

4. Сергеев С. В. Хирургическое лечение переломов проксимального метаэпифиза плечевой кости // Конференция с международным участием «Малоинвазивные технологии в травматологии и ортопедии»: Тез. докл. – Киев, 2010.

5. Травматология: Национальное руководство / Под ред. Г. П. Котельникова, С. П. Миронова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 808 с.

6. Baron J. A., Barrett J. A., Karagas M. R. The epidemiology of peripheral fractures // Bone. – 1996 – Vol. 18/3. – P. 209–213.

7. Baron J. A., Karagas M., Barrett J. et al. Basic epidemiology of fractures of the upper and lower limb among Americans over 65 years of age // Epidemiology. – 1996. – № 7. – P. 612–618.

8. Tingart M. J., Apreleva M., Lehtinen J. T., Capell B., Palmer W. E., Warner J. J. Lower limb skeletal muscle mass: development of dual-energy X-ray absorptiometry prediction model // Journal of applied physiology. – 2003. – Vol. 89. – P. 1380–1386.

9. Tingart M., Beckmann J., Opolka A., Matsuura M., Schaumburger J., Grifka J., Grässel S. Analysis of bone matrix composition and trabecular microarchitecture of the femoral metaphysis in patients with osteonecrosis of the femoral head // J. orthop. res. – 2009. – Vol. 27. – P. 1175–1181.

Поступила 12.11.2014

*Н. А. ДАВИТАВЯН<sup>1</sup>, Н. К. РУДЬ<sup>1</sup>, Ю. Ф. ЯКУБА<sup>2</sup>, А. М. САМПИЕВ<sup>1</sup>*

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИМОХИНОНА В СЕМЕНАХ ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ

<sup>1</sup>Кафедра фармации ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4; тел. 8-861-268-44-39. E-mail: farmdep@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», Россия, 350901, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, 39; тел. 8-861-255-52-71. E-mail: globa2001@mail.ru

Разработана методика количественного определения тимохинона в семенах чернушки посевной с использованием метода капиллярного электрофореза. Проведена ее валидация по параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Электрофоретическая методика может быть использована для нормирования и оценки качества сырья чернушки по действующему веществу – тимохинону.

*Ключевые слова:* семена чернушки посевной, капиллярный электрофорез, валидация.

***N. A. DAVITAVIAN<sup>1</sup>, N. K. RUD<sup>1</sup>, Y. F. YAKUBA<sup>2</sup>, A. M. SAMPIEV<sup>1</sup>***

**DEVELOPMENT METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THYMOQUINONE IN SEEDS NIGELLA SATIVA**

<sup>1</sup>Department of pharmacy Kuban state medical university, Russia, 350063, Krasnodar, Sedin str., 4; tel. 8-861-268-44-39. E-mail: farmdep@mail.ru;

<sup>2</sup>Federal state budgetary scientific institution North Caucasian regional research institute of horticulture and viticulture, Russia, 350901, Krasnodar, 40 Let Pobeda str., 39; tel. 8-861-255-52-71. E-mail: globa2001@mail.ru

The technique of quantitative determination of thymoquinone black cumin seeds sown by the method of capillary electrophoresis. Held its validation parameters: specificity, linearity, accuracy and precision. Electrophoretic technique can be used for valuation and assessment of quality of raw materials blackie by active ingredient – thymoquinone.

*Key words:* black cumin seeds sown, capillary electrophoresis, validation.

### Введение

Чернушка посевная (*Nigella sativa* L.) – однолетнее травянистое светло-зеленое, слегка сизое растение семейства лютиковых (*Ranunculaceae*) [14]. Проведенными ранее исследованиями была продемонстрирована перспективность применения в медицинской и фармацевтической

практике семян этого растения [9]. Анализ научных результатов фитохимических и фармакологических исследований в отношении семян чернушки посевной свидетельствует о том, что они обладают разнообразными видами фармакологической активности: антиоксидантной, желчегонной, гепатопротекторной, анальгезирующей,

антимикробной, бронхолитической и антигистаминной, а также противораковой [14]. Перечисленные эффекты в большей степени обусловлены содержащимся в семенах чернушки активным компонентом – тимохиномом, что подтверждено многочисленными фармакологическими исследованиями [16, 17, 18, 22].

В связи с тем что нормирование качества растительного сырья необходимо проводить с учетом содержания в нем действующих веществ как одного из важнейших показателей качества, представлялось целесообразным проведение количественного определения в семенах чернушки посевной тимохинона [12, 13].

