© Коллектив авторов, 2014

О. Ю. Ветрова, К. А. Кокорина, Ж. Б. Бажаева, Ю. В. Мельник, Ю. Ю. Петрова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА, ЛИЗИНА И КОЛЛАГЕНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ, СРЕДСТВАХ И КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ СОРБЦИОННО-КАТАЛИТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сургутский государственный университет, Сургут, Тюменская обл., Россия

Изучено действие ионогенных поверхностно-активных веществ и ионных жидкостей на характеристики разделения рутина и лизина в модельных смесях методом тонкослойной хроматографии. Разработаны методики, сочетающие ТСХ, в т.ч. модифицированную растворами додецилсульфата натрия, с последующим сорбционно-каталитическим определением рутина, лизина и коллагена непосредственно на носителе, отличающиеся высокой чувствительностью и селективностью, доступностью и простотой аппаратурного оформления. Методики использованы для определения рутина, лизина и коллагена в образцах фармацевтической и косметической продукции.

Ключевые слова: ТСХ, сорбционно-каталитическое определение; рутин; лизин; коллаген.

Флавоноиды, α-аминокислоты и некоторые белки широко используют в качестве лекарственных веществ с высокой биологической и физиологической активностью. Так флавоноиды, как растительные полифенолы, известные своей антиоксидантной, антирадикальной, антигенотоксической активностью, обладают широким спектром фармакологического действия [1, 2]. В лекарственных средствах применяют рутин и кверцетин (Р-витамины), которые в сочетании с аскорбиновой кислотой уменьшают проницаемость и ломкость капилляров, тормозят свёртывание крови и повышают эластичность эритроцитов [3]. Аминокислоты оказывают множественные эффекты на разные функциональные системы и органы человека, стимулируя или угнетая их деятельность. Препараты аминокислот широко используются в спортивной практике в виде диетических добавок и витаминов как изолированно, так и в виде комплексных препаратов [4]. Имеются также многочисленные данные об успешном применении в составе косметических средств индивидуальных аминокислот [5, 6]. Коллаген, фибриллярный белок соединительной и костной ткани, сухожилий, хрящей [7], используют в медицине, в косметической и пищевой промышленности. В технологии различных лекарственных форм коллаген используют в качестве перспективного вспомогательного соединения, пролонгирующего действие лекарственного вещества [8, 9]; в качестве матрицы для иммобилизации различных биологически активных и лекарственных веществ [10]. Кроме того, коллаген и его гидролизаты широко используют в косметике и биологически активных добавках как влагоудерживающие и питательные компоненты [11 – 15].

Широкий спектр биологического действия флавоноидов, α-аминокислот и коллагена, а также необходимость мониторинга этих соединений в биомедицинских исследованиях и контроле качества фармацевтической, косметической и пищевой продукции требуют применения чувствительных и избирательных методов анализа, отличающихся простотой и доступностью. Перспективны в этом смысле высокочувствительные сорбционно-каталитические методы определения органических веществ, активаторов и ингибиторов катализа [16 – 19], особенно для повышения селективности в сочетании с доступными методами разделения и концентрирования непосредственно в фазе носителя, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ) [20 – 22].

В фармацевтическом анализе ТСХ нередко сочетают со спектрофотометрией в УФ- и видимой областях для определения природных соединений в растительном и животном сырье [23]. Так были разработаны методики определения флавоноидов и аминокислот, основанные на образовании окрашенных продуктов с хлоридом алюминия и с нингидрином [24 – 27]. Однако такой гибридный метод оказался недостаточно чувствителен в анализе биологических жидкостей, лекарственных препаратов и продуктов питания. Методов определения коллагена в литературе описано крайне мало. Имеющиеся публикации в основном посвящены спектрофотометрическому методу, основанному на проведении цветных реакций α-аминокислот [28, 29] либо на межмолекулярном взаимодействии коллагена с тетрахлор-*п*-бензохиноном: $c_н = 0{,}8$ мг/л, $s_г = 0{,}002$ [30].

Ранее нами показана возможность сорбционно-каталитического определения биологически активных соединений в сочетании с планарной хроматографией по их активирующему или ингибирующему действию на катализатор [22]. Целью данной работы является разработка высокочувствительных и селективных методик сорбционно-каталитического определения флавоноидов, α-аминокислот и белков на примере рутина, лизина и коллагена в фармацевтических препаратах, средствах и косметической продукции.

