 10 лет показал, что при контроле качества лекарственных препаратов, содержащих рутин, предпочтение отдается физико-химическим методам, как наиболее экспрессным, чувствительным и информативным, которые имеют ряд существенных преимуществ в сравнении, например, с гравиметрическими и титриметрическими методами. К таким методам относятся фотоэлектроколориметрия, спектрофотометрия, денситометрия с использованием хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента [6 – 16]. Хроматография используется как для очистки, так и для разделения суммы флавоноидов на отдельные компоненты [17 – 19]. Фотоколориметрический метод основан на цветных реакциях флавоноидов с солями различных металлов (алюминия, циркония, титана, хрома, сурьмы), с лимонно-борным реактивом и на реакции восстановления цинком или магнием в кислой среде [6 – 16]. Известна цветная реакция флавоноидов с азотнокислым и уксуснокислым уранилом, позволяющая количественно определять рутин в смеси с кверцетином. Сравнительно редко для количественного определения флавоноидов применяют полярографию и метод амперометрического титрования [20].

Более объективный качественный и количественный анализ позволяют получить хроматографические методы, из которых наибольшее распространение получила ВЭЖХ — быстрый и точный метод анализа витаминов, в том числе и рутина. Однако следует отметить, что высокая стоимость оборудования существенно ограничивает практическое использование метода ВЭЖХ. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) в настоящее время в фармацевтическом анализе применяют для оценки подлинности и чистоты субстанций и

лекарственных форм. В последнее время стали появляться публикации, свидетельствующие о возможности количественного анализа данных ТСХ с применением специализированного программного обеспечения. Развитие возможности количественной интерпретации данных ТСХ может способствовать дальнейшему распространению этого метода, как альтернативного ВЭЖХ, обладающего всеми преимуществами хроматографического анализа [21 – 28].

Целью настоящей работы являлась разработка методики идентификации и количественного определения рутина методом хроматографии в тонком слое сорбента.

В ТСХ на процесс хроматографирования влияют существенным образом растворитель, сорбент и условия анализа. Поэтому на первом этапе работы были экспериментально выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования рутина методом ТСХ.

Для визуальной оценки качества разделения хроматографическую пластину после проведения элюирования необходимо обработать каким-либо проявителем. Выбор проявителя (табл. 1) осуществляли с учетом таких требований как специфичность, чувствительность, доступность, высокое качество получаемой картины, а также контрастностью хроматографических зон и фона, что может позволить проводить дальнейший количественный анализ с применением сканирующих устройств. В качестве реагентов для обнаружения пятен рутина были использованы пары аммиака; 5 % спиртовой раствор  $AlCl_3$ ; 5 % водный раствор  $NaOH$ ; 5 % спиртовой раствор фосфомолибденовой кислоты (ФМК); 10 % спиртовой раствор  $NaOH$ . Впервые в качестве проявителя был выбран 5 % спиртовой раствор  $NaOH$ , который с рутином образует окрашенное в желто-оранжевый цвет соединение — халкон. Кроме того, обработанные этим реагентом хроматограммы не изменяют интенсивности окраски с течением времени (более 30 дней). Этот детектирующий агент — высокочувствительный, специфичный и доступный. Хроматограмму равномерно

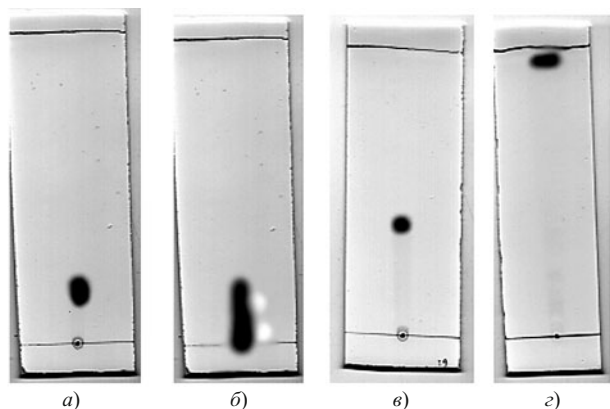


Рис. 1. Хроматограммы, полученные в элюирующих системах (табл. 2): а) 1; б) 4; в) 7; г) 9.

