

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Тольяттинский государственный университет»

**ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ**

(институт)

Химия, химические процессы и технологии

(кафедра)

020100.62 «Химия»

(код и наименование направления подготовки, специальности)

«Медицинская и фармацевтическая химия»

(наименование профиля, специализации)

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

на тему «ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ГИДРОФИЛЬНОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ НЕКОТОРЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ  
ПРЕПАРАТОВ»

Студент(ка)

Ю.И.Лопатченко

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

О.Б.Григорьева

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

**Допустить к защите**

Заведующий кафедрой, д.х.н, профессор Г.И. Остапенко

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

(личная подпись)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016г.

Тольятти 2016 г.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ

(институт)

Химия, химические процессы и технологии

(кафедра)

УТВЕРЖДАЮ

Завкафедрой

\_\_\_\_\_ Остапенко Г.И.  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение бакалаврской работы**

Студентке Лопатченко Юлии Игоревне

1. Тема «Оценка возможностей гидрофильной хроматографии в анализе некоторых фармацевтических препаратов»

2. Срок сдачи студентом законченной выпускной квалификационной работы 21 июня 2016

3. Исходные данные к выпускной квалификационной работе литература по теме исследования, образцы парацетомолсодержащих лекарственных препаратов, ЖХ Agilent 1220

4. Содержание выпускной квалификационной работы (перечень подлежащих разработке вопросов, разделов)

4.1 Подготовка литературного обзора с оценкой возможностей различных вариантов ВЭЖХ в анализе фармацевтических препаратов, в том числе влияния состава элюентов и рН.

4.2. Подбор условий хроматографического эксперимента для анализа 4-аминофенола: выбор колонки, состава элюента, рН подвижной фазы.

4.3. Построение градуировочной зависимости для проведения количественного анализа методом абсолютной градуировки и проведения

определения содержания 4-аминофенола в некоторых лекарственных образцах.

5. Ориентировочный перечень графического и иллюстративного материала: таблицы с экспериментальными результатами, график градуировочной зависимости, хроматограммы, презентация

6. Консультанты по разделам не предусмотрены

7. Дата выдачи задания «05» \_ноября\_2015г.

Руководитель выпускной  
квалификационной работы

\_\_\_\_\_

(подпись)

Григорьева О.Б.  
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

\_\_\_\_\_

(подпись)

Лопатченко Ю.И.  
(И.О. Фамилия)

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ  
КАФЕДРА «ХИМИЯ, ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И ТЕХНОЛОГИИ»

УТВЕРЖДАЮ: \_\_\_\_\_  
(подпись)

Зав. Кафедрой Остапенко Г.И.

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

**КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН**  
**бакалаврской работы**

Студента: Лопатченко Юлии Игоревны

по теме: Оценка возможностей гидрофильной хроматографии в анализе некоторых фармацевтических препаратов.

Наименование раздела работы	Плановый срок выполнения раздела	Фактически й срок выполнения раздела	Отметка о выполнении	Подпись руководителя
Подбор литературных источников и написание раздела «Литературный обзор»	07.04.2016 г.			
Выполнение экспериментальной части работы	02.05.2016 г.			
Написание раздела «Экспериментальная часть»	11.05.2016 г.			
Написание остальных разделов	14.05.2016 г.			
Верстка работы, проверка научным руководителем	15.05.2016 г.			
Проверка ВКР в системе «Антиплагиат.ВУЗ»	15.06.2016г.			
Оформление демонстрационного материала и устного доклада	20.06.2016 г.			

Руководитель выпускной квалификационной работы

\_\_\_\_\_  
(подпись)

О.Б. Григорьева  
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

\_\_\_\_\_  
(подпись)

Ю.И. Лопатченко  
(И.О. Фамилия)

## АННОТАЦИЯ

Выпускная квалификационная работа изложена на 52 страницах, включает в себя 11 таблиц и 16 рисунков. Список литературы представлен 66 источниками.

Объектами исследования в настоящей работе являются 4-аминофенол и лекарственные формы с его примесью на основе парацетамола.