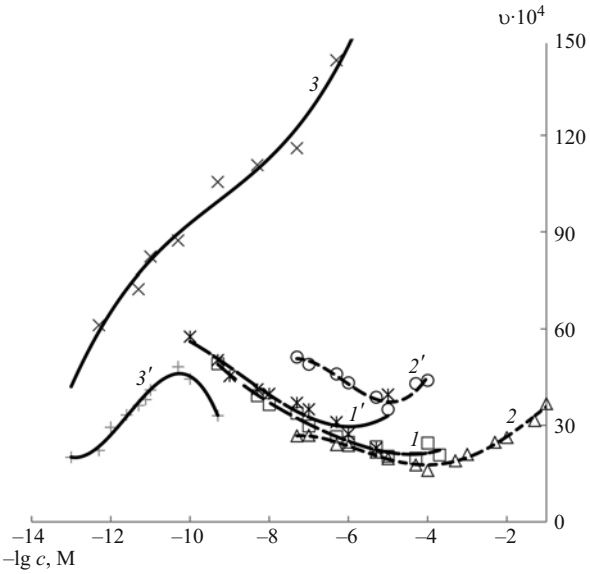

Рис. 1. Зависимость скорости реакций ТМБ — $(NH_4)_2S_2O_8$ и Fe(III) — $S_2O_3^{2-}$ — Phen на пластинах Sorbfil от lg*c* рутина (*1*, *1′*), лизина (*2*, *2′*) и коллагена (*3*, *3′*) (*1′ – 3′*: в сочетании с ТСХ, на пластинах: 1 – 3 мкл растворов аналитов; 10 – 20 нмоль ТМБ, $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ нмоль Mn(II) или $1{,}6 \cdot 10^{-5}$ нмоль Cu(II), 20 – 50 нмоль $(NH_4)_2S_2O_8$, pH 3,5 – 5,0; 0,15 мкмоль Phen, 0,1 мкмоль HCl, 0,3 нмоль Cu(II), 40 нмоль $Na_2S_2O_3$, 2 нмоль $FeCl_3$.

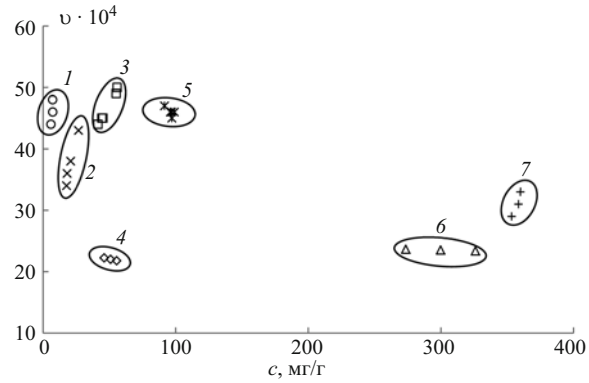

Рис. 2. Результаты определений рутина (*2*, *3*, *4* и *6*), лизина (*1*, *5*) и коллагена (*7*) в фармацевтической и косметической продукции: витамины — *1*; венорутон (гель) — 2; аскорутин — *3* (в сочетании с ТСХ) и *4* (без ТСХ); *5* — спортивное питание; *6* — венорутон (капсулы); *7* — маска для лица и шеи.

Экспериментальная часть

В работе использовали деионизированную воду, которую получали с помощью прибора для получения особо чистой воды “Водолей” (НПП “ХимЭлектроника”, Россия). Значения pH растворов измеряли на pH-метре-иономере “Экотест-120” (“Эконикс”, Россия). Интенсивность окраски носителей (коэффициент отражения *R*) измеряли на рефлектометре-колориметре “Экотест-2040” (“Эконикс”, Россия) и рефлектометре “Унифот-тест-405” (“Марафон”, Россия). В качестве носителей для проведения индикаторных реакций, а также неподвижных фаз для ТСХ использовали пластины Sorbfil, 100 × 100 мм, ПТСХ-П-А (“Сорбполимер”, Россия).

В работе использовали флавоноиды “для ВЭЖХ” (“Fluka”, США); α-аминокислоты, ч.д.а. и х.ч. (США и Германия); коллаген сухой, тип I (“Sigma”, Германия); бычий сывороточный альбумин, лиофилизированный (“Fluka”); 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин (ТМБ), “для анализа” (“Riedel-de Haen”, Германия); *о*-фенантролин, ч.д.а. (Россия); $(NH_4)_2S_2O_8$ и $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, ч.д.а. (Россия), дополнительно перекристаллизованные; H_2O_2, ос.ч. (Россия); ионогенные поверхностно-активные вещества (ПАВ): додецилсульфат натрия (ДДСNa) и цетилтриметиламмония бромид (ЦТМАБ), х.ч. (Россия); ионные жидкости (ИЖ): 1-бутил-3-метилимидазолия тетрафторборат (BMIM), ≥ 98 % (“Acros”, Бельгия) и 1-бутил-4-метилпиридиния тетрафторборат (BMP), ≥ 97 % (“Aldrich”, Германия). Другие неорганические и органические реагенты, использованные в данной работе, имели квалификацию ч.д.а. и х.ч.; их применяли без дополнительной очистки.