В настоящее время для определения количественного содержания тимохинона в семенах чернушки используют различные хроматографические методы. В основном применяют метод изократической жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектором, а также метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [15, 20, 21, 23, 26]. Однако указанные хроматографические методы имеют ряд недостатков, а именно сложную предварительную пробоподготовку, значительные затраты на расход высокотоксичных органических растворителей и реагентов, пролонгированное время для проведения разделений.

Альтернативным методом для нормирования качества семян чернушки посевной по ведущему компоненту – тимохинону может выступить активно развивающийся и внедряющийся в практику фармацевтического анализа капиллярный электрофорез (КЭФ) [4, 6]. Данный метод основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Метод капиллярного электрофореза выгодно отличается от описанных выше хроматографических методов. К преимуществам метода можно отнести: высокую эффективность разделения, малый расход реактивов и практически отсутствие потребности в применении дорогостоящих высокочистых растворителей, отсутствие хроматографических колонок и, следовательно, проблем со «старением» сорбента и заменой колонок при выработанном ресурсе, отсутствие прецизионных дорогостоящих насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ, простоту аппаратного оформления и экспрессность анализа [7]. К тому же возможности метода капиллярного электрофореза позволяют проводить количественную оценку содержания как водорастворимых, так и некоторых жирорастворимых биологически активных веществ [19].

Целью настоящей работы явилась разработка методики количественного определения тимохинона в семенах чернушки посевной методом капиллярного электрофореза.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служили семена чернушки посевной, собранные и заготовленные в разных районах Краснодарского края, Республики Адыгея, а также коммерческие продукты, привезенные из Сирии и Индии.

Определение количественного содержания тимохинона в семенах чернушки посевной проводили методом капиллярного электрофореза на приборах «Капель-104РТ» и «Капель-103Р» (ОАО «НПФ Люмэкс», Россия), оборудованных УФ-детекторами. В работе были использованы: стандартный образец (СО) тимохинона (99%, Sigma); борная кислота (EP, Fluka), тетраборат натрия (99,5%, Sigma), изопропанол (99,7%, Sigma), кислота соляная (х. ч., Vecton), натрия гидроксид (х. ч., Vecton).

В эксперименте применяли кварцевый капилляр с внутренним диаметром 75 мкм эффективной длиной 0,5 м. Анализ проводили при положительном напряжении на капилляре 16 кВ и рекомендуемом термостатировании капилляра при +25° С. Ввод пробы осуществляли пневматически в режиме 30 мБар в течение 10 секунд. Время анализа составляло 10 минут. В качестве ведущего электролита использовали водный раствор 0,4%-ной борной кислоты, 0,05%-ного тетрабората натрия, 6%-ного изопропанола, 6%-ного этанола (срок хранения ведущего электролита – не более 14 суток). Между испытаниями проводили последовательную промывку капилляра в течение 2 минут каждым реактивом. Первоначально промывали 1 М раствором кислоты хлористоводородной, затем очищенной водой, 1 М раствором гидроксида натрия и вновь очищенной водой, а после – ведущим электролитом. Тестовый электрофорез составил 10 минут при положительном напряжении 16 кВ. Определение тимохинона в изучаемых объектах проводили в УФ-области спектра при длине волны 254 нм.

Методика количественного анализа тимохинона в семенах чернушки посевной заключалась в следующем. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,00 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл 50%-ного раствора спирта этилового и настаивали при периодическом перемешивании в течение 40 минут. Затем извлечение фильтровали через бумажный фильтр, предварительно смоченный 50%-ным спиртом этиловым, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли еще два раза в описанных выше условиях, каждый раз фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. Объем раствора доводили до метки 50% спиртом этиловым и перемешивали.

Для построения калибровочного графика готовили серию растворов СО тимохинона с учетом

его фактического количественного содержания в образце. Для этого 0,100 г (точная навеска) тимохинона растворяли в 50%-ном спирте этиловом в мерной колбе вместимостью 100 мл (раствор А), тщательно перемешивали до полного растворения, затем доводили до метки указанным растворителем. Затем вносили 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0 20,0 мл стандартного раствора А в мерные колбы вместимостью 100 мл соответственно и доводили до общего объема 50%-ным спиртом этиловым. Градуировочные растворы СО тимохинона использовали свежеприготовленными.

