



ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

PHARMACEUTICAL SCIENCES

УДК 543.544.943.3; 543.63 [615.322]

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКЛАРЕОЛА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

QUANTIFICATION OF SCLAREOL BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

А.А. Зинченко¹, Е.О. Давиденкова¹, О.О. Новиков²,
Е.Т. Жилиякова², А.Ю. Малютина²
А.А. Zinchenko¹, Е.О. Davidenkova¹, О.О. Novikov²,
Е.Т. Zhilyakova², А.Yu. Malyutina²

¹Национальный фармацевтический университет,
Украина, 61002, г. Харьков, ул. Пушкинская, д.53

²Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д.85

¹National Pharmaceutical University, Ukraine, 61002, Kharkov, Pushkinskaya St., 53

²Belgorod National Research University, Russia, 308015, Belgorod, Pobeda St., 85

E-mail: novikov@bsu.edu.ru, pisarev@bsu.edu.ru

Аннотация

Сclareол (1-(3-гидрокси-3-метилпент-4-енил)-2,5,5,8а тетраметил-декагидро-нафт-2-ол) – дитерпеновый спирт, представитель терпеноидов, применяемый в парфюмерной и медицинской промышленности. Проведение технологических процессов получения склареола требует соответствующего аналитического обеспечения, связанного с количественным определением склареола в исходном сырье, в промежуточных и готовых продуктах. Для количественного определения склареола в растительном сырье и продуктах его переработки применяют методы газовой и жидкостной хроматографии, а также метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Целью настоящей работы являлось разработка методики количественного определения склареола методом ТСХ и исследование основных метрологических характеристик методики. Разработана методика количественного определения склареола в продуктах переработки мускатного шалфея методом тонкослойной хроматографии с использованием стандартных, готовых хроматографических пластинок со слоем силикагеля. В качестве подвижной фазы была выбран малотоксичный изобутилацетат, а в качестве проявляющего раствора использован раствор ванилина – фосфорной кислоты-этанола (2:70:50). Для количественного расчета предусмотрено использование специализированного сканера с длиной волны регистрации 700 нм. Проведено исследование валидационных характеристик. Экспериментально показано, что при нанесении на пластинку от 5 мкг до 30 мкг склареола методика не имеет статистически значимой систематической ошибки, а величина интегральной площади пятен линейна от нанесенного количества, коэффициент корреляции равен 0.992. В диапазоне от 10 мкг до 30 мкг – коэффициент корреляции равен 0.998.

Abstract

Sclareol (1- (3-hydroxy-3-methylpent-4-enyl) -2,5,5,8a tetramethyl-decahydro-naphth-2-ol) diterpene alcohol, a representative of terpenoids used in the perfume and medical industries. Conducting technological processes

for the production of sclareol requires adequate analytical support related to the quantitative determination of sclareol in the feedstock, intermediate and finished products. For the quantitative determination of sclareol in plant raw materials and products of its processing, gas and liquid chromatography methods, as well as the thin-layer chromatography (TLC) method are used. The purpose of this work was to develop a methodology for quantitative determination of sclareol by TLC and to study the main metrological characteristics of the technique. A methodology for quantitative determination of sclareol in the products of processing of musk sage by the method of thin layer chromatography using standard, finished chromatographic plates with a layer of silica gel has been developed. As a mobile phase, low-toxic isobutyl acetate was chosen, and as a developing solution, a solution of vanillin-phosphoric acid-ethanol (2:70:50) was used. For quantitative calculation, the use of a specialized scanner with a wavelength of registration of 700 nm is envisaged. The study of validation characteristics. It was shown experimentally that when applied to a plate from 5 µg to 30 µg of sclareol, the procedure does not have a statistically significant systematic error, and the integral area of the spots is linear from the applied amount, the correlation coefficient is 0.992. In the range from 10 µg to 30 µg, the correlation coefficient is 0.998.

Ключевые слова: склареол, шалфей мускатный, экстракция, перегонка с водяным паром, тонкослойная хроматография.

Keywords: scareol, *Salvia sclarea*, extraction, steam distillation, thin layer chromatography.