Целью работы является исследование возможности применения метода гидрофильной хроматографии в анализе качественного и количественного состава фармацевтических препаратов на примере парацетомолсодержащих лекарственных средств, в том числе количественное определение 4-аминофенола в исследуемых лекарственных формах.

В литературном обзоре проанализированы возможности ВЭЖХ в анализе фармацевтических образцов, показаны недостатки ОФ-варианта и рассмотрены возможности ион-парного и гидрофильного режимов хроматографии.

В экспериментальной части приводятся объекты и методики проводимого хроматографического исследования.

В обсуждении результатов анализируются полученные хроматографические данные. Подобраны оптимальные условия для анализа, исследуемого нами 4-аминофенола, а также проведено разделение лекарственных форм, содержащих его в качестве примеси. С помощью метода абсолютной калибровки была построена градуировочная кривая и найдено его количественное содержание в лекарственных препаратах. Таким образом, в работе показаны хорошие перспективы в использовании режима гидрофильной хроматографии в анализе фармацевтических препаратов.

## СОДЕРЖАНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ .....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	10
1.1. ВЭЖХ как ведущий метод в контроле фармацевтических препаратов.....	10
1.2. Пробоподготовка и особенности контроля лекарственных веществ методом ВЭЖХ. ....	11
1.3. Достоинства и недостатки обращенно – фазовой хроматографии в данном контроле.....	17
1.4. Ионообменная и ион-парная хроматографии в анализе ЛС .....	19
1.5. Гидрофильная хроматография .....	23
1.6. Влияние рН ПФ на хроматографическое поведение ЛВ .....	27
1.7. Определение 4-аминофенола в ЛП.....	33
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	38
2.1. Реагенты, оборудование и объекты исследования .....	38
2.2. Методики экспериментов.....	39
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	41
3.1. Подбор хроматографических условий.....	41
3.2. Количественное определение 4-аминофенола .....	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	49

## ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ ВЭЖХ	Обращенно-фазовая ВЭЖХ
ЛП	Лекарственный препарат
ЛС	Лекарственное средство
ЛФ	Лекарственная форма
ЛВ	Лекарственное вещество
НФ	Неподвижная фаза
ПФ	Подвижная фаза
ТФЭ	Твердофазная микроэкстракция
БАВ	Биологически активное вещество
СФД	Спектрофотометрический детектор
ИПХ	Ион-парная хроматография
ИОХ	Ионообменная хроматография
ДИРФ режим	Режим динамически индуцированного раздела фаз
АФ	Аминофенол
ЛД <sub>50</sub>	Полулетальная доза

## ВВЕДЕНИЕ

Высокоэффективная жидкостная хроматография на сегодняшний день является ведущим методом в анализе фармацевтических препаратов и сложных природных объектов. Подавляющая доля таких исследований проводится в ОФ-варианте ВЭЖХ. Подбирая состав водно-органического реагента на колонке с неполярными алкильными фазами, удается решить широкий круг аналитических задач. Несмотря на очевидные преимущества, в ОФ ВЭЖХ анализе фармацевтических препаратов зачастую возникают сложности в связи со спецификой объектов исследования. Как правило, фармацевтические препараты представляют собой полярные, хорошо растворимые в воде объекты. Как сорбаты, они будут обладать высоким сродством к подвижной фазе, и быстро элюироваться из колонки. Факторы удерживания у таких сорбатов очень малы, избирательность метода становится низкой.

Альтернативным подходом может служить метод ион-парной хроматографии, с добавлением в подвижную фазу соответствующих модификаторов. Однако, подобное модифицирование зачастую становится необратимым и имеет смысл, если данная хроматографическая система ориентирована исключительно на подобный вид анализа.

Интересным и перспективным вариантом ВЭЖХ в анализе фармацевтических препаратов, на наш взгляд, является вариант гидрофильной хроматографии, когда полярная неподвижная фаза комбинируется с полярной же неподвижной фазой, которая модифицируется молекулами воды и становится способной к более длительному удерживанию водорастворимых объектов. Работ, посвященных использованию этого метода в анализе фармацевтических препаратов, крайне мало.