Буферные растворы (pH 3 – 10) готовили из 0,04 М растворов CH_3COOH, H_3PO_4, H_3BO_3 кислот и 0,2 М KOH. Исходные растворы 10^{-4} М флавоноидов и $10^{-2} – 10^{-3}$ М α-аминокислот готовили растворением точных навесок в воде или этиловом спирте, а $5 \cdot 10^{-7}$ М коллагена — в 0,25 М уксусной кислоте при комнатной температуре в течение 1 сут и хранили при темпрературе 4 °C не более 7 дней. Все остальные растворы готовили растворением точных навесок в воде; хлорид железа(III) растворяли в 0,1 М соляной кислоте; а ТМБ, *о*-фенантролин и другие органические вещества, плохо растворимые в воде, — в этаноле, ацетоне и CCl_4.

Разделение и обнаружение флавоноидов (рутин, формононетин, лютеолин, вогонин и апигенин), **α-аминокислот** (лизин, серин, метионин, триптофан, треонин, аланин, цистеин и глицин) и **белков** (коллаген и альбумин) проводили методом ТСХ, в т.ч. модифицированной ПАВ и ИЖ [31 – 33]. В качестве подвижных фаз для флавоноидов использовали этилацетат:этанол:вода (5:4:1), а для **α-аминокислот** и **белков** — *н*-пропанол:аммиак, 25 % (7:3) и этанол:аммиак, 25 % (8:2). Невидимые зоны флавоноидов проявляли в УФ (325 нм) в виде темных (апигенин и вогонин) и светящихся желтых зон после опрыскивания 5 % $AlCl_3$ в спирте (лютеолин, формононетин и рутин); α-аминокислот и белков — 0,25 % раствором нингидрина в ацетоне при нагревании. Эффективность разделения оценивали, рассчитывая R_f, R_s и фактор разделения α:

$$\alpha_{I/II} = \frac{(1/R_{fI} - 1)}{(1/R_{fII} - 1)},$$

где I и II — разделяемые компоненты, $R_{fI} < R_{fII}$.

Исследование действия флавоноидов в реакциях окисления ТМБ и **сорбционно-каталитическое определение рутина**, **генистина**, **лизина и коллагена** проводили путем последовательного нанесения мик-

Таблица 1

Действие флавоноидов на скорость реакций окисления ТМБ H_2O_2 и $(NH_4)_2S_2O_8$, катализируемых Fe(II) и Mn(II) ("↑" — увеличение, "↓" — уменьшение, "–" - нет изменений)

Флавоноид (Ф)	Скорость реакции			
	H_2O_2		$(NH_4)_2S_2O_8$	
	В отсутствие Fe(II)	В присутствии Fe(II), Ф:Fe = 3:1	В отсутствие Mn(II)	В присутствии Mn(II), Ф:Mn = 56:1
Флавоны:				
Лютеолин	-	↓	↓	↓
Апигенин	↑	↑	↑	↓
Вогонин	-	↑	-	↓
Изофлавоны:				
Даидзин	↑	↓	↓	↓
Генистин	↓	-	↑	↓
Формононетин	↑	↑	-	↓
Формононетин-7-O-β-D-галактопиранозид	↑	↑	-	↓
Флавонолы:				
Рутин	-	-	-	↓
Галангин	-	-	↑	↓
Кверцетин	↓	-	↓	↓
Птерокарпановый гликозид:				
Инермин-3-O-β-D-галактопиранозид	↑	↑	-	↓
Метоксиинозитол:				
Пинитол	-	↑	↓	↓

роколичеств (1 – 2 мкл) растворов реагентов индикаторных реакций на поверхность пластины Sorbfil. После нанесения каждого реагента зону реакции высушивали потоком воздуха. Фоновое показание рефлектометра "Унифот-тест-405" (V_o) фиксировали после нанесения предпоследнего реагента, затем наносили последний, и это время считали началом реакции. Скорость реакции (υ) характеризовали методом тангенсов на начальном участке зависимости коэффициента отражения R от времени в течение 30 с ("Унифот-тест-405") и зависимости $1/R$ от времени в течение 60 с ("Экотест-2040"), получаемой с помощью компьютерного приложения Ecotest-2020. Коэффициент отражения на рефлектометре "Унифот-тест-405" рассчитывали по формуле: $R = (V - V_d)/(V_o - V_d)$, где V — сигнал при текущем измерении, V_d — сигнал при неосвещенном фотоприемнике, V_o — сигнал, полученный при измерении неокрашенного сорбента. В методиках после ТСХ индикаторные реакции проводили в зонах R_f, которые устанавливали на той же пластине с помощью свидетелей, роль которых выполняли стандартные растворы аналитов.