Введение

Склареол (*1-(3-гидрокси-3-метилпент-4-енил)-2,5,5,8тетраметил-декагидро-нафт-2-ол*) (рис.1) находит применение в парфюмерной и медицинской промышленности [Ткаченко, 2011, Chen, 2016, Alipour-Gougeh, 2015]. Основным источником получения склареола служат зеленые части мускатного шалфея (*Salvia sclarea* L.), оставшиеся после отгона эфирного масла [Ткаченко, 2011, Бабанов, 2016]. Это растительное сырье экстрагируют подходящим углеводородным растворителем, а экстракт выпаривают. Остаток после выпаривания представляет собой смесь восков, углеводов, триглицеридов, высших спиртов и других веществ. В количестве 25–55 % в остатке содержится склареол, который в дальнейшем, выделяют либо экстракцией, либо перегонкой с паром подходящего растворителя.

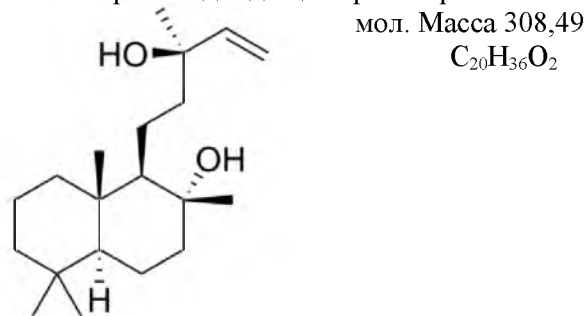


Рис.1. Структурная формула склареола
Fig.1. Structural formula sclareol

Цель работы

Проведение технологических процессов получения склареола требует соответствующего аналитического обеспечения, связанного с количественным определением склареола в исходном сырье, в промежуточных и готовых продуктах. Для количественного определения склареола в растительном сырье и продуктах его переработки применяют методы газовой и жидкостной хроматографии [Mahsoureh, 2012, Muhhamad, 2013, Remi, 2012], а также метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) [Móricz, 2015]. Метод ТСХ в простейшем варианте исполнения не требует применения специфического оборудования и может быть воспроизведен в производственных условиях. При наличии необходимого оборудования этот метод позволяет проводить и количественное определение. Поэтому целью настоящей работы являлась раз-



работка методики количественного определения склареола методом ТСХ и исследование основных метрологических характеристик методики.

Экспериментальная часть

В литературе приведено несколько условий для хроматографирования продуктов, содержащих склареол. Во многих экспериментах хроматографирование проводят с использованием пластинок с сорбентом, приготовленным на основе оксида алюминия [Шепель, 2010, Шепель, 2004], или на пластинах со слоем предварительно модифицированного силикагеля [Pang Minjie, 2008]. Поскольку, такие пластинки распространены не так широко, как с оксидом кремния, то для разработки методики анализа и проведения валидационных исследований были использованы готовые пластинки со слоем силикагеля. В результате проведения предварительных экспериментов для этих пластинок выбрана однокомпонентная легко стандартизируемая подвижная фаза, состоящая только из изобутилацетата. Применение однокомпонентной подвижной фазы имеет преимущество перед использованием трёх и более компонентных фаз, приведенных в работах [Шепель, 2010, Шепель, 2004, Pang Minjie, 2008], поскольку отпадает необходимость в корректировке их состава каждый раз после получения хроматограммы. Это снижает расход растворителей, к тому же выбранный растворитель значительно менее токсичен по сравнению с такими растворителями, как хлороформ, муравьиная кислота и тетрагидрофуран [Шепель, 2004, Pang Minjie, 2008].

Проявление хроматографических зон склареола на хроматограммах может быть осуществлено растворами анисового альдегида, ванилина или хлорида сурьмы (III или V) [Hellmut, 1990, Reich, 2006]. В ходе проведения предварительных экспериментов был выбран раствор ванилина с фосфорной кислотой. При обработке хроматограмм этим реактивом образуются интенсивные зоны фиолетового цвета, регистрируемые сканером в видимом диапазоне.

Материалы и оборудование

При разработке методики и проведения валидационных исследований использовали комплект аналитического оборудования производства фирмы «Camag», Швейцария, состоящий из аппликатора модели «Linomat 5», укомплектованный шприцом вместимостью 100 мкл, хроматографической камерой модели ADC 2, сканером модели «TLCScanner 3» и визуализатором. Управление комплектом и расчет осуществляется программным обеспечением «WinCats». Навески исследуемых образцов и склареола взвешивали на весах модели AUV220D Shimadzu, Япония, с неопределенностью взвешивания 33 мкг.

При разработке методики и изучении валидационных характеристик применяли хроматографические пластинки TLCSilicagel60 производства фирмы «Merck», Германия, и «Сорбфил ПТСХ-П-А», производства ЗАО «Сорбполимер», Российская Федерация.