Целью нашей работы является исследование возможности применения метода гидрофильной хроматографии в анализе качественного и

количественного состава фармацевтических препаратов на примере парацетомолсодержащих лекарственных средств.

В связи с поставленной целью в задачи работы входило:

- проанализировать имеющиеся литературные данные, посвященные особенностям гидрофильного варианта ВЭЖХ и хроматографическому анализу фармацевтических препаратов;
- подобрать условия хроматографического эксперимента: колонку (неподвижную фазу), состав элюента, включая значение величины рН, скорость подачи подвижной фазы;
- получить градуировочную кривую для проведения количественного анализа 4-аминофенола в парацетомоле;
- оценить возможности подобранной хроматографической системы в анализе образцов некоторых лекарственных препаратов.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. ВЭЖХ как ведущий метод в контроле фармацевтических препаратов

Высокоэффективная жидкостная хроматография — это новая ступень в развитии жидкостной хроматографии, которая появилась за счет разработки новых сверхэффективных сорбентов. В современном мире очень актуально использование данного метода для анализа как лекарственных препаратов, так и лекарственных средств, ВЭЖХ используется для определения количества примесей и действующих веществ в препарате, биоэквивалентной оценке, качественной оценке лекарственных средств, а также при мониторинге в крови пациентов различных препаратов, определении токсичных веществ как сопутствующих компонентов при создании препаратов, исследовании процессов при хранении готовых лекарственных форм, с уверенностью можно сказать, что этот метод обогнал метод газовой хроматографии, хотя последний был открыт намного раньше и долгое время был лидирующим в анализе многокомпонентных веществ [1,2]. Огромное преимущество ВЭЖХ выступает в том, что она не требует применять другие инструментальные методы для количественных определений, но в то же время данный метод возможен в сочетании с другими и в некоторых случаях даже позволяет еще больше расширить хроматографическую область применения [3, 4].

Американская химико-аналитическая компания Agilent Technologies систематизировала огромную базу данных по обзору фармацевтических препаратов методом ВЭЖХ, задумка была осуществлена для того, чтобы дать сжатый обзор лекарственным препаратам и соответствующие хроматографические условия для каждого.

ВЭЖХ имеет популярность в создании новых медикаментов, а также в поиске условий для производственного контроля лекарств. Жидкостная хроматография высокого давления на 85% по своим условиям соответствует

анализу лекарственных веществ, этому способствуют такие плюсы метода как высокая чувствительность детектируемых систем, точность и быстрота, а также возможность анализа сложнокомпонентных смесей[5-7].

Известно, что в ВЭЖХ различают множество способов разделения, которые в основном основаны на использовании распределения, адсорбционном явлении, эксклюзии и ионном обмене. Из-за быстрого массопереноса при эффективном разделении в данном методе лекарственные препараты можно определять и разделять как с нейтральными молекулами, так и с ионами, также и высокомолекулярные препараты по фракциям. Однако, существует еще один принцип разделения, это аффинная хроматография, который основан на специфических взаимодействиях между молекулами в неподвижной фазе и молекулами разделяемого лекарственного препарата. Таким методом в основном разделяют биологически активные вещества, такие как полипептиды или белки.

## 1.2.Пробоподготовка и особенности контроля лекарственных веществ методом ВЭЖХ.

Использование ВЭЖХ метода является довольно простым, когда наш анализируемый компонент это индивидуальное лекарственным вещество в форме таблетки или раствора. Лекарства - это органические соединения с хромоформными группами, которые в основном поглощаются в УФ области спектра, они достаточно полярные и растворимы в воде. Пробоподготовка для таких препаратов заключается в растворении лекарственной формы в неподвижной фазе или соответствующем органическом растворителе с дальнейшим разбавлением и фильтрованием. Для самого анализа используется колонка с НФ С18, а подвижной фазой является водно-метанольный или водно-ацетонитрильный элюент с модификаторами, которые создают рН в области 2-3 [8].