обрабатывают реагентом из пульверизатора и высушивают в сушильном шкафу при температуре 80 °С в течение 3 – 5 мин до проявления хроматографических зон. Нами также установлено, что предел обнаружения пятен рутина с помощью выбранного детектирующего реагента составил  $5 \cdot 10^{-7}$  г. Предел количественного определения составил 1 мкл раствора с содержанием рутина 0,0005 г/мл.

При исследовании сложных биологически активных веществ, к которым относятся и флавоноиды, оптимальные условия разделения подбираются экспериментально с учетом влияния различных факторов: концентрации раствора, соотношения растворителей в элюенте, типа пластин для ТСХ и т.д.

Наибольшее влияние на разделения веществ в тонком слое сорбента оказывает растворитель [29]. Состав элюента играет важнейшую роль при проведении анализа методом ТСХ, так как различные растворители по-разному влияют на хроматографическую подвижность рутина. Было изучено 12 типов элюирующих систем с различными значениями полярности (табл. 2). В эксперименте исследовали системы, предложенные в литературе [6, 9, 11, 17 – 19]. Полученные хроматограммы представлены на рис. 1.

Расчитав величину полярности подвижных фаз (Р), представленных в литературе, получали зависимость значения относительной подвижности рутина

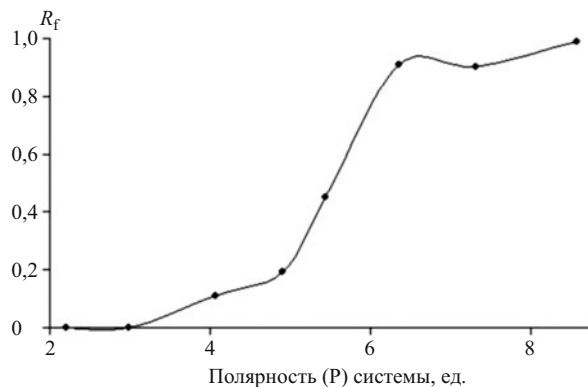


Рис. 2. Зависимость значения относительной подвижности рутина от полярности элюента.

от полярности элюента (рис. 2). Вид кривой свидетельствует о том, что существуют интервалы полярности системы от 0 до 3,0 и от 3,3 до 4,5, в которых величина  $R_f$  практически не меняется. В диапазоне от 0 до 3,0 при использовании нормально-фазового варианта ТСХ (силикагелевые пластинки) рутин прочно удерживается сорбентом, не перемещаясь с линии старта. При достижении полярности элюента 7,5 и более рутин перестает удерживаться сорбентом и перемещается с током подвижной фазы ( $R_f \rightarrow 1$ ). Следовательно, наиболее оптимальные величины  $R_f$  (0,3 – 0,6) [29] можно получить при использовании систем с узким интервалом полярности от 5,0 до 6,0 единиц.

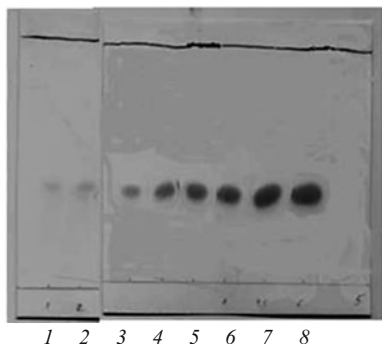
На хроматограммах для каждой элюирующей системы были рассчитаны такие хроматографические параметры, как величина относительной скорости перемещения рутина ( $R_f$ ); высота, эквивалентная теоретической тарелке (Н); число теоретических тарелок (N) [29]. Данные табл. 2 показывают, что наибольшая эффективность хроматографического процесса, согласно значениям величин N и Н, наблюдалась в системах 2, 5, 7, 9 и 10, а наименьшая — в системах 8 и 11. Параметры N и Н взаимосвязаны между собой нелинейной обратно пропорциональной зависимостью. Оптимальные величины  $R_f$  достигнуты в системах 7 и 8.