В качестве испытуемых образцов использовали конкрет мускатного шалфея производства НПФ Элкор, г. Симферополь, и стандартный образец склареола с содержанием основного вещества 99.8 %.

Методика

Приготовление испытуемого раствора. 50 мг (точная навеска) испытуемого образца помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл спирта этилового 96 %, доводят объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фторопластовый фильтр с размером пор 0.47 мкм. При растворении и фильтрации испытуемого образца со склареолом происходит отделение восков и жиров, которые плохо растворимы в спирте.

Приготовление раствора сравнения склареола. 25 мг (точная навеска) СО склареола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл спирта этилового 96 % и доводят объём до метки этим же растворителем и перемешивают.



На линию старта, расположенную на расстоянии 20 мм от нижнего края хроматографической пластинки TLC Silicagel 60 производства фирмы «Merck», размером 20 × 10 см, с помощью автоматического аппликатора в токе очищенного воздуха наносят полосками длиной по 5 мм испытуемый раствор и раствор сравнения склареола в соответствии с табл. 1.

Таблица 1
Table 1

Порядок и количество наносимых растворов при количественном определении склареола
Order and amounts of the applied solutions at quantitative definition of a sklareol

№ трека (хроматограммы)	Объём наносимого раствора (мкл)	Наименование раствора
1	5	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
2	25	Испытуемый раствор 2 мг/мл
3	8	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
4	10	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
5	25	Испытуемый раствор 2 мг/мл
6	13	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
7	15	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
8	25	Испытуемый раствор 2 мг/мл
9	18	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
10	20	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
11	25	Испытуемый раствор 2 мг/мл
12	23	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
13	25	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
14	25	Испытуемый раствор 2 мг/мл
15	28	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
16	30	Раствор сравнения склареола 1 мг/мл
17	25	Растворитель (спирт этиловый 96 %)

Затем пластинку помещают в камеру с изобутилацетатом и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 7.5 см от линии старта, пластинку вынимают, сушат в токе воздуха до полного удаления следов растворителя (около 30 мин) и выдерживают в камере с раствором ванилина в течение 5 секунд. Затем пластинку выдерживают в течение 15 мин при температуре 120 С, охлаждают и сканируют каждую хроматограмму (трек) в следующих условиях:

- размер зоны сканирования – 8 мм×0.4 мм;
- скорость сканирования – 20 мм/сек;
- длина волны регистрации – 700 нм.

По данным сканирования хроматограмм раствора сравнения склареола определяют интегральные значения площадей пиков склареола, а по полученным данным методом наименьших квадратов рассчитывают коэффициенты линейной зависимости интенсивности пятен (S) от количества склареола (M_i), нанесенного на пластинку S=a+b×M_i.

Коэффициенты «а» и «b», рассчитывают по формулам 1, 2:

$$b = \frac{11 \sum_{i=1}^{i=11} (M_i \times S_i) - \sum_{i=1}^{i=11} M_i \times \sum_{i=1}^{i=11} S_i}{11 \sum_{i=1}^{i=11} M_i^2 - (\sum_{i=1}^{i=11} M_i)^2} \tag{1}$$



$$a = \frac{\sum_{i=1}^{i=11} S_i - b \sum_{i=1}^{i=11} M_i}{11} \quad (2)$$

где M_i – масса склареола в растворе сравнения, нанесенном на пластинку, в микрограммах;

S_i – площадь пика склареола, полученная сканированием хроматограммы растворов сравнения склареола.

Массу склареола в растворе сравнения, нанесенном на пластинку, в микрограммах, рассчитывают по формуле 3:

$$M_i = \frac{m_o}{25} \times V_i \quad (3)$$

где m_o – масса навески СО склареола, в миллиграммах;

25 – объём мерной колбы, в миллилитрах;

V_i – объём раствора сравнения, наносимого на пластинку, в микролитрах.