Анализируемые пробы дозировали в прибор не менее трех раз и регистрировали электрофореграммы для каждого ввода. По установленным градуировочным характеристикам, используя электрофореграмму водно-спиртового раствора из семян чернушки, рассчитывали содержание тимохинона (X) в абсолютно сухом сырье в процентах по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot C_x \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \text{ где:}$$

$C_x$  – концентрация тимохинона, найденная по градуировочному графику, %;

$m$  – масса сырья в граммах;

$W$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Результаты полученных исследований подвергали статистической обработке [2, 11].

### Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительный анализ электрофореграмм СО тимохинона (рис. 1) с водно-спиртовым извлечением из семян чернушки посевной (рис. 2) выявил присутствие тимохинона (пик 1) в данном растительном объекте. Помимо этого, как видно на рисунок 2, пик тимохинона отчетливо разделен от

других компонентов сырья. Этот факт позволил применить описанные выше условия пробоподготовки семян чернушки с целью проведения оценки количественного содержания в них тимохинона методом капиллярного электрофореза.

Доказательство валидности методики осуществляли по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность [10].

Специфичность аналитического метода определяли путем совпадения времен миграции пика тимохинона на электрофореграммах СО и водно-спиртового извлечения из семян чернушки. Кроме того, действующее вещество (тимохинон), содержащееся в семенах чернушки, четко определяется в присутствии других веществ. Подтверждающим фактом специфичности выбранной электрофоретической методики послужило также использование добавки СО тимохинона к извлечению из семян чернушки (рис. 3).

Картина спектра, приведенная на рисунке 3, показывает, что после добавления раствора СО тимохинона к водно-спиртовому извлечению из семян чернушки посевной пик 1 определяемого вещества остается однородным, а его площадь возрастает пропорционально количеству добавленного стандарта. Помимо этого наблюдается сохранение коэффициента асимметрии пика на уровне 0,8 и эффективности – порядка 8500 теоретических тарелок, что свидетельствует о специфичности предлагаемого электрофоретического метода для оценки качества семян чернушки посевной.

Для подтверждения линейности электрофоретической методики строили график зависимости фотометрического сигнала (площади пика) от концентрации тимохинона для девяти градуировочных точек. Градуировочный график