Несмотря на то, что в системах 5, 9 и 10 величины N имеют большее значение, чем в системах 2 и 7, качество зон на хроматограммах значительно хуже, и, следовательно, затруднена их обработка. Хроматографирование можно проводить в системах 2 и 7. Лучшее значение  $R_f$  и качество хроматографических зон было достигнуто в системе 7 (рис. 3). В данном элюенте зоны рутина имели округлую форму, что свидетельствует о линейной изотерме сорбции. Для количественной обработки хроматограмм методом компьютерного сканирования целесообразно применять систему 7.

Таким образом, по совокупности полученных результатов были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования рутина в тонком слое сорбента: сорбент — силикагелевые пластинки марки “Sorbfil” 5 × 10 см с полимерной подложкой ПТСХ-П-А-УФ; элюент — этилацетат — ледяная уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5); проявитель

Таблица 1  
Характеристика детектирующих реагентов для определения рутина в тонком слое сорбента

Детектирующий реагент	Окрашивание хроматографических зон	
	в видимом свете	в УФ-свете
Без проявителя	светло-желтое	желто-коричневое
Пары аммиака	—	красно-коричневое
5 % водный раствор NaOH	желто-оранжевое	желто-оранжевое
5 % спиртовой раствор $AlCl_3$	светло-желтое	красно-коричневое
10 % спиртовой раствор NaOH	желто-оранжевое	желто-коричневое
5 % спиртовой раствор ФМК	сине-зеленое	—

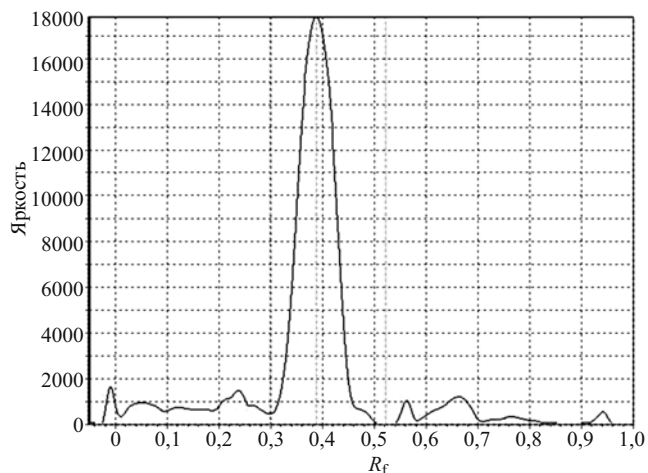


**Рис. 3.** Калибровочная хроматограмма с серией стандартных растворов рутина ( $c = 0,05 - 2\%$ ): 1 – 0,05 %; 2 – 0,1 %; 3 – 0,25 %; 4 – 0,5 %; 5 – 0,75 %; 6 – 1 %; 7 – 1,5 %; 8 – 2 % (подвижная фаза: этилацетат — ледяная уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5)).

— 10 % спиртовый раствор NaOH; оптимальный объем пробы — 3 мкл спиртового раствора с содержанием рутина 2 мг/мл; время насыщения камеры парами элюента — 20 мин; время элюирования — 35 мин; время выдерживания пластинки в термостате при  $t \geq 80^\circ\text{C}$  — 3 – 5 мин; чувствительность методики  $5 \cdot 10^{-7}$  г.

