

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КАЧЕСТВЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ САПОНИНОВ *QUILLAJA* МЕТОДОМ ТСХ

Нгуен Тхань Ван¹, Н. В. Мироненко¹, Т. А. Брежнева¹, В. Ф. Селеменев¹,
Т. А. Бережнова², Н. С. Преображенская²

¹Воронежский государственный университет

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

Поступила в редакцию 25.12.2017 г.

Аннотация. Тонкослойная хроматография является простым и оперативным методом идентификации тритерпеновых гликозидов в различных растительных объектах. Подбор оптимальных условий хроматографирования являлся целью настоящей работы. Объектом исследования являлась фракция тритерпеновых сапонинов - производных квиллайевой кислоты производства Бельгия. Разработана методика разделения и идентификации сапонинов *Quillaja* методом ТСХ. Оптимальным проявителем оказался 20%-ный спиртовой раствор фосфорно-молибденовой кислоты, в котором зоны сапонинов окрашивались в темно-зеленый цвет (за счет образования комплексного соединения) на светло-зеленом фоне сорбента и сохраняли окраску продолжительное время.

Определение сапонинов методом ТСХ выполняли на пластинах марок «сорбфил» и «плазмохром» производства Россия. Исследовано влияние полярности сорбента и длины хроматографического пути на качество получаемых зон сапонинов. В качестве оценочного критерия использовали величины R_f (подвижность), R_s (разрешающую способность), селективность разделения α . Эффективность разделения определяли по количеству теоретических тарелок N и их высоте H . По результатам хроматографирования оптимальными оказались пластины «сорбфил» размером 10×10 см.

Под оптимизацией разделения в ТСХ понимают выбор условий эксперимента, которые позволяют провести удовлетворительное разделение смеси веществ на пластине. Изменение состава подвижной фазы - наиболее экономичный способ повышения качества хроматографической методики. В работе использовали элюирующие системы, рекомендуемые рядом литературных источников для анализа тритерпеновых сапонинов *Quillaja saponaria*. Выбор оптимальной элюирующей системы осуществляли на основании расчетных параметров, приведенных выше.

На основании рассчитанных величин хроматографических параметров подобрана оптимальная элюирующая система - Н-бутанол-вода-уксусная кислота (4:5:1), обеспечивающая разделение зон индивидуальных сапонинов. Зоны сапонинов в этой системе имели округлую форму, что предполагает линейную изотерму сорбции. Подобный вид изотерм обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. С использованием данных литературы и полученных результатов ТСХ-анализа идентифицированы индивидуальные гликозиды в суммарной фракции.

Ключевые слова: сапонин, ТСХ, элюирующая система, проявитель, хроматографические параметры.

Исследования в области природных соединений сопряжены с рядом возникающих трудностей, обусловленных как способами их выделения из растительного сырья, так и последующим анализом получаемых фракций. Одними из распространенных веществ гликозидной природы являются сапонины растения *Quillaja*, получаемые экстракцией из коры мыльного дерева [1-4]. Наиболее эф-

фективными для анализа подобных сложных соединений являются хроматографические методы, позволяющие не только отделить сапонины от сопутствующих веществ, но⁺ и разделить их на индивидуальные, близкие по структуре соединения, зачастую обладающие различной фармакологической активностью. Несмотря на широкое применение метода ВЭЖХ [4-6] в химическом анализе высокомолекулярных веществ остаются задачи, связанные с простым и оперативным контролем их присутствия в объекте и в этом случае наи-

© Нгуен Тхань Ван, Мироненко Н. В., Брежнева Т. А., Селеменев В. Ф., Бережнова Т. А., Преображенская Н. С., 2018

лее перспективным является метод тонкослойной хроматографии. Методики анализа сапонинов описаны в работах [5-10], однако, условия, рекомендованные для проведения подобных определений, существенно отличаются друг от друга.

Целью настоящей работы являлся подбор условий для идентификации и эффективного разделения сапонинов *Quillaja saponaria* методом тонкослойной хроматографии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлась фракция тритерпеновых сапонинов - производных квиллайевой кислоты производства Бельгия (фирма-производитель Fluka). Общая структурная формула приведена на рис.1.