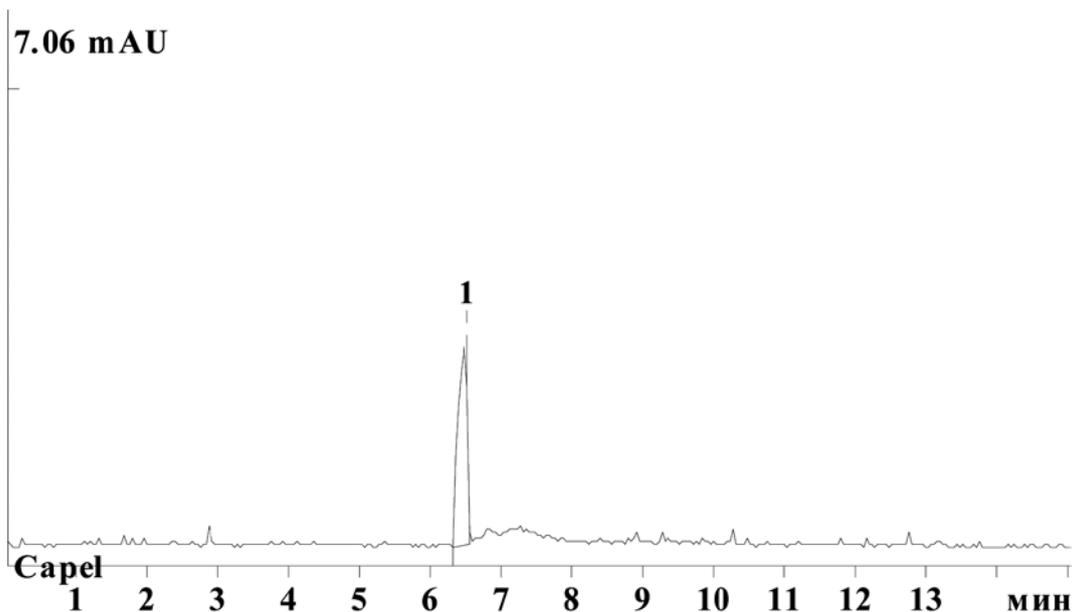


Рис. 1. Электрофореграмма раствора СО тимохинона

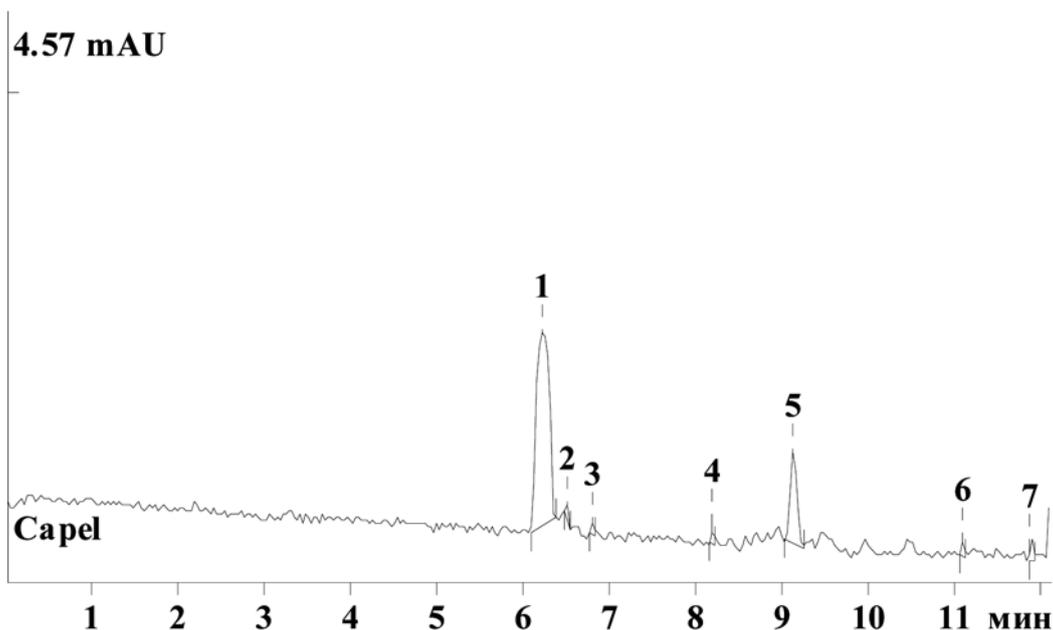


Рис. 2. Электрофореграмма извлечения из семян чернушки посевной (пик 1 – тимохинон)

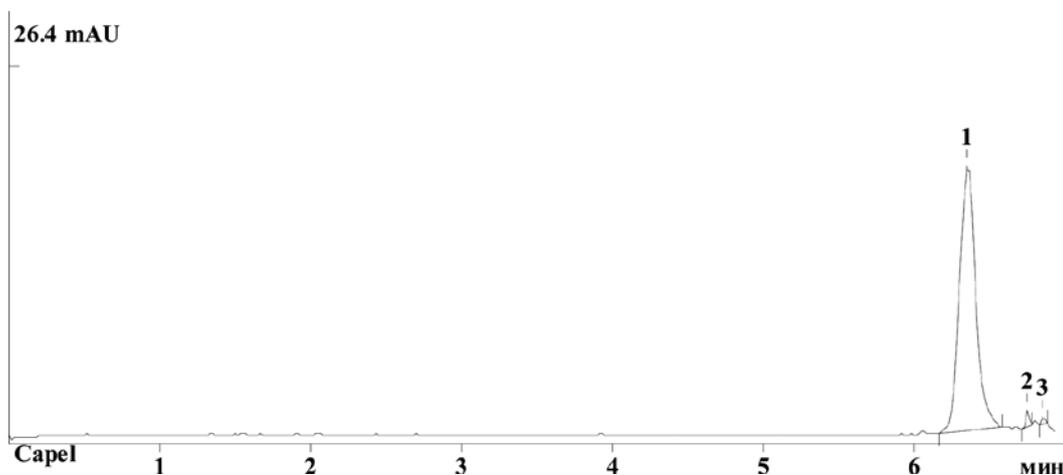


Рис. 3. Электрофореграмма извлечения из семян чернушки посевной с добавкой раствора СО тимохинона

зависимости площади пика от концентрации тимохинона в растворе изображен на рисунке 4.