Определение рутина в таблетках "Аскорутин", капсулах и геле "Венорутон" проводили методом добавок в разбавленных вытяжках, полученных путем растворения таблетки (капсулы) или навески геля (15 г) в 100 мл воды в течение 1 ч. 1 мкл добавки рутина (2, 4 и 6 мкМ) вносили либо непосредственно в индикаторную реакцию окисления ТМБ персульфатом аммония, катализируемую марганцем(II), либо на линию старта вместе с анализируемым раствором в случае методики в сочетании с ион-парной ТСХ (1 мМ ДДСNa в подвижной фазе).

Для определения лизина в витаминах (витаминный комплекс с аминокислотами и микроэлементами в таблетках "Excel Brewers Yeast", США) и **спортивном питании** (в протеиновом порошке на основе белка молочной сыворотки с добавлением важнейших аминокислот с разветвленной структурой "Weider Gold Whey", США) вытяжки готовили растворением 0,5 г образцов в 100 мл воды при интенсивном перемешивании и сонировании в течение 1 ч и хранили не

Таблица 2

Параметры градуировочных графиков ($y = a + bx$) и метрологические характеристики сорбционно-каталитического определения

Название	a	s_a	b	s_b	s_0	R	c_{min}, М	s_r (c, М)	Интервал определяемых концентраций, М
Без ТСХ									
Рутин*	0,92	2,33	– 0,08	0,36	1,39	0,992	$1,2 \cdot 10^{-9}$	0,14 ($1,0 \cdot 10^{-8}$)	$5,0 \cdot 10^{-9} – 5,0 \cdot 10^{-5}$
Генистин*	0,83	3,06	– 0,10	0,45	1,60	0,997	$2,6 \cdot 10^{-9}$	0,05 ($5,0 \cdot 10^{-8}$)	$1,0 \cdot 10^{-8} – 1,0 \cdot 10^{-5}$
Лизин**	2,36	0,99	– 3,52	0,18	0,48	0,993	$2,7 \cdot 10^{-7}$	0,04 ($1,0 \cdot 10^{-6}$)	$5,0 \cdot 10^{-7} – 1,0 \cdot 10^{-4}$
Коллаген**	320,38	13,46	22,00	1,15	1,72	0,993	$2,5 \cdot 10^{-13}$	0,08 ($1,0 \cdot 10^{-12}$)	$5,0 \cdot 10^{-13} – 1,0 \cdot 10^{-11}$
В сочетании с ТСХ									
Рутин**	– 12,56	2,92	– 6,70	0,37	1,60	0,990	$4,1 \cdot 10^{-10}$	0,08 ($1,0 \cdot 10^{-9}$)	$5,0 \cdot 10^{-10} – 5,0 \cdot 10^{-6}$
Лизин**	4,32	1,83	– 6,45	0,09	0,56	0,995	$5,0 \cdot 10^{-8}$	0,03 ($5,0 \cdot 10^{-7}$)	$1,0 \cdot 10^{-7} – 1,0 \cdot 10^{-5}$
Коллаген**	154,64	4,25	10,41	0,37	0,77	0,996	$5,0 \cdot 10^{-13}$	0,12 ($2,5 \cdot 10^{-12}$)	$1,0 \cdot 10^{-12} – 5,0 \cdot 10^{-11}$

* $y = \lg\upsilon \cdot 10^4$, $x = \lg c$;
** $y = \upsilon \cdot 10^4$, $x = \lg c$.

Таблица 3

Селективность определения 10^{-7} М рутина, 10^{-7} – 10^{-5} М генистина и лизина, $5 \cdot 10^{-12}$ М коллагена сорбционно-каталитическим методом в сочетании с ТСХ