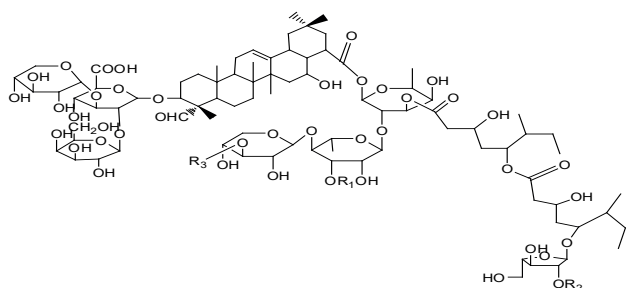


Рис. 1. Общая структурная формула сапонинов *Quillaja Saponaria*.

Определение сапонинов методом ТСХ выполняли на пластинках марок «сорбфил» и «плазмохром» производства Россия (Краснодар). Характеристики пластин указаны в таблице 1.

Размер пластин составлял 10×10, 10×15 см. Использовали стандартную хроматографическую камеру 290×225×160 мм, фирмы «Сорбполимер», Краснодар. Водные растворы сапонинов с концентрацией 0,05 мг/мл объемом 1 мкл наносили на пластину вручную микрошприцем на расстоянии 1см от нижнего края. Пластины с нанесенными веществами погружали в предварительно насыщенную парами подвижной фазы камеру и хроматографировали. После обработки хроматограмм детектирующими реагентами пластины высушивали при $T=80 \pm 2$ °С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первостепенной задачей, позволяющей в дальнейшем оптимизировать методику хроматографического разделения соединений на пластине, является выбор детектирующего реагента. Эффективность проявляющих соединений определяется способностью специфически окрашивать целевой продукт. Анализ литературных данных [9-10] позволил определить ряд химических реагентов, применяемых для идентификации са-

Таблица 1

Основные технические характеристики ТСХ-пластин

	пластины «Сорбфил»	пластины «Плазмохром»
Тип сорбента	силикагель СТХ-1ВЭ	Силикагель с привитой фазой С-3
Зернение, мкм	8-12	5-17
толщина слоя, мкм	110	100-130
связующее	силиказоль	силиказоль
подложка	алюминий	полимерный материал

Таблица 2

Результаты детектирования зон сапонинов на хроматографических пластинках

Детектирующий реагент		Результаты детектирования
1.	3М серная кислота	Пятна слабо окрашены в фиолетово-коричневый цвет
2.	1% раствор ванилина в смеси серной кислоты и 96% этанола в соотношении 1:1	Пятна слабо окрашены в фиолетовый цвет
3.	1% раствор ванилина в смеси этанола и 3% хлорной кислоты в соотношении 1:1 (Реактив Godin [4])	Пятна прозрачные бесцветные
4.	Раствор хлорида сурьмы(III)	Зоны сапонинов на хроматограмме не обнаружены
5.	01% р-р резорцина в 10% растворе хлорида железа (III) (Реактив Bial [4])	Пятна слабо окрашены в коричневый цвет
6.	20% Раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты в 95%-ном этаноле	Пятна окрашены в светло- фиолетовый цвет
7.	20% Раствор фосфорно-молибденовой кислоты в 95%-ном этаноле	Темно-зеленое окрашивание пятен на светлом зеленоватом фоне сорбента

понинов – тритерпенов. В таблице 2 приведены результаты детектирования зон индивидуальных гликозидов.

Проявители №1-5 слабо окрашивали зоны сапонинов, поскольку реагенты, входящие в их состав, взаимодействуют, главным образом, с сапогениновой частью – агликоном [11-13]. Наличие двух углеводных цепочек в структуре сапонина снижает относительную долю генина (квиллайевой кислоты) и, следовательно, чувствительность реакции. Предпочтение отдали проявителю № 7, поскольку зоны сапонинов окрашивались в тёмно-зеленый цвет (за счет образования комплексного соединения) на светло-зеленом фоне сорбента и сохраняли окраску продолжительное время.

На следующем этапе исследовали влияние полярности сорбента (марки пластины) и длины хроматографического пути (высоты пластины) на качество получаемых зон сапонинов. В качестве оценочного критерия использовали величины R_f (подвижность), R_s (разрешающую способность), селективность разделения α , рассчитываемые соответственно по формулам [11-14]:

$$R_f = \frac{l}{L}, \quad (1)$$

$$R_s = \Delta X / [(W_1 + W_2) / 2], \quad (2)$$

$$\alpha = \frac{\left(\frac{1}{R_{f1}} - 1\right)}{\left(\frac{1}{R_{f2}} - 1\right)}, \quad (3)$$

где l – расстояние от центра пятна до линии старта, мм; L – расстояние от фронта растворителя до линии старта, мм; ΔX – расстояние между центрами пятен, мм; W – ширина пятна, мм.