По полученным результатам проводят расчет концентрации склареола (С), в процентах, в исследуемом образце по формуле 4:

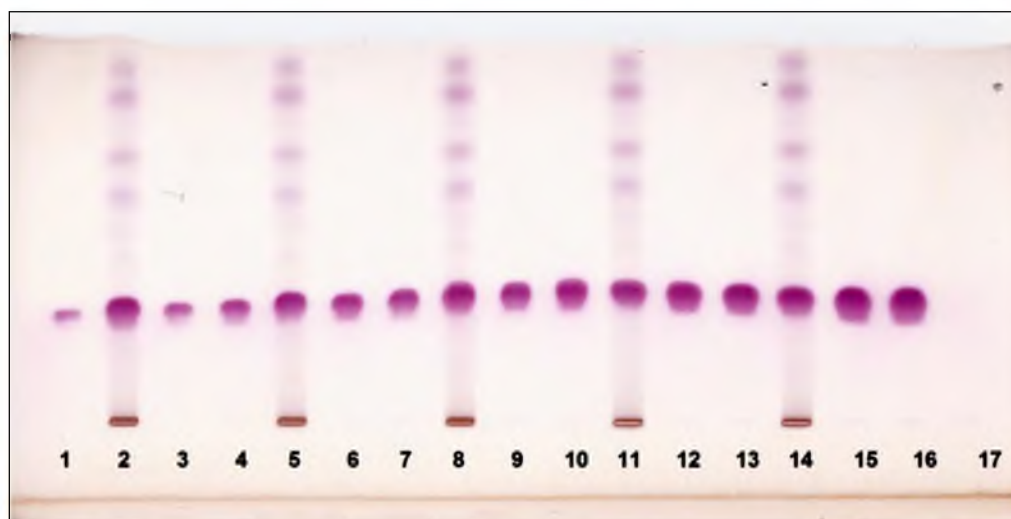
$$C = \frac{(S - a) \times 25 \times 100}{b \times V \times m} \quad (4)$$

где S – среднее значение площадей пиков склареола, измеренное путем сканированием хроматограмм испытуемого раствора;

V – объём испытуемого раствора, нанесенного на пластинку, в микролитрах;

m – масса навески испытуемого образца, в миллиграммах.

Пластинка с типичными хроматограммами испытуемого раствора и раствора сравнения склареола представлена на рис. 2. Хроматограммы, полученные при сканировании хроматографической пластинки, показаны на рис. 3.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Рис. 2. Изображение пластинки с хроматограммами раствора сравнения склареола (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15 и 16) и испытуемого раствора (2, 5, 8, 11, 14)

Fig. 2. The image plate with chromatogramme solution comparison sclareol (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15 and 16) and test solution (2, 5, 8, 11, 14)

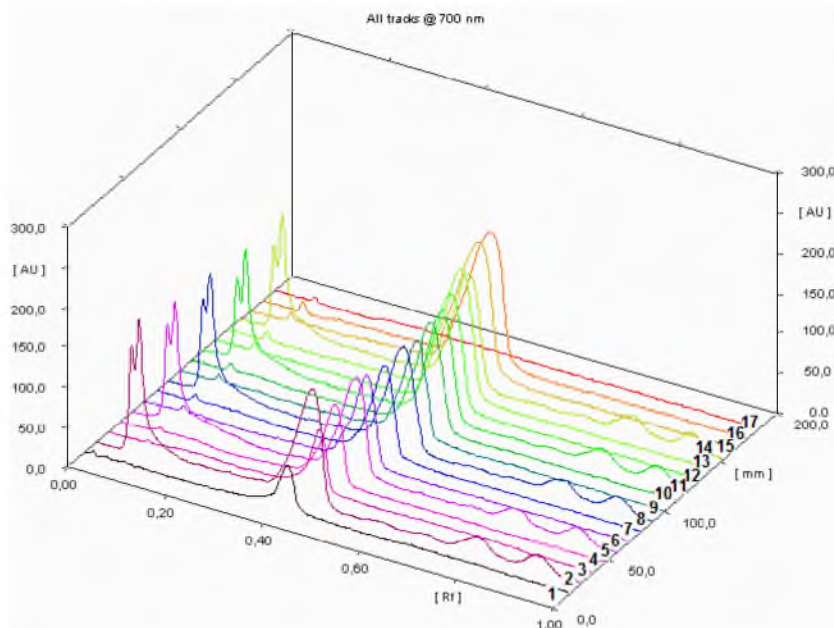


Рис. 3. Хроматограммы, полученные в результате сканирования пластинки, показанной на рис. 2
 Fig.3. Chromatogram sobtained by scanning of the plate shown in fig. 2

По результатам определения интегральных значений величин пятен на хроматограммах раствора сравнения склареола определены коэффициенты линейной зависимости интенсивности пятен от массы нанесенного на пластинку склареола. График и коэффициенты этой линейной зависимости представлены на рис. 4.