В представленных выше условиях хроматографирования получены хроматограммы с серией стандартных растворов рутина, представленные на рис. 3. Сразу же после проявления хроматографических зон, пластины были отсканированы с помощью планшетного сканера EPSON PERFECTION 2480 PHOTO, а полученные изображения (рис. 3) обработаны с помощью компьютерной программы “Sorbfil Videodensitometer” [23, 26, 27]. В результате получены треки в координатах  $R_f$  — интенсивность (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдается нелинейная зависимость площади хроматографической зоны рутина от концентрации стандартного раствора с точкой перегиба 0,5 % (рис. 5).



**Рис. 4.** Денситограмма 0,5 % стандартного раствора рутина (подвижная фаза: этилацетат — ледяная уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5)).

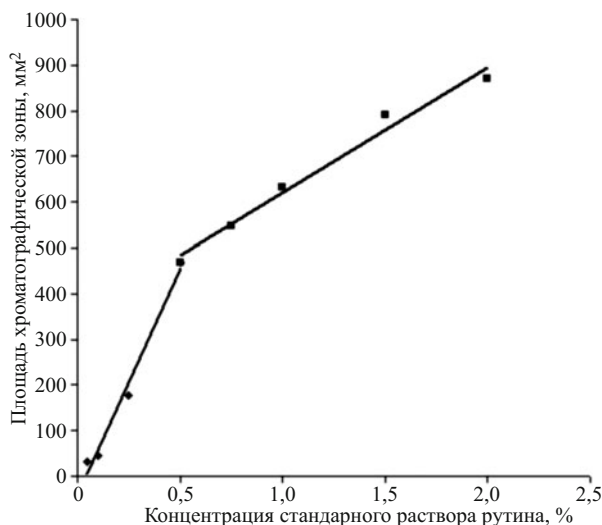
Анализ полученных данных позволил установить линейную зависимость между содержанием рутина и интенсивностью окраски хроматографической зоны в диапазоне изучаемых концентраций (0,05 – 0,5 и 0,5 – 2,0 %). Исходя из полученных результатов, построены градуировочные графики, иллюстрирующие эту зависимость (рис. 6 и 7).

Наличие точки перегиба объясняется снижением коэффициента инструментальной чувствительности определения (« $a$ » в уравнении  $y = ax + b$ ) с увеличением концентрации. Поэтому ошибка в определении концентрации рутина будет уменьшаться с увеличением « $a$ », следовательно, применение градуировочного графика для определения содержания рутина в области низких концентраций, где  $a = 995,12$  (рис. 6), приводит к более точным результатам по сравнению с результатами, полученными по графику, представленному на рис. 7, где  $a = 274,68$ . Наличие в регрессионных уравнениях коэффициентов  $b$ , отличных от нуля и рав-