Линейная зависимость фотометрического сигнала от концентрации тимохинона, наблюдаемая в интервале концентраций от 0,0001% до 0,1%, была аппроксимирована посредством программного обеспечения «Мультихром» линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов:  $y=1,18766x$ . Коэффициент корреляции составил 0,99992. Таким образом, проиллюстрированный на рисунке 4 градуировочный график, полученное уравнение линейной регрессии и значение коэффициента корреляции позволяют сделать заключение о том, что предлагаемая методика обладает линейной зависимостью.

Дальнейшая валидация электрофоретической методики проводилась по параметру «правиль-

ность», определение которого осуществляли с помощью метода добавок. Для этого готовили модельные смеси на трех уровнях концентраций, состоящие из водно-спиртового извлечения из семян чернушки посевной с установленным содержанием тимохинона и введенного в них известной концентрации раствора СО тимохинона. Результаты определения количественного содержания тимохинона в модельных смесях методом капиллярного электрофореза представлены в таблице 1.

Результаты проведенных исследований (табл. 1) демонстрируют, что показатель открываемости (R) в определении содержания тимохинона в модельных смесях варьировал от 98,52% до 101,54%.

Следующим этапом валидации явилось определение экстремальных показателей

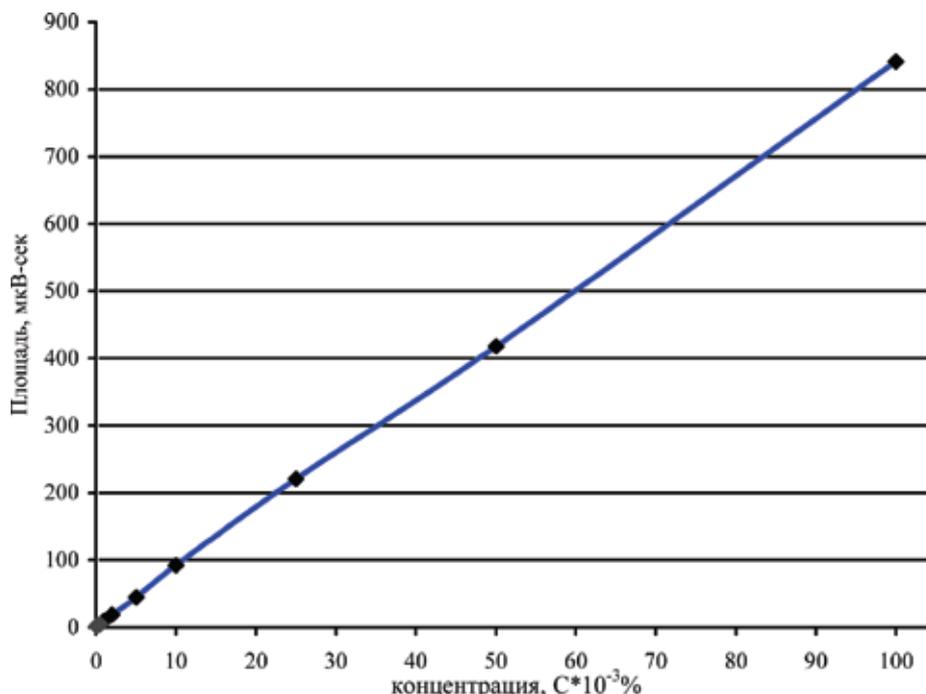


Рис. 4. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации тимохинона в растворе

Таблица 1

### Результаты количественного определения тимохинона в модельных смесях

Установленное содержание тимохинона в семенах чернушки, %	Концентрация (%) введенного раствора СО тимохинона	Ожидаемое содержание тимохинона в модельной смеси	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение	Откры- вае- мость (R), в %	Среднее значение открыва- емости (R), в %
1,25	0,05	1,30	1,29	1,31	99,23	100,51
1,25	0,05	1,30	1,32		101,54	
1,25	0,05	1,30	1,31		100,77	
1,25	0,10	1,35	1,34	1,34	99,25	99,50
1,25	0,10	1,35	1,33		98,52	
1,25	0,10	1,35	1,36		100,74	
1,25	0,15	1,40	1,41	1,40	100,71	100,24
1,25	0,15	1,40	1,38		98,57	
1,25	0,15	1,40	1,42		101,43	

прецизионности, установление которых проводили на одном серийном образце семян чернушки посевной (табл. 2). Параметр «повторяемость (сходимость)» электрофоретической методики оценивали в одной химической лаборатории в пределах короткого промежутка времени. Испытания проводили на приборе «Капель-104РТ» с применением одинакового набора реактивов и с участием одного и того же оператора. Изучение межлабораторной прецизионности (воспроизводимости) осуществляли в разных лабораториях на приборах «Капель-104РТ» и «Капель-103Р» с участием разных операторов.