Аналит	Соединение	Порог мешающего влияния вещество:аналит	
		–	ТСХ
Генистин	Кверцетин	10	–
	Рутин	0,5	–
Рутин	Кверцетин	50	> 100 *
	Генистин	5	–
	Фомононетин	100	$> 4 \cdot 10^4$ *
	Вогонин	–	$> 4 \cdot 10^4$ *
	Апигенин	–	$> 4 \cdot 10^4$ *
	Галангин	> 50	$> 1{,}5 \cdot 10^4$ *
	Лютеолин	–	> 400 *
Лизин	Валин	10^{-4}	$> 10^3$ *
	Лейцин	–	$> 10^3$ *
	Цистин		$> 10^3$ *
	Пролин		$> 10^3$ *
	Гистидин	10^{-3}	$> 10^3$ *
	Аспарагиновая кислота	10^{-2}	$> 10^2$ *
	Глутаминовая кислота		$> 10^2$ *
	Цистеин		$> 10^2$ *
	Zn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Cu(II), Mn(II)	–	10^3 *
Коллаген	Ионол	$2 \cdot 10^{-3}$	$> 2 \cdot 10^9$
	Витамин Е	2	$> 1 \cdot 10^6$
	Аскорбиновая кислота	$< 2 \cdot 10^{-3}$	$> 2 \cdot 10^9$
	Альбумин	< 0,2	$2 \cdot 10^2$
	Мочевина	$2 \cdot 10^2$	$> 2 \cdot 10^9$
	α-Аланин	$< 2 \cdot 10^{-2}$	$> 2 \cdot 10^9$
	Глицин	$2 \cdot 10^{-4}$	$> 2 \cdot 10^9$
	Лизин	$2 \cdot 10^{-4}$	$> 2 \cdot 10^9$
	Гистидин	2	$> 2 \cdot 10^9$
	NaH_2PO_4	$< 2 \cdot 10^{-2}$	$> 2 \cdot 10^3$
	$Na_2B_4O_7$	20	$> 2 \cdot 10^9$
	Fe(II)	$2 \cdot 10^3$	$> 2 \cdot 10^{11}$
	Fe(III)	$2 \cdot 10^2$	$> 2 \cdot 10^9$
	Co(II)	2	$> 2 \cdot 10^9$
	Mn(II)	$2 \cdot 10^2$	$> 2 \cdot 10^9$

* — подвижная фаза модифицирована растворами ДДСNa.

более 3 – 4 дней. В день проведения эксперимента полученные вытяжки разбавляли и наносили по 2 мкл на линию старта без и с добавками 0,2; 0,4 и 0,8 мкМ лизина. Хроматографирование в мицеллярной подвижной фазе (12 мМ ДДС в *н*-пропанол: аммиак, 7:3) и индикаторную реакцию проводили, как описано выше.

Сорбционно-каталитическое **определение коллагена** в сочетании с ТСХ проводили в **косметической продукции** (антиоксидантной коллагеновой маске для лица и шеи “100 % коллаген” (“Dizao”, КНР), содержащей гиалуроновую кислоту, витамины С и B_5 и другие компоненты) и **фармацевтическом препарате** (гемостатической коллагеновой губке (“Белкозин”, Россия), приготовленной из коллагеновой массы с добавлением фурацилина и борной кислоты) методом добавок. Вытяжки, полученные растворением под действием ультразвука навески в 100 мл 0,25 М уксусной кислоты в течение 1 ч, хранили не более 3 сут и разбавляли в день проведения анализа. Затем на линию старта наносили по 1 мкл разбавленной вытяжки и добавки $2 \cdot 10^{-12}$, $4 \cdot 10^{-12}$ и $6 \cdot 10^{-12}$ М коллагена. Хроматографирование в подвижной фазе этанол:аммиак (8:2) и индикаторную реакцию окисления ТМБ персульфатом аммония проводили, как описано выше.

Результаты и их обсуждение

Реакции окисления ТМБ ранее использовали [19] для оценки антиоксидантных свойств индивидуальных флавоноидов (кверцетина) и растительных экстрактов по отношению к окрашенным продуктам этих реакций. Кроме того, известно [34] действие некоторых переходных металлов на скорость окисления ТМБ. Поэтому нами был изучен каталитический (или промотирующий) эффект марганца(II), меди(II) и железа(II) в реакциях окисления ТМБ персульфатом ам-

Таблица 4

Оценка правильности определения методом “введено — найдено”

Соединение	Носитель	Введено, М	Найдено, М (n = 3 – 5, P = 0,95)
Рутин	Sorbfil	$2,5 \cdot 10^{-8}$	$(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-8}$
		$8,0 \cdot 10^{-7}$	$(7,7 \pm 2,5) \cdot 10^{-7}$
		$8,0 \cdot 10^{-6}$	$(9,2 \pm 3,3) \cdot 10^{-6}$
	Sorbfil (после ИП-ТСХ)	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$(2,7 \pm 1,3) \cdot 10^{-7}$
Генистин	Sorbfil	$2,5 \cdot 10^{-8}$	$(2,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-8}$
		$8,0 \cdot 10^{-7}$	$(8,7 \pm 3,2) \cdot 10^{-7}$
Лизин	Sorbfil	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$(2,5 \pm 1,3) \cdot 10^{-6}$
		$7,5 \cdot 10^{-5}$	$(5,7 \pm 2,5) \cdot 10^{-5}$
	Sorbfil (после МТСХ)	$7,5 \cdot 10^{-7}$	$(8,2 \pm 2,5) \cdot 10^{-7}$
		$2,5 \cdot 10^{-6}$	$(2,1 \pm 1,0) \cdot 10^{-6}$
Коллаген	Sorbfil	$1,2 \cdot 10^{-12}$	$(1,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-12}$
		$7,5 \cdot 10^{-12}$	$(6,2 \pm 1,5) \cdot 10^{-12}$
	Sorbfil (после ТСХ)	$1,2 \cdot 10^{-12}$	$(1,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-12}$
		$7,5 \cdot 10^{-12}$	$(6,6 \pm 1,9) \cdot 10^{-12}$