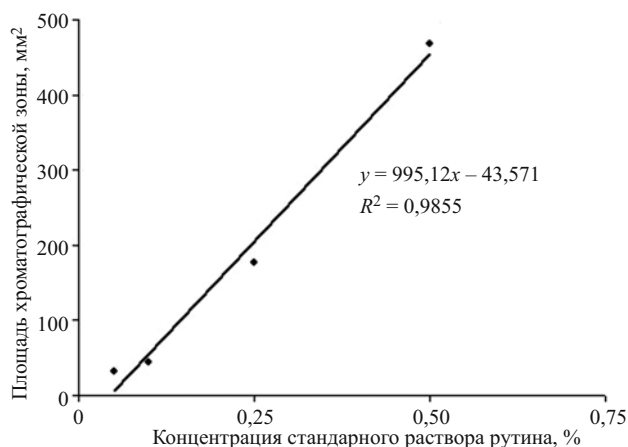
Таблица 2

**Хроматографические параметры рутина в различных элюирующих системах**

Система	Элюент	$R_f$	$H$ , мм	$N$	$R'$
1	Бензол – этанол – ледяная уксусная кислота (45:8:3)	0,130 ± 0,01	2,50	29,60	3,49
2	<i>n</i> -бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:5)	0,700 ± 0,01	0,46	153,20	6,68
3	Этилацетат – гексан – хлороформ – <i>n</i> -бутанол (40:30:20:10)	0,001 ± 0,01	25,00	2,92	2,99
4	Этилацетат – этанол – вода (100:27:13)	0,195 ± 0,01	13,10	5,57	4,91
5	Этилацетат – вода – ледяная уксусная кислота (10:10:40)	0,910 ± 0,01	0,06	1303,60	6,35
6	Хлороформ – ацетон (50:40)	0,700 ± 0,02	19,10	4,03	4,84
7	Этилацетат – ледяная уксусная кислота – вода (7,5:1,5:1,5)	0,455 ± 0,01	0,71	100,80	5,24
8	Хлороформ – метанол – вода (26:14:3)	0,450 ± 0,02	132,00	0,50	5,44
9	Ледяная уксусная кислота – вода (15:85)	0,990 ± 0,01	0,05	1571,43	8,58
10	Ледяная уксусная кислота – вода (60:40)	0,900 ± 0,01	0,12	631,15	7,32
11	Гексан – хлороформ (1:1)	0,001 ± 0,01	64,00	1,00	2,20
12	Этилацетат – этанол – толуол (4:2:2)	0,110 ± 0,01	4,00	19,00	4,08



**Рис. 5.** Зависимость площади хроматографической зоны от концентрации стандартного раствора рутина, подвижная фаза: этилацетат — ледяная уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5).



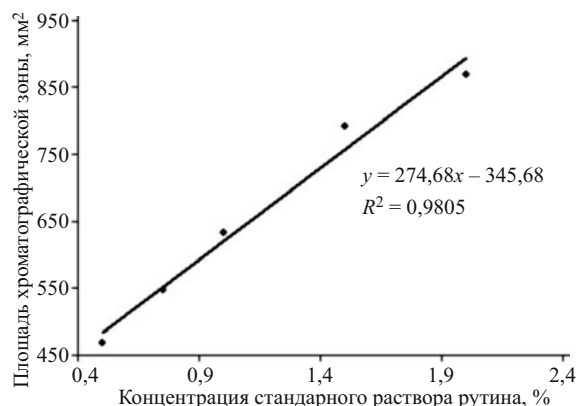
**Рис. 6.** Градуировочный график для определения содержания рутина в области концентраций (0,05 – 0,5 %), подвижная фаза: этилацетат — ледяная уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5).

ных 43,571 и 345,68, говорит о постоянной систематической ошибке, обусловленной влиянием яркости фона пластины на оценку яркости окрашенной хроматографической зоны при обработке хроматограммы компьютерной программой “Sorbfil Videodensitometer”.

Таким образом, разработана экономичная и экспрессная методика идентификации и количественной интерпретации данных ВЭТСХ рутина на персональном компьютере. Разработанная методика может быть рекомендована к апробации и использованию для стандартизации различных лекарственных форм и лекарственного растительного сырья, содержащих рутин, а также для контроля качества продукции в косметологической и пищевой отраслях промышленности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Экспериментальная витаминология*, Островский Ю. М. (ред.), Наука и техника, Минск (1979), сс. 501 – 511.



**Рис. 7.** Градуировочный график для определения содержания рутина в области концентраций (0,5 – 2,0 %), подвижная фаза: этилацетат — ледяная уксусная кислота — вода (7,5:1,5:1,5).

2. С. В. Луценко, Н. Б. Фельдман, В. А. Быков, *Растительные флавоноиды. Биологическая активность и терапевтический потенциал*, Москва (2006).

3. Д. Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина, Г. А. Толстикова, *Природные флавоноиды*, Академическое изд-во “Тео”, Новосибирск (2007).

4. Е. Я. Ладыгина, Л. Н. Сафронич, В. Э. Отряшенникова и др., *Химический анализ лекарственных растений*, Гринкевич Н. И., Сафронич Л. Н. (ред.), Высшая школа, Москва (1983).

5. В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комисаренко, С. Е. Дмитрук, *Биологически активные вещества лекарственных растений*, Наука, Новосибирск (1990).