Эффективность разделения определяли по количеству теоретических тарелок N и их высоте H , которые рассчитывали по формулам [6]:

$$N = 16 \left(\frac{LR_f}{w} \right)^2, \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N}, \quad (5)$$

где L – расстояние от фронта растворителя до линии старта, мм; R_f – подвижность; W – ширина пятна, мм.

В таблице 3 приведены результаты хроматографирования фракции сапонинов на пластинах марок «сорбфил» и «плазмохром».

Согласно результатам таблицы 3, наилучшее разделение пятен индивидуальных сапонинов наблюдается на пластинах марки «сорбфил». Различие в подвижности на пластинах может быть связано с уменьшением полярности силикагеля в связи с наличием привитой группы C_3 на пластинах марки «плазмохром». Неполярные алкильные привитые цепи с числом углерода до четырёх способны проникать во внутренний объем частиц силикагеля, в результате чего уменьшается радиус пор. Сапонины как высокополярные высокомолекулярные соединения слабо удерживаются на пластине марки «плазмохром», чем и объясняются низкие значения показателей разделения гликозидов.

По результатам хроматографирования, представленным в таблице 3, оптимальными являются пластины «сорбфил» размером 10×10 см. Дальнейшее увеличение высоты, судя по значениям R_s и N , не улучшало разделение и приводило к размыванию и удлинению полученных зон вдоль направления движения растворителей.

Под оптимизацией разделения в ТСХ понимают выбор условий эксперимента, которые позволяют провести удовлетворительное разделение смеси веществ на пластине. Изменение состава ПФ – наиболее экономичный способ повышения качества хроматографической методики.

В работе использовали элюирующие системы, рекомендуемые рядом литературных источников для анализа тритерпеновых сапонинов *Quillaja saponaria* [7,12,15]. Выбор оптимальной элюирующей системы осуществляли на основании расчетных параметров, приведенных выше.

Таблица 3

Величины хроматографических параметров фракции сапонинов на пластинах «сорбфил» и «плазмохром»
(Элюент: *Н-бутанол-вода-уксусная кислота* (4:5:1))

Марка пластин	Хроматографические параметры				
	R_f	R_s	N	H	α
«Сорбфил» 10x10	0.55±0.02	1.65	2597	0.029	2.47
	0.75±0.02		5526	0.014	
«Плазмохром» 10x10	0.84±0.03	1.62	2174	0.070	1.54
	0.89±0.03		2904	0.043	
«Сорбфил» 10x15	0.67±0.02	1.34	1837	0.043	1.26
	0.72±0.02		1919	0.041	

Известно, что хлороформ - активный компонент подвижных фаз №2-5, принадлежит к группе нелокализуемых на силикагеле растворителей и способен образовывать слабые Н-связи как с силанольными группами сорбента, так и с кислородсодержащими группами гликозидных соединений [14]. Поэтому добавление в состав элюента хлороформа рационально, о чем свидетельствует увеличение подвижности сапонинов как полярных соединений, а так же улучшение хроматографических параметров.

Добавление в состав подвижной фазы этанола (элюент №5) ухудшает хроматографические параметры (низкие величины R_f , R_s и N). Причиной указанных изменений может быть сорбция этанола на силикагеле, вследствие чего неподвижная фаза становится более гидрофильной, что способствует усилению удерживания гликозидов на сорбенте. Входящая в состав элюентов №4,7 уксусная кислота в отличие от этанола, становится активным компонентом подвижной фазы и дает удовлетворительные результаты хроматографического разделения сапонинов.

Известно, что эфиры меняют состояние неподвижной фазы, но почти не влияют на ее активность [14]. Судя по низким величинам R_f и N, подвижная фаза, содержащая в своем составе

эфиры (элюент №1), являющиеся апротонными растворителями, ухудшает хроматографические параметры, снижая эффективность разделения. Зоны сапонинов сильно размыты.

Положительный результат дает использование в качестве подвижной фазы элюента №7. Входящие в ее состав бутанол и уксусная кислота образуют эфир - бутилацетат, способный, судя по величинам N, эффективно разделять зоны сапонинов. Зоны сапонинов в этой системе имеют округлую форму, что предполагает линейную изотерму сорбции. Подобный вид изотерм обеспечивает высокую воспроизводимость результатов [11-12,14]. В остальных системах пятна зон имели овальную форму, и, как следствие, низкую селективность разделения. Анализ подобных хроматограмм затруднителен.