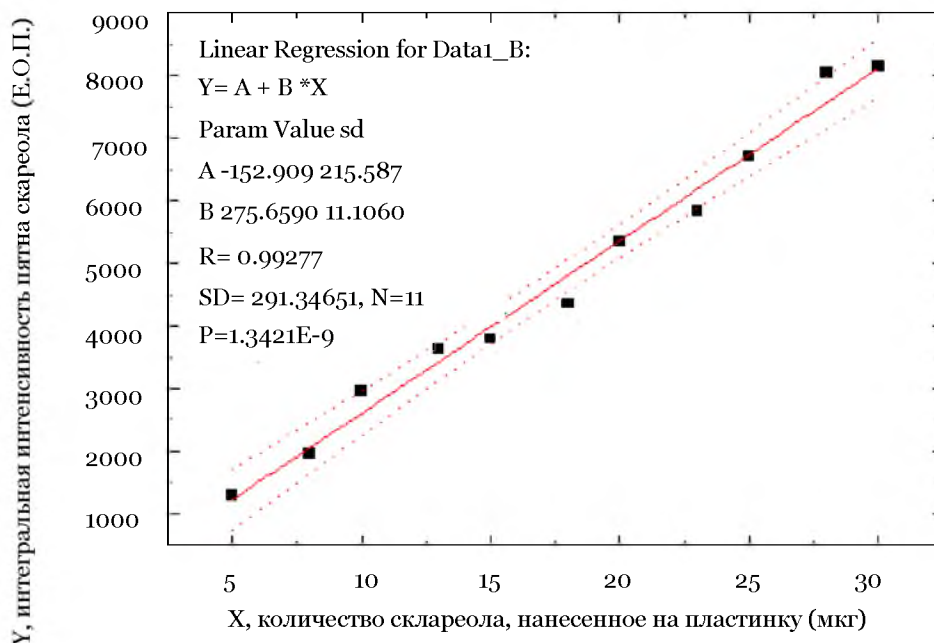


Рис. 4. График и коэффициенты линейной зависимости интенсивности пятен от массы нанесенного на пластинку склареола

Fig. 4. Graph and coefficients of the linear dependence of the intensity spots from the mass deposited on the plate sclareol

Как свидетельствуют приведенные данные, свободный член «А» линейного уравнения является статистически незначимым, поскольку его величина не превышает величину его доверительного интервала (Δ_a)

$$|A| \leq \Delta_a = t(0.95; n-2) \times S_a = 1.8331 \times 215.583 \approx 394.73$$



Среднее значение площадей пиков склареола на хроматограммах испытуемого раствора составляет 5252.86 ± 244.58 .

Подставляя приведенные на рис. 4 коэффициенты линейной зависимости и среднее значение и интегральных значений величин пятен склареола на хроматограммах испытуемого раствора в расчетную формулу, получаем значение концентрации склареола в тестируемом образце. В данном образце конкрета, из которого приготовлен испытуемый раствор, хроматограммы которого показаны на рисунках 2 и 3, содержание склареола равно 38.2 ± 0.2 %.

Валидация методики и обсуждение результатов

Валидационные исследования разработанной методики проводили по следующим характеристикам: специфичность (селективность), правильность, линейность, диапазон применения и предел количественного определения.

Для проведения этих исследований требуется приготовление ряда модельных смесей, по возможности повторяющих состав анализируемых проб с известной концентрацией склареола. Поскольку смоделировать полный состав сухого экстракта практически невозможно, для приготовления модельных образцов использовали пчелиный воск, не содержащий склареола. Навески воска и стандартного образца склареола помещали непосредственно в мерные колбы, после чего в соответствии с методикой готовили испытуемые растворы. Концентрация склареола в модельных образцах приведена в табл. 2.

Специфичность методики подтверждается тем, что на хроматограммах (рис. 5) испытуемого раствора обнаруживается пятно, совпадающее по положению и окраске с пятном склареола на хроматограмме раствора сравнения склареола. На хроматограммах раствора «плацебо» (воск) и на хроматограммах растворителя отсутствуют пятна, совпадающие по положению с пятном склареола на хроматограмме раствора сравнения склареола.