6. ВФС 42-2577-95. Таблетки “Аскорутин”.

7. ФС 42-2798-99. Таблетки “Глутамевит”, покрытые оболочкой.

8. И. М. Коренман, *Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений*, Химия, Москва (1970), сс. 47, 50, 80, 248, 285, 288.

9. Я. М. Перельман, *Анализ лекарственных форм*, Гос. изд-во мед. лит-ры, Ленинград (1961), сс. 389 – 391.

10. Е. В. Бекетов, А. А. Абрамов, О. В. Нестерова, С. В. Кондрашев, *Вестн. Моск. ун-та*, Сер. 2, Химия, **46**(4), 259 – 262 (2005).

11. В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова, *Фармация*, № 6, 16 – 18 (2002).

12. *Государственная фармакопея СССР*, Медицина, Москва (1968), сс. 599 – 600.

13. И. А. Самылина, Н. С. Терешина, *Фармация*, № 6, 6 – 8 (2005).

14. Е. К. Слуева, Е. Н. Жукович, Л. А. Шарикова и др., *Фармация*, № 1, 13 – 15 (2003).

15. Л. М. Федосеева, Е. В. Тимохин, *Химия растит. сырья*, № 4, 81 – 84 (1999).

16. О. В. Шарова, В. А. Куркин, *Химия растит. сырья*, № 1, 65 – 68 (2007).

17. Н. В. Кочергина, *VIII конгресс молодых ученых и специалистов “Науки о человеке”*, Томск (2007), сс. 228 – 229.

18. А. С. Саушкина, В. А. Карпенко, Л. Н. Савченко, Д. А. Муравьева, *Сорбц. и хроматограф. процессы*, **1**(5), 902 – 905 (2001).

19. Е. П. Федорова, Н. В. Благоразумная, *Сб. научн. трудов “Естествознание и гуманизм”*, **3**(3), 356 (2006).

20. А. И. Лутцева, Л. Г. Маслов, *Хим.-фарм. журн.*, **30**(9), 30 – 35 (1999).

21. В. Г. Березкин, Н. С. Бочков, *Количественная тонкослойная хроматография*, Наука, Москва (1980).

22. А. В. Герасимов, *Ж. аналит. химии*, **59**(4), 392 – 397 (2004).

23. А. Б. Дмитриев, Т. Д. Мезенова, *Тез. докл. конференции “Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции”*, Пятигорск (2006), сс. 197 – 198.



24. А. Б. Дмитриев, Т. Д. Мезенова, Л. А. Водорезова, *Тез. докл. конференции "Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции"*, Пятигорск (2007), сс. 288 – 290.
25. *Количественный анализ хроматографическими методами*, Э. Кэц (ред.), Мир, Москва (1990).
26. А. А. Назарова, Т. А. Корнева, Е. В. Ковалева и др., *Сорбц. и хроматограф. процессы*, **3(2)**, 213 – 216 (2003).
27. О. Б. Рудаков, В. В. Хрипушин, Т. А. Железная, Е. Ф. Сафонова, *Сорбц. и хроматограф. процессы*, **2(2)**, 209 – 212 (2002).
28. Э. Шеллард, *Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое*, пер. с англ. М. П. Вольнец, Г. М. Варшал, Мир, Москва (1971).
29. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии*, Мир, Москва (1999).

Поступила 25.12.2012

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF RUTIN BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

O. V. Trineeva, I. I. Safonova, E. F. Safonova, and A. I. Slivkin

Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

We have developed an economic and rapid method for the identification and quantitative determination of rutin by high-performance thin-layer chromatography (TLC), which can be recommended for approbation and use in pharmaceutical, cosmetology, and food industries. Optimum TLC conditions were experimentally selected and theoretically justified, with quantitative interpretation of high-performance TLC data on a personal computer.

**Keywords:** rutin; quantitative determination; high-performance thin-layer chromatography