Затруднительней обстоит дело с анализом многокомпонентных

лекарственных форм, так как их состав подразумевает содержание различных компонентов с разнообразными физико-химическими свойствами, также мы должны учесть наличие нормируемых примесей и вспомогательных веществ [9]. При таких обстоятельствах требуются длительные, затратные и трудоемкие индивидуальные методы хроматографии. Если же имеется в наличии хорошо отработанная методика, то ВЭЖХ метод позволит выполнить анализ всех соединений в одном цикле [10]. Примеры данных анализов приведены в таблице 1, в которой указаны хроматографические условия многокомпонентных лекарственных препаратов.

Таблица 1 – ВЭЖХ анализ многокомпонентных препаратов

Название и компоненты ЛС	Подвижная фаза и режим разделения	Сорбент, размер колонки, мм	Детектирование, нм	Литература
1	2	3	4	5
«Пенталгин ICN» (парацетамол, анальгин, фенobarбитал, кодеин, кофеин)	CH <sub>3</sub> CN /вода/ 0,025 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3.0; H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) градиент	C18, 150×4.0	212	[11]
«Пенталгин ICN» (парацетамол, анальгин, фенobarбитал, кодеин, кофеин)	1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / CH <sub>3</sub> CN (95/5)	CN, 150×3.9	212	[11]
«Спазмoвералгин нео» (парацетамол, бромизовал, фенobarбитал, кодеин фосфат, кофеин, эфедрин,	CH <sub>3</sub> CN / 0.05 М KH <sub>2</sub> PO (15/85)	CN, 150×3.9	215	[12]

атропина сульфат)				
----------------------	--	--	--	--

Продолжение таблицы 1.

1	2	3	4	5
«Пенталгин н» (анальгин, кофеин, напроксен, кодеин, фенобарбитал)	CH <sub>3</sub> CN /0.00625 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> Градиент	С18, 150×4.0	212	[13]
«Пенталгин н» (анальгин, кофеин, напроксен, кодеин, фенобарбитал)	CH <sub>3</sub> CN /0,011 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (рН 5.8) (5/95)	CN, 150×3.9	212	[13]
«Пенталгин» (анальгин, кофеин, пропифеназон, кодеин, фенобарбитал)	CH <sub>3</sub> CN /вода/ 0.025 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (рН 3.0; Н <sub>3</sub> РО <sub>4</sub> ), градиент	С18, 150×4.0	212	[14]
«Беллалгин» (анальгин, анастезин)	CH <sub>3</sub> CN /0.025 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (рН 4.8) (10/90) изократическое элюирование	CN, 150×3.9	220	[15]
«Аскофен II» (ацетилсалици- ловая кислота, кофеин, пара- цетамол, примесь салициловая кислота)	CH <sub>3</sub> CN / 0.025 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (рН 5.6) (10/90)	CN, 150×3.9	220	[16]
«Максиколд» (аскорбиновая кислота, парацетамол,	0.025 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (рН 3.0)/ 0.025 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (рН 6.8)/	С8, 150×4.6 3.5 мкм	243 216	[17]

фенилэфрин)	CH <sub>3</sub> CN (4/1)			
-------------	--------------------------	--	--	--

Продолжение таблицы 1.

1	2	3	4	5
«Каффетин», «Саридон» (пропифеназон, парацетамол, кофеин, кодеин)	CH <sub>3</sub> CN /H <sub>2</sub> O/диэтиламин (3/2.2/0.2)	C18 2×8 7 мкм	238 276	[18]
Местные анесте- тики (новокаин, анестезин, папаверин)	CH <sub>3</sub> CN /ФБ, рН 2.5 (60/40), 0.1 мл/мин	C18, 2×64	290 260	[19]
«Нео-теофедрин» (парацетамол, теофиллин, кофеин, эфедрин, фенобарбитал)	Ступенчатый градиент CH <sub>3</sub> CN /H <sub>2</sub> O (1/9) — 700 мкл CH <sub>3</sub> CN /H <sub>2</sub> O (3/7) — 800 мкл CH <sub>3</sub> CN /0.025M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3/2) — 800 мкл, 0.1 мл/мин	C18, 2×8 7 мкм		[20]
Местные анестетики (новокаин, анестезин, папаверин)	CH <sub>3</sub> CN /ФБ, рН 2.5 (60/40), 0.1 мл/мин	C18, 2×64	290 260	[19]