Данные, отображенные в таблице 2, показывают, что при изучении параметров «повторяемость

(сходимость)» и «межлабораторная прецизионность (воспроизводимость)» относительное стандартное отклонение составило 1,55% и 1,82%, 1,87% и 2,59% соответственно.

Таким образом, по совокупности проведенных исследований можно сделать заключение о том, что метод капиллярного электрофореза, предлагаемый для оценки количественного содержания тимохинона в семенах чернушки посевной, показал соответствие полученных валидационных параметров (специфичность, линейность, правильность и прецизионность) требованиям отечественных [1, 3, 5, 8] и международных [25, 26] нормативных документов.

Последующие исследования были связаны с апробацией разработанной электрофоретичес-

### Результаты валидации электрофоретической методики по параметру «прецизионность»

Повторяемость (сходимость)				
Номер образца	Содержание тимохинона в семенах, % (день 1)	Метрологические характеристики	Содержание тимохинона в семенах, % (день 2)	Метрологические характеристики
1	1,26	$\bar{X}=1,26$ $S=0,01949$ $S_x=0,00796$ $Sr=1,55\%$ $\Delta X=0,05$	1,27	$\bar{X}=1,30$ $S=0,02366$ $S_x=0,00966$ $Sr=1,82\%$ $\Delta X=0,06$
2	1,27		1,28	
3	1,24		1,33	
4	1,25		1,29	
5	1,23		1,32	
6	1,28		1,31	
Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость)				
1	1,25	$\bar{X}=1,24$ $S=0,02324$ $S_x=0,009489$ $Sr=1,87\%$ $\Delta X=0,059$	1,29	$\bar{X}=1,27$ $S=0,03286$ $S_x=0,01342$ $Sr=2,59\%$ $\Delta X=0,08$
2	1,24		1,28	
3	1,26		1,21	
4	1,22		1,27	
5	1,21		1,25	
6	1,27		1,30	

Таблица 3

### Количественное содержание тимохинона в семенах чернушки посевной

Номер серии	Содержание тимохинона, %	Метрологические характеристики
1	1,13	$S=0,01483$ ; $S_x=0,00606$ ; $\Delta x=0,04$ ; $\varepsilon=3,54\%$
2	1,25	$S=0,01342$ ; $S_x=0,00548$ ; $\Delta x=0,03$ ; $\varepsilon=2,40\%$
3	1,19	$S=0,01366$ ; $S_x=0,00558$ ; $\Delta x=0,04$ ; $\varepsilon=2,94\%$
4	1,28	$S=0,01732$ ; $S_x=0,00707$ ; $\Delta x=0,05$ ; $\varepsilon=3,36\%$
5	1,16	$S=0,01414$ ; $S_x=0,00577$ ; $\Delta x=0,04$ ; $\varepsilon=3,45\%$

**Примечание:** образец 1 – Краснодарский край, ст. Динская. Образец 2 – Краснодарский край, ст. Васюринская. Образец 3 – Республика Адыгея, пос. Энем. Образец 4 – Индия. Образец 5 – Сирия.

кой методики непосредственно на растительном сырье – семенах чернушки посевной. В результате изучения влияния различных экстрагентов, температуры и соотношения фаз между сырьем и экстрагентом было установлено, что оптимальным экстрагентом является 50%-ный спирт этиловый, оптимальное время экстракции – 40 минут при комнатной температуре и соотношении сырья и экстрагента 1:100.

С помощью капиллярного электрофореза была проведена количественная оценка тимохинона в семенах чернушки посевной, результаты которой приведены в таблице 3.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, содержание тимохинона в различных образцах семян чернушки посевной колебалось в интервале от 1,13% до 1,28%.

Таким образом, разработана методика количественного определения тимохинона в семенах чернушки посевной с помощью капиллярного электрофореза и проведена ее валидация. Электрофоретическая методика может быть рекомендована для нормирования и оценки качества семян чернушки посевной по ее активному компоненту – тимохинону.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев А. П. Валидация аналитических методов / А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
3. ГОСТ Р. ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

Часть 1. Основные положения и определения. Введ. 23.04.02. – М., 2002. – 32 с.

4. *Беленький Б. Г.* Высокоэффективный капиллярный электрофорез. – СПб: Наука, 2009. – С. 12.