мония, перйодатом калия и пероксидом водорода, проводимых на бумажных носителях и в тонком слое силикагеля. Наибольшую разницу скоростей в присутствии и отсутствие катионов металлов наблюдали для реакций ТМБ–Fe(II)–H_2O_2 и ТМБ–Mn(II)–$(NH_4)S_2O_8$, проводимых на пластинах Sorbfil. Реакции, катализируемые марганцем(II) и железом(II), интересны еще и тем, что флавоноиды могут образовывать с ними хелатные структуры, изменяя тем самым их каталитическую активность.

Исследовали действие флавоноидов разных классов на скорость выбранных реакций (табл. 1). В случае реакций окисления ТМБ пероксидом водорода, в том числе в присутствии Fe(II) (реакция Фентона), и персульфатом аммония в отсутствие Mn(II) исследуемые флавоноиды (кроме рутина) как увеличивают, так и уменьшают скорость реакции, что, по-видимому, связано с их прооксидантной, антиоксидантной и антирадикальной активностью по отношению к $SO_4^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, $ТМБ^{\bullet}$ и другим радикалам. Скорость реакции окисления ТМБ персульфатом аммония, катализируемой Mn(II), уменьшается в присутствии всех исследуемых флавоноидов, таким образом, наблюдаем их ингибирующий эффект, который можно связать с образованием прочных каталитически неактивных хелатных структур флавоноидов с Mn(II). Максимальный ингибирующий эффект наблюдали в присутствии рутина (флавонола) и генистина (изофлавона), которые и были выбраны в дальнейшем в качестве аналитов.

Для определения лизина и коллагена по их ингибирующему и активирующему действию на каталитическую активность меди(II) соответственно использовали реакции восстановления железа(III) тиосульфатом натрия в присутствии *о*-фенантролина и окисления ТМБ персульфатом аммония, проводимые на пластинах Sorbfil [22].

За скоростью выбранных реакций окисления ТМБ наблюдали, измеряя коэффициент отражения в зоне

Таблица 5

Результаты модифицированной ПАВ и ИЖ ТСХ смеси α-аминокислот и флавоноидов для определения лизина и рутина (подвижные фазы: *н*-пропанол — аммиак (7:3) для 2 мкл смеси 0,01 М α-аминокислот и этилацетат — этанол — вода (5:4:1) для 3 мкл смеси 10^{-5} М флавоноидов)

Аналит	Модификация ТСХ		Характеристики разделения		
	Подвижная фаза	Неподвижная фаза (импрегнирование)	R_f	α	R_s
Лизин	–	–	0,06	> 2,5	≥ 1,0
	Мицеллярный раствор 21 мМ ДДСNa	–	0,08	> 4,0	≥ 1,9
	Мицеллярный раствор 21 мМ ЦТМАБ		0,08	> 3,0	≥ 1,4
	–	Мицеллярный раствор 18 мМ ДДСNa в воде	0,07	≥ 2,7	≥ 1,8
		Мицеллярный раствор 0,48 М мМ ЦТМАБ в этаноле	0,05	≥ 3,9	≥ 1,9
		Молекулярный раствор 3 мМ ДДСNa в этаноле	0,05	≥ 2,4	≥ 1,2
Рутин	–	–	0,80	> 1,2	> 0,3
	Мицеллярный раствор 15 мМ ДДСNa	–	0,78	> 2,5	> 1,8
	Молекулярный раствор 5 мМ ДДСNa		0,74	≥ 2,2	≥ 1,8
	10 мМ ВМР		0,62	≥ 2,3	> 1,0
	1 мМ ВМР в мицеллярном растворе 15 мМ ЦТМАБ		0,78	> 2,5	> 2,3
	–	Молекулярный раствор 3 мМ ДДСNa в этаноле	0,67	4,0	2,5
		Молекулярный раствор 4 мМ ДДСNa в *н*-пропаноле	0,70	> 4,0	> 3,0

Таблица 6

Результаты определений рутина, лизина и коллагена в фармацевтической и косметической продукции сорбционно-каталитическим методом в сочетании с планарной хроматографией (ПХ)