Характеристики правильность и линейность исследовали по результатам хроматографирования 9 растворов модельных смесей с диапазоном концентраций склареола от 20 % до 60 % и 9 растворов сравнения склареола с концентрациями от 20 % до 60 % с шагом 5 %. Уменьшение диапазона концентраций склареола в образцах сравнения и модельных образцах, по сравнению с описанным в методике, обусловлено невозможностью нанесения более 20 образцов на хроматографическую пластинку размером 20×10 см. Хроматограммы раствора сравнения склареола и модельных образцов представлены на рис. 5.

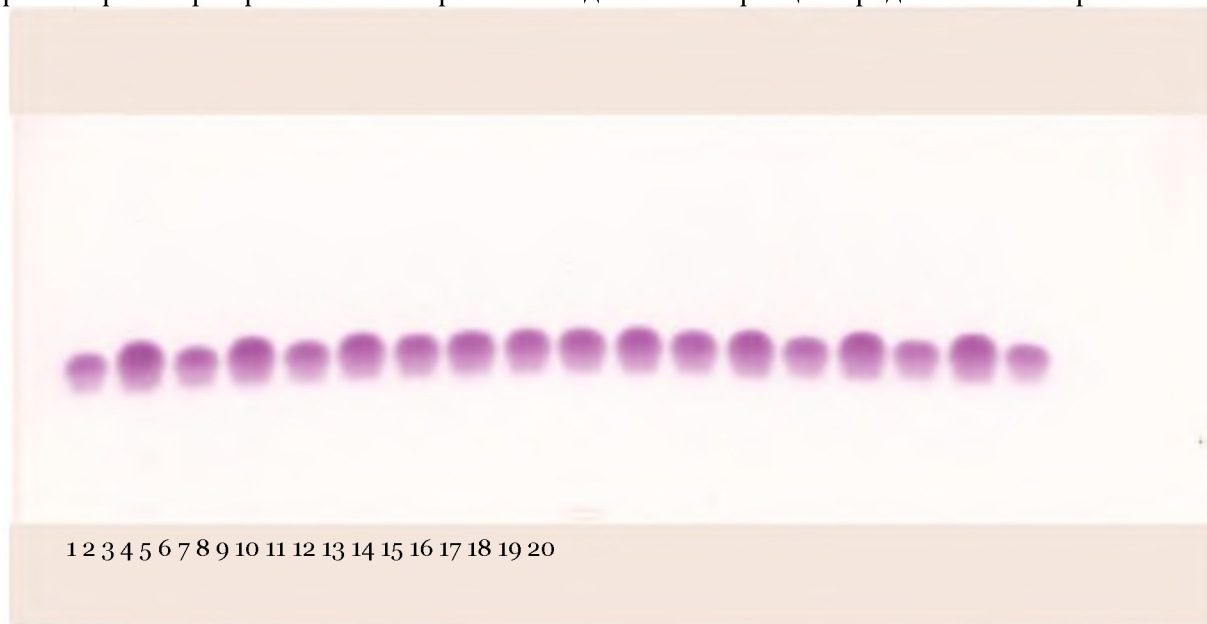


Рис. 5. Хроматограммы раствора сравнения склареола (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17) и растворов модельных образцов (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18), образца «плацебо» (19) и растворителя (20)
Fig. 5. Chromatograms of the solution comparison, sclareol (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 17) and solutions of models (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18), a sample of «placebo» (19) solvent (20)



Результаты расчета содержания склареола в модельных образцах и их статистическая обработка представлены в табл. 2.

Таблица 2
Table. 2

Результаты и их статистическая обработка определения склареола в модельных смесях
The results and their statistical processing definitions sclareol in model mixtures

№ хроматограммы (трека, рис. 4)	Введенное количество склареола (%)	Найдено склареола, в %	Найдено склареола, в %, по отношению к введенному количеству
18	20.55	20.97	102.04
16	25.09	25.98	103.55
14	30.07	30.42	101.16
12	35.01	36.37	103.87
10	39.45	38.96	98.75
8	45.12	44.13	97.81
6	49.54	48.41	97.72
4	55.03	53.72	97.62
2	60.01	60.33	100.53
Среднее значение Z_{cp} %			100.34
Относительное стандартное отклонение, s_z %			2.48
Относительный доверительный интервал $\Delta\% = t(95\%, 9-2) \times S_z = 1.895 \times S_z =$			4.70
Систематическая погрешность $\delta = Z_{cp} - 100 $			0.34

Как свидетельствуют полученные данные, методика характеризуется незначительной систематической ошибкой (менее 0.5 %), но относительно большим относительным стандартным отклонением, что характерно для подобных методик. График линейной зависимости найденной концентрации склареола от введенного количества представлен на рис. 6.