5. *Береговых В. В.* Валидация в производстве лекарственных средств / В. В. Береговых, Ж. И. Аладышева, И. А. Самылина // Фармация. – 2008. – № 3. – С. 10–12.

6. *Комарова Н. В.* Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – Санкт-Петербург: Веда, 2006. – С. 50–51.

7. *Морзунова Т. Г.* Капиллярный электрофорез в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фармац. журнал. – 2006. – № 3. – С. 39–52.

8. *Пятигорская Н. В.* Стандарт предприятия «Валидация» // Фармация. – 2008. – № 3. – С. 13–14.

9. *Рудь Н. К.* Основные результаты фитохимического и фармакологического исследования чернушки посевной (обзор) / Н. К. Рудь, А. М. Сампиев, Н. А. Давитавян // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2013. – № 25 (168). – С. 207–212.

10. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под редакцией Н. В. Юргеля (и др.). – Москва, 2007. – 192 с.

11. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / С. Н. Быковский, И. А. Василенко, М. И. Харченко (и др.). – М.: изд-во «Перо», 2014. – 656 с.

12. Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья / А. Н. Миронов (и др.) // Ведомости НЦ ЭСМП. – 2013. – № 2. – С. 52–56.

13. *Шемерянкина Т. Б.* Требования к стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на его основе / Т. Б. Шемерянкина, Т. А. Сокольская, Т. Д. Даргаева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 3. – С. 223–226.

14. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb / Aftab Ahmad (et al.) // Asian. pac. j. trop. biomed. – 2013. – № 3 (5). – P. 337–352.

15. *Abou-Basha L.* Thin layer chromatographic assay of thymoquinone in black seed oil and identification of dithymoquinone and thymol / L. Abou-Basha, M. S. Rashed, H. Y. Aboul-Enein // Journal of liquid chromatography. – 1995. – № 18. – P. 105–115.

16. Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake / Abdal basit Adam Mariod, Ramlah Mohamad Ibrahim, Maznah Ismail (et al.) // Food chemistry. – 2009. – № 116. – P. 306–312.

17. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR-g pathway / Chern Chiuh Woo, Ser Yue Loo, Veronica Gee (et al.) // Biochemical pharmacology. – 2011. – № 82. – P. 464–475

18. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial bio film formation / K. Chaieb, B. Kouidhi, H. Jrah[et ol] // BMC complementary and alternative medicine. – 2011. – № 11. – P. 29–34.

19. *Gotti R.* Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2011. – № 55. – P. 775–801.

20. *Ghosheh O. A.* High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed *Nigella Sativa L.* / O. A. Ghosheh, A. A. Houdi, P. A. Crooks // J. pharm. biomed. anal. – 1999. – V. 19. № 5. – P. 757–762.

21. *Hadad G. M.* High performance liquid chromatography quantification of principal antioxidants in black seed (*Nigella Sativa L.*) phytopharmaceuticals / G. M. Hadad, R. A. Salam, P. M. Soliman, M. K. Mesbah // J. AOAC. – 2012. – V. 95. № 4. – P. 1043–1047.

22. *Kanter M.* Hepatoprotective effects of *Nigella sativa L.* and *Urticadioica L.* on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats / M. Kanter, O. Coskun, M. Budancamanak // World journal of gastroenterology. – 2005. – № 11 (42). – P. 6684–6688.

23. *Yehualashet Belete.* HPTLC assay of thymoquinone in black seed and black seed oil (*Nigella Sativa Linn*) and identification of thymoquinone conversion with Uv-Vis / Yehualashet Belete, Ermias Dagne // Journal of drug delivery & Therapeutics. – 2014. – № 4 (4). – P. 1–5.

24. Validation of compendial methods. General Chapter <1225>: United States pharmacopoeia XXV. – National Formulary, XXV. – Rockville, MD. – The United States pharmacopoeial convention – 2002. – P. 2256–2259.

25. *Veessman J.* Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry // J. pharm biomed analysis. – 1996. – № 14. – P. 867–869.

26. *Velho-Pereira R. M.* Validated high performance thin-layer chromatographic method for the quantification of thymoquinone in *Nigella Sativa* extracts and formulations / R. M. Velho-Pereira, Ch. R. Barhate, S. R. Kulkarni, A. G. Jagtap // Phytochemical analysis. – 2011. – V. 22. № 4. – P. 367–373.

Поступила 13.01.2015