Аналит	Объект	Модификация ТСХ	Заявлено на упаковке	Найдено методом добавок (n = 4 – 6, P = 0,95)	
				В разбавленной водной вытяжке, М	В образце
Рутин	Аскорутин, в таблетках	-	50 мг/табл.	$(8,3 \pm 1,0) \cdot 10^{-6}$	51 ± 6 мг/табл.
		ИП-ТСХ*		$(19,9 \pm 4,0) \cdot 10^{-6}$	47 ± 3 мг/табл.
	Венорутон, в капсулах	-	300 мг/капс.	$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$	300 ± 34 мг/капс.
	Венорутон, гель	ИП-ТСХ	20 мг/г	$(9,4 \pm 2,0) \cdot 10^{-6}$	21 ± 4 мг/г
Лизин	Витамины	МТСХ**	3,0 мг/0,5 г	$(2,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$	3,5 ± 0,5 мг/0,5 г
	Спортивное питание		9,6 г/100 г	$(3,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	9,5 ± 0,4 г/100 г
Коллаген	Коллагеновая маска для лица и шеи	-	-	$(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-12}$	0,36 ± 0,08 г/г
	Гемостатическая коллагеновая губка		0,98 г/г	$(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	0,91 ± 0,10 г/г

* — ион-парная ТСХ с 1 мМ ДДСNa в подвижной фазе;
** — мицеллярная ТСХ с 12 мМ ДДСNa в подвижной фазе.

реакции промежуточного синего продукта (615 нм), а в случае реакции восстановления железа(III) — ферроина (525 нм). В оптимальных условиях (pH и концентрации реагентов) проведения реакций окисления ТМБ получены градуировочные зависимости (табл. 2) для определения рутина, генистина и коллагена в широком диапазоне концентраций и с низкими пределами обнаружения (на уровне нМ для флавоноидов и ниже пМ для коллагена). Однако селективность разработанных методик на пластинах Sorbfil недостаточна (табл. 3). Правильность методик оценили методом введено-найдено (табл. 4).

Для повышения селективности анализа нами было предложено сочетание ТСХ с сорбционно-каталитическим детектированием непосредственно в фазе носителя. Для повышения эффективности ТСХ изучили модификацию подвижной и неподвижной фаз растворами ионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ) и ионных жидкостей. Наиболее эффективное разделение аналитов в модельных смесях наблюдали в случаях модификации подвижной и неподвижной фаз мицеллярными растворами ДДСNa и ЦТМАБ, молекулярными растворами ДДСNa и ВМР, в том числе в составе мицелл ЦТМАБ (табл. 5). В основу механизма разделения в мицеллярном варианте ТСХ положен принцип солюбилизации аналитов в мицеллы, а в ион-парном — образование ионных пар с участием аниона ПАВ [31].

Максимальные эффекты ингибирования аналитов в индикаторных реакциях, катализируемых Cu^{2+} и Mn^{2+}, наблюдали в вариантах модифицирования подвижных фаз мицеллярными и молекулярными растворами анионного ПАВ (ДДСNa) для лизина и рутина соответственно (табл. 5). В случае использования мицелл катионного ПАВ эффект ингибирования отсутствовал, возможно по причине электростатических затруднений взаимодействия положительно заряженных прямых мицелл ЦТМАБ и катионов металлов-катализаторов. Следует при этом отметить, что подавление эффекта ингибирования рутина в подвижной фазе с ВМР более 10 мМ также может быть связано с образованием мицелл катионами ВМР [33].

Оптимизировали концентрации модификаторов подвижных фаз и выбрали следующие системы ТСХ: 12 мМ ДДСNa в смеси *н*-пропанол : аммиак (7:3), 1 мМ ДДСNa в смеси этилацетат : этанол : вода (5:4:1) и смесь этанол : аммиак (8:2) для разделения лизина, рутина и коллагена соответственно. В оптимизированных условиях (pH и концентрации реагентов индикаторных реакций) получены методики сорбционно-каталитического определения аналитов в сочетании с ТСХ (табл. 2 – 4), отличающиеся высокой чувствительностью, особенно в вариантах с модификацией ТСХ, и селективностью. На рис. 1 видно, что в методиках, сочетающих ТСХ с сорбционно-каталитическим детектированием рутина и лизина, скорости индикаторных реакций выше, чем в методиках без ТСХ, что демонстрирует повышение чувствительности.

Разработанные методики были использованы в анализе фармацевтических препаратов (аскорутин, венорутон) и средств (гемостатическая губка), косметической продукции (маска для лица и шеи), а также витаминов и спортивного питания (табл. 6, рис. 2). Результаты, полученные сорбционно-каталитическим методом, хорошо согласуются с содержанием аналитов, заявленным на упаковке анализируемых образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. M. Cowan, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**(4), 564 – 582 (1999).
2. Ø. M. Andersen, K. R. Markham (eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, New York (2006).
3. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая Волна, Москва (2005), сс. 629 – 630.
4. Н. А. Горчакова, Я. С. Гудивок, Л. М. Гунина (ред.) и др., *Фармакология спорта*, Олимп. л-ра, Киев (2010).
5. Х. Виламо, *Косметическая химия*, Мир, Москва (1990).
6. В. В. Гунько, С. В. Андреева, *Провизор*, № 12, 12 – 14 (2002).
7. J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, et al., *Science*, **266**, 75 – 81 (1994).