Анализ литературных источников в области исследования структуры индивидуальных соединений в суммарной фракции выделяемых сапонинов [15-20], согласно полученным величинам удерживания, позволил провести идентификацию гликозидов, исследуемых в настоящей работе. На рис. 7 приведены структурные формулы сапонинов, присутствующих в суммарной фракции.

В таблице 6 указаны основные синонимы названий гликозидов и их молекулярная масса.

Таблица 5

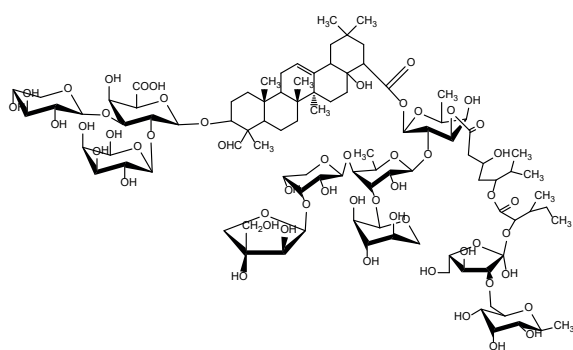
Значения хроматографических параметров разделяемых сапонинов в различных элюирующих системах

№	Элюент	R_f	R_s	H, мм	N	a
1.	Петролейный эфир- диэтиловый эфир- CH_3COOH (30:3,3:0,33).	0.29±0.01 0.33±0.01	1.27	0.06 0.05	1342 1771	1.21
2.	Петролейный эфир- хлороформ- ацетон(20:20:5).	0.54±0.01 0.59±0.01	1.46	0.02 0.02	4356 3914	1.23
3.	Хлороформ-этанол-вода-уксусная кислота (30:20:3:0,2)	0.43±0.03 0.48±0.03	1.18	0.04 0.03	2306 2939	1.22
4.	40% уксусная кислота в смеси хлороформ- этанол- H_2O (60:45:10)	0.45±0.03 0.57±0.03	1.57	0.05 0.03	1899 2714	1.62
5.	Хлороформ- этанол- вода (18:11:2,7)	0.18±0.01 0.23±0.01	1.03	0.35 0.21	585 1493	1.36
6.	Бутанол-этанол- аммиак(7:2:5)	0.38±0.04 0.45±0.5	1.34	0.10 0.06	771 1570	1.33
7.	Н-бутанол-вода-уксусная кислота (4:5:1)	0.55±0.02 0.75±0.01	1.65	0.03 0.01	2597 5526	2.47

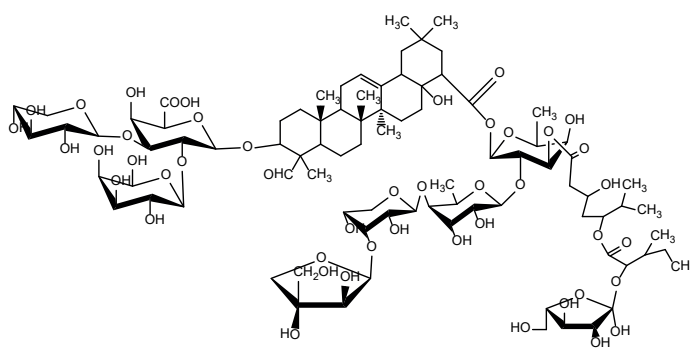
Таблица 6

Названия-синонимы и молекулярная масса идентифицированных индивидуальных сапонинов

Название (синоним)	R_1	R_2	R_3	Молекулярная масса, г/моль
QS-III, QS-17, QA-17	β -D-Xyl	β -D-Api	β -D-Gl	2296
QS-21, Quadri 2, B2, QA-21	β -D-Xyl	β -D-Api	-H	1988



а. Сапонин QS-17



б. Сапонин QS-21

Рис. 2. Структурные формулы сапонинов QS-17 и QS-21

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана методика качественной идентификации сапонинов растения *Quillaja*, являющимся одним из представителей семейства *гОСА*. Рекомендованы следующие оптимальные параметры хроматографирования сапонинов: пластины марки «сорбфил» размером 10x10, элюирующая система Н-бутанол-вода-уксусная кислота (4:5:1), обеспечивающая эффективное разделение сапонинов, детектирующий реагент – 20 % спиртовой раствор фосфорно-молибденовой кислоты.