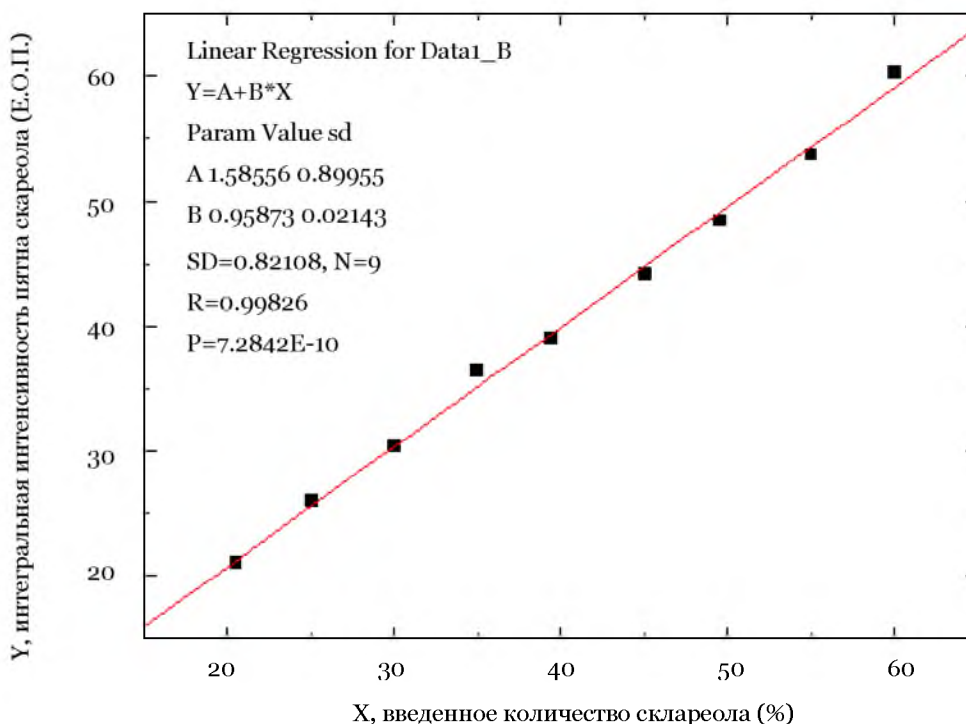


Рис. 6. График и коэффициенты линейной зависимости найденного количества склареола от введенного

Fig. 6. Graph and coefficients of the linear dependence found from the amount sclareol introduced



Стандартное отклонение величины «А» в этом случае также статистически незначимо, а коэффициент корреляции (R) линейной зависимости равен 0.998. Таким образом, экспериментально показано, что основные валидационные характеристики разработанной авторами методики соответствуют требованиям к методикам количественного определения при 5 % допуске содержания определяемого вещества в анализируемой пробе.

Заключение

1. Разработана методика количественного определения склареола в продуктах переработки мускатного шалфея (*Salvia sclarea* L.) методом ТСХ. Методика отличается от ранее описанных использованием готовых хроматографических пластинок со слоем силикагеля без дополнительной модификации и применением однокомпонентной нетоксичной, легко стандартизируемой подвижной фазой.

2. Экспериментально выбраны условия хроматографирования и условия проявления хроматограмм, обеспечивающие линейность интегральной интенсивности пятен склареола в диапазоне от 5 мкг до 30 мкг нанесенного количества склареола на пластинку.

3. Изучены основные валидационные характеристики разработанной методики. Показано, что в диапазоне концентраций склареола в объектах переработки мускатного шалфея от 20% до 60% методика не имеет статистически значимой систематической ошибки и коэффициент корреляции линейной зависимости найденного количества склареола от введенного составляет около 0.998.

Список литературы

References

1. Бабанов Н.С., Мемишева Л.С. 2016. Изучение селекционных образцов шалфея мускатного (*salvia sciarea* L.), как исходного материала для создания нового сорта. Традиции науки и образования в современном мире. 17 (2): 5–8.