8. И. С. Агжихин, *Технология лекарств*, Медицина, Москва (1980).
9. Л. А. Иванова, *Фармация*, **40**(1), 81 – 83 (1990).
10. О. А. Семкина, М. А. Джавахян, Т. А. Левчук и др., *Хим.-фарм. журн.*, **39**(9), 45 – 48 (2005).
11. М. М. Губин, *Новая аптека*, № 1, 17 – 19 (2002).
12. В. В. Кованова, И. А. Сыченикова, *Коллагенопластика в медицине*, Медицина, Москва (1978).
13. В. И. Мазуров, *Биохимия коллагеновых белков*, Медицина, Москва (1974).
14. Л. Н. Милованова, *Технология изготовления лекарственных форм*, Медицина, Ростов-на-Дону (2002).
15. А. И. Тенцова (ред.), *Справочник фармацевта*, Медицина, Москва (1981).
16. М. К. Беклемишев, Ю. Ю. Петрова, О. М. Абрамова и др., *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **44**(2), 115 – 122 (2003).
17. Ю. Ю. Петрова, *Журн. аналит. химии*, **65**(5), 538 – 547 (2010).
18. M. K. Beklemishev, Yu. Yu. Petrova, I. F. Dolmanova, *Mikrochim. Acta.*, **136**, 35 – 41 (2001).
19. Г. А. Крывшенко, М. К. Беклемишев, *Химия растительного сырья*, № 1, 123 – 128 (2011).
20. Л. Ю. Беляева, А. Ф. Прохорова, М. К. Беклемишев, *Журн. аналит. химии*, **65**(1), 66 – 72 (2010).
21. Л. Ю. Беляева, М. К. Беклемишев, *Журн. аналит. химии*, **66**(4), 435 – 442 (2011).
22. Е. Ю. Бырина, О. Ю. Ветрова, О. С. Долгушина и др., *Журн. аналит. химии*, **68**(8), 776 – 786 (2013).
23. В. Г. Беликов, *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева)*, **XLVI**(4), 52 – 56 (2002).
24. И. Б. Селиванчикова, М. Н. Лякина, З. П. Костенникова, *Фармация*, **50**(6), 14 – 16 (2001).
25. Е. А. Фомичева, М. Н. Лякина, З. П. Костенникова, *Фармация*, **50**(5), 13 – 15 (2001).
26. Е. В. Яковлева, З. П. Костенникова, Л. А. Баратова и др., *Фармация*, **51**(5), 11 – 14 (2002).
27. В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Сухомлинова, *Фармация*, **54**(3), 9 – 11 (2005).
28. M. V. Rest, W. G. Cole, F. H. Glorieux, *Biochem. J.*, **161**, 527 – 534 (1977).
29. Л. И. Слуцкий, И. И. Шелекина, *Вопр. мед. химии*, **5**(6), 466 – 468 (1959).
30. В. К. Шорманов, Г. Г. Булатников, *Ж. аналит. химии*, **61**(4), 351 – 355 (2006).
31. Е. Г. Сумина, С. Н. Штыков, Н. В. Тюрина, *Ж. аналит. химии*, **58**(8), 808 – 818 (2003).
32. W. E. Acree and L. M. Grubbs, in: *Encyclopedia of analytical chemistry*, Wiley, Online© (2012).
33. Н. А. Смирнова, Е. А. Сафонова, *Ж. физич. химии*, **84**(10), 1857 – 1867 (2010).
34. М. К. Беклемишев, *Автореф. дис. докт. хим. наук*, Москва (2011).

Поступила 09.02.14

SORBTION-CATALYTIC DETERMINATION OF RUTIN, LYSINE, AND COLLAGEN IN PHARMACEFTICALS AND COSMETICS

O. Yu. Vetrova, K. A. Kokorina, Zh. B. Bazhaeva, Yu. V. Mel'nik, and Yu. Yu. Petrova

Surgut State University, Surgut, Tyumen oblast, 628412 Russia

The effect of ionic surfactants and ionic liquids on the separation of rutin and lysine in model mixtures by thin layer chromatography has been studied. Procedures are developed that combine thin layer chromatography (TLC), including that modified by using sodium dodecyl sulfate solutions, with subsequent sorption-catalytic determination of rutin, lysine and collagen directly on the carrier plates. The proposed methods are highly sensitive, selective, and require only simple and readily available equipment. These techniques were successfully used to determine rutin, lysine, and collagen in various pharmaceutical and cosmetic products.

Keywords: rutin; lysine; collagen; sorbtion-catalytic determination; TLC