2. Сопоставление и анализ полученных результатов хроматографирования и литературных данных позволили идентифицировать индивидуальные сапонины в суммарной фракции (QS-17 и QS-21) и сделать вывод об их предполагаемом строении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitra S. Micellar Properties of Quillaja Saponin. // Journal Agricultural and Food Chemistry. 1997. V.45, pp.1587-1595.
- Guclu-Ustundag O., Mazza G. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2007. V.47, pp. 231-258.
- Vincken J.-P., Heng L., A. de Groot, Gruppen H. // Phytochemistry. 2007. V. 68, pp. 275-297.
- Hu J., Lee S.O., Hendrich S., Murphy P.A. // J.Agric. FoodChem. 2002. V.50, pp. 2587–2594.
- Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Михина И.А., Селеменев В.Ф. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2009. Т. 75. № 5. С. 19-22.
- Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Селеменев В.Ф. // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 153-157.
- Атаманова С.А. [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39.№ 12. С. 29-31.
- Vincken Jean-Paul [et al.] // Phytochemistry. 2007. №68, pp. 275-297.
- Woldemichael Girma Moges, Wink Michael // J. Agric. Food Chem. 2001. № 49, pp. 2327-2332.
- Hostettmann K., Marston A. Saponins. Great Britain, Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 548 p.
- Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Тонкослойная хроматография/ Теоретические основы и практическое применение. Учебное пособие. 2-е изд. Саратов. Изд-во Саратовск. ун-та, 2006, 107 с..
- Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Селеменев В.Ф. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. Т. 77. № 3. С.22-24
- Мальчуковский Л.Б. [и др.] // Фармация. 1972. №6. С. 45-47.
- Романов О.Е., Будинов С.В., Штыков С.Н. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 4. С.563-571.
- Rodríguez-Díaza M. [et al.] // Journal of farmacy and farmacology. 2011. №63, pp.718-724.
- Bankefors J., Nord Lars I., Kenne L.// Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2008. V.90, pp. 178–187
- Juliane D Fleck, Carla Kauffmann, Fernando Spilki, Claiton L Lencina, Paulo M Roeh, Grace Gosmann // Vaccine. 2006. №11. V. 24, pp.7129-34.
- Toshio Miyase et al. // Phytochemistry. 1996. V.5, C. 1411-1418.
- Masayuki Yoshikawa et al. // Chem. Pharm. Bull.2001. V. 49, C. 863-870.
- Kabouche A., Kabouche Z.// Journal Nature Product. 2006. Т. 69. №3, С. 482–487.

Нгуен Тхань Ван, Мироненко Н. В., Брежнева Т. А., Селеменев В. Ф., Бережнова Т. А., Преображенская Н. С.

Воронежский государственный университет
Нгуен Т. В., студентка 4 курса химического факультета

Voronezh state University
Nguyen T. V., 4th year student of chemical faculty,

Мироненко Н. В., к.х.н., ассистент кафедры аналитической химии химического факультета
E-mail: natashamir@yandex.ru

Mironenko N. V., assistant professor of analytical chemistry, faculty of chemistry
E-mail: natashamir@yandex.ru

Брежнева Т. А., к.фарм.н., доц. кафедры фарм-химии и фармтехнологии фармацевтического факультета

Brezhneva T. A., PhD, Associate Professor, Dept. of pharmaceutical chemistry and technology

Селеменев В. Ф., д.х.н., проф., завед. кафедрой аналитической химии химического факультета

Selemenov V. F., doctor of chemistry, Professor, Department of analytical chemistry, faculty of chemistry

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

Voronezh state medical University n. a. N. N. Burdenko

Бережнова Т. А., д.мед.н., доцент, зав. кафедрой фармакологии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко

Berezhnova T. A., MD, DSci, Associate Professor, Department of pharmacology

Преображенская Н. С., к.мед.н., доцент кафедры фармакологии

Preobrazhenskaya Natalia Sergeevna, Lecturer Department of pharmacology

DEVELOPMENT OF TECHNIQUE FOR QUALITATIVE IDENTIFICATION OF INDIVIDUAL QUILLAJA SAPONINS BY TLC

Nguyen Thanh Van¹, N. V. Mironenko¹, T. A. Brezhneva¹, V. F. Selemenov¹, T. A. Berezhnova², N. S. Preobrazhenskaya²

¹Voronezh state University

²Voronezh state medical University n. a. N. N. Burdenko

Abstract. Thin layer chromatography is a simple and rapid method of identification of triterpene glycosides in various plants. Selection of optimal conditions of chromatographically was the aim of the present work. The object of the study was the fraction of triterpene saponins - derivatives quillaja acid production Belgium. The technique of separation and identification of Quillaja saponins by TLC. Optimal developer was 20%- ethanol solution of phosphorus-molybdenum acid, which areas of saponins were painted in dark green color (due to formation of complex compounds) to light green background a sorbent and retain color for a long time.