Babanov N.S., Memisheva L.S. 2016. Izuchenie selektsionnykh obraztsov shalfeya muskatnogo (*salvia sciarea* L.), kak iskhodnogo materiala dlya sozdaniya novogo sorta [Studying of selection samples of a sage muscat (*salvia sciarea* L.), as initial material for creation of a new grade]. Traditsii nauki i obrazovaniya v sovremennom mire. 17 (2): 5–8. (in Russian)

2. Ткаченко К.Г. 2011. Эфирномасличные растения и эфирные масла: достижения и перспективы, современные тенденции изучения и применения. Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о земле. 1: 88–100.

Tkachenko K.G. 2011. Efirmaslichnyye rasteniya i efirmye masla: dostizheniya i perspektivy, sovremennyye tendentsii izucheniya i primeneniya [Efirmomaslichny plants and essential oils: achievements and prospects, current trends of studying and application]. Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya Biologiya. Nauki o zemle. 1: 88–100. (in Russian)

3. Шепель Д.Ф., Повар И.Г., Шепель Ф.Г., Макаев Ф.З. 2010. Хроматографические исследования склареола в конкете шалфея мускатного. Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез. Материалы Всероссийской конференции. Краснодар, 140.

Shepel' D.F., Povar I.G., Shepel' F.G., Makaev F.Z. 2010. Khromatograficheskie issledovaniya sklareola v konkete shalfeya muskatnogo. Analiticheskaya khromatografiya i kapillyarnyy elektroforez [Chromatographic study of sclareol in the concrete of Clary sage. Analytical chromatography and capillary electrophoresis]. Materialy Vserossiyskoy konferentsii. Krasnodar, 140. (in Russian)

4. Шепель Д. Ф. 2004. Разработка метода количественного определения склареола, полученного из шалфея мускатного (*SALVIA SCLAREA*). Conferința Tinerilor Cercetă toridin Moldova. 57.

Shepel' D. F. 2004. Razrabotka metoda kolichestvennogo opredeleniya sklareola, poluchennogo iz shalfeya muskatnogo (*SALVIA SCLAREA*) [Development of a method for the quantitative determination of sclareol derived from Clary sage (*SALVIA SCLAREA*)]. Conferința Tinerilor Cercetă toridin Moldova. 57. (in Russian)

5. Alipour-Gougeh S., Asgarpanah J. 2015. Essential and fixed oil chemical compositions of the seeds from the endemic species *Salvia Sharifii* RECH. F. & ESFAND. Journal of the Chilean Chemical Society. 60 (4): 2695–2697.

6. Chen Sh. Y. 2016. Sclareol Enhance Susceptibility to Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer. The FASEB Journal. 30 (1).



7. Shepel D. F., Povar I. G., Shepel F. G., Makaev F. Z. 2010. Chromatographic study of sclareol in the concrete of Clary sage. Analytical chromatography and capillary electrophoresis. Materials of all-Russian conference. Krasnodar. 140.

8. Hellmut Jork. Wernir Funk, Walter Fischer, Hans Wimmer, 1990. Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods. VCH VerlagsgesellschaftmbH. D6940, Deutschland. 1, 2.

9. Mansoureh Paknejad, Fatemeh Foroohi, Monteza Yousefzad, 2012. Antimicrobial activities of the essential oils of five *Salvia* species from Tehran province, Iran. Journal of Paramedical Sciences. 3 (2) 120–18.

10. Móricz A., Horváth G., Ott P, 2015. Direct bioautographic detection of antibacterial components of clary sage and spearmint essential oils. JPC - Journal of Planar Chromatography. Modern TLC. 28 (2): 121–125.

11. Muhammad Nadir, Munawwer Rasheed, Sikandar Khan Sherwani, ShahanaUrooj Kazmi, Viqar Uddin Ahmad. 2013. Chemical and antimicrobial studies on the essential oil from *Salvia santolinifolia* Boiss. Pak. J. Pharm. Sci., 26 (1): 39–52.

12. Pang Min-jie, Li Duo-wei, Wang Yi-chao, Jia Shao-liang, 2008. TLC scanning determination of sclareol Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis. 9: 1554–1556.

13. Reich Eike, Schuli Anna, 2006. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medical plants. Thieme medical Publishers, Inc. New-York. 264.

14. Remi Laville, Cecilia Castel, KarineFattarsi, Celine Roy, Laurent Legendre, Claire Delbecque, Pierre-Philippe Garry, Arthur Audrane, Xavier Fernandez. 2012. Low sclareol by-product of clary sage concrete: chemical analysis of a waste product of the perfume industry. Flavour and Frogrance Journal. Oct. <http://www.claryssime.fr/event2013a/FFJ3133.pdf>