Determination of saponins by TLC was performed on plates of stamps "sorbfil" and "plasmogram" made in Russia. The influence of the polarity of the sorbent and the length of the chromatographic path on the quality of the areas of saponins. As the evaluation criterion used R_f values (mobility), R_s (resolution), the separation selectivity α . The separation efficiency was determined by the number of theoretical plates N and the height H. the results of the optimal chromatographically was plate "sorbfil" of size 10×10 cm.

Under the optimization of separation in TLC understand the choice of experimental conditions, which allow for a satisfactory separation of mixtures of substances on the plate. The change in mobile phase composition, the most cost effective method to improve the quality of chromatographic techniques. The used elution systems recommended next literary sources for the analysis of triterpene saponins of Quillaja saponaria. The choice of an optimal elution system was carried out based on the estimated parameters above.

On the basis of the calculated values of the chromatographic parameters, the optimum elution system N-butanol-water-acetic acid (4:5:1) to allow the separation zones of the individual saponins. Area of

saponins in the system had a rounded shape, which assumes a linear isotherm sorption. This kind of isotherms provides high reproducibility of results. Using literature data and the results obtained in the TLC analysis identified individual glycosides in the total fraction.

Keywords: saponin, TLC, eluting system developer, chromatographic parameters.

REFERENCES

1. Mitra S., Dunga S. R. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1997, V45, C.1587-1595.
2. Guclu-Ustundag O., Mazza G. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, №47, v.3, pp.231-258.
3. Vincken J.-P., Heng L., A. de Groot, Gruppen H. *Phytochemistry*, 2007, №68, pp.275-297.
4. Hu J., Lee S.O., Hendrich S., Murphy P.A., *J.Agric. FoodChem*, 2002, №50, pp. 2587–2594.
5. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Selemenov V.F., *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*, 2009, Vol. 75, No 5, pp. 19-22 .
6. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Selemenov V.F., *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2011, No 3. pp. 153-157.
7. Atamanova S.A., Brezhneva T.A., Slivkin A.I., Nikolaevskii V.A., Selemenov V.F., Mironenko N.V., *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2005, Vol.39, No 12, pp. 29-31.
8. Vincken Jean-Paul, Heng L. , Groot A., Gruppen H., *Phytochemistry*, 2007, Vol.68, pp.275-297.
9. Girma Moges Woldemichael, Michael Wink, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, Vol 49, pp. 2327-2332.
10. Hostettmann K., Marston A. *Saponins. Great Britain*, Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 548 p.
11. Sumina E.G., Shtykov S.N., Tyurina N.V. *Tonkosloinaya khromatografiya/ Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye. Uchebnoe posobie. 2-e izd. Saratov. Izd-vo Saratovsk. un-ta.*, 2006,107p.
12. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Selemenov V.F., *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*, 2011, Vol. 77. No 3, pp.22-24
13. Mal'chukovskii L.B., *Farmatsiya*, 1972, No 6., pp. 45-47.
14. Romanov O.E., Budinov S.V., Shtykov S.N. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2014, Vol. 14., No. 4, pp.563-571.
15. Maité Rodríguez-Díaz, Carla Delporte, Carlos Cartagena, Bruce K Cassels, Patricia González, Ximena Silva, Fredy León, Ludger A Wessjohann, *Journal of farmacy and farmacology*, 2011, No 63, pp.718-724.
16. Bankefors J., Lars I. Nord, Kenne L., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2008, No 90, pp. 178–187.
17. Juliane D Fleck, Carla Kauffmann, Fernando Spilki, Claiton L Lencina, Paulo M Roehle, Grace Gosmann, *Vaccine*, 2006, No11, Vol. 24, pp.7129-34.
18. Miyase T., Shiokawa K. I., Zhang D. M., *Phytochemistry*, 1996, No 5, pp. 1411-1418.
19. Yoshikawa M., Murakami T., Kishi A., Kageura T., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull*, 2001, No 49, pp. 863-870.
20. Kabouche A., Kabouche Z. *Journal Nature Product.*,2006, Vol. 69, No3, pp. 482–487.