Хлорфенирамин, метскополамин, фенилэфрин	2% CH <sub>3</sub> COOH, 0.005 М гептан- сульфонат натрия, рН 2,6/ CH <sub>3</sub> CN (30/70), 2 мл/мин	CN, 250×4.6	262	[21]
--	---	----------------	-----	------

Отдельно можно поговорить о ЛП из растительного или животного сырья, методики анализа таких препаратов предполагают предварительную пробоподготовку в виде твердофазной экстракции, дополнительной очистки на колонках, выпаривания, экстракции и т.д. Предыдущие стадии дают достаточно часто ошибки и неточности, усложняют ВЭЖХ анализ. Если мы имеем дело с лекарствами на основе высокомолекулярных соединений, то для разделения используют такие методы хроматографии, как ионообменную, аффинную, обращенно-фазовую и эксклюзионную [22-28].

Заслуживает внимания и анализ витаминов, в связи с тем, что их состав многокомпонентен, а также они достаточно сильно распространены и весьма различаются по физико-химическим свойствам. Специфика витаминов и их метаболитов заключается в слабых электрофорных, флуорофорных, хромофорных свойствах и высокой полярности. Данные о анализе витаминов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Условия анализа методом ВЭЖХ витаминов

Объект, компоненты	Пробо- подготовка, экстрагент	Сорбент, размер колон- ки, мм	Подвижная фаза, режим разделения	Дете- кти- рова- ние, нм	Ли- тера- тура
Поливитаминный препарат (А, Е, К <sub>3</sub> , D <sub>2</sub> )	Н-гексан	Si, 100×5.4	Н-гексан/1,2- дихлорэтан/ н-бутанол	254	[29]
Рыбий жир (витамин А)	Гексан	Si, 120×2	Гексан/ди- этиловый эфир	326	[30]

			(98.8/1.2)		
Рыбий жир (D <sub>3</sub> )	Щелочной гидролиз, диэтиловый эфир/петролейный эфир /50/50	CN, 120×2	Гексан/изоамиловый спирт (98.4/1.6)	264	[30]

Продолжение таблицы 2.

«Асковертин» (витамин С)	Метанол, 0.03% TFU	CN, 250×4.6	MeOH/0.03% CF <sub>3</sub> COOH (21/79), 1мл/мин	230	[31]
Поливитаминовый препарат (А, D, Е)	Метанол	C <sub>18</sub> 2×120	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (99/1)	264, 286, 326	[30]
В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , никотиновая кислота, РР, В <sub>5</sub> , В <sub>6</sub> , В <sub>9</sub> , В <sub>12</sub> , К <sub>3</sub> , Н		C <sub>18</sub> 75×2	0.4 M LiClO <sub>4</sub> (pH 2.4)/ ацетонитрил градиент	210, 220, 250, 260, 280, 300	[32]

На фармацевтическом рынке существуют лекарственные препараты, в составе которых есть свободные аминокислоты. Некоторые из аминокислот достаточно нестабильны, так же они имеют достаточно большие различия в полярности и химической структуре, все это приводит к особому методу пробоподготовки, разделения и детектирования. В наше время популярным остается метод предколоночной дериватизации аминокислот с подшиванием по аминогруппе гидрофобных радикалов, которые потом используя ОФ ВЭЖХ можно легко поделить с дальнейшим флуорометрическим и спектрофотометрическим детектированием. На данный момент анализ аминокислот возможен и без проведения дериватизации, если использовать ионообменную колонку с 10-20 нг пределом обнаружения и анализируемым

временем примерно около 50 минут.

Для выделения и очистки биологически активных веществ из биологических жидкостей, к примеру кровь или слюна, а также пробоподготовки некоторых лекарственных веществ используют твердофазную микроэкстракцию (ТФЭ) [33-35].

### 1.3. Достоинства и недостатки обращенно – фазовой хроматографии в данном контроле

В данном варианте хроматографии используют в качестве неполярной стационарной фазы силикагели с привитыми группами, а в качестве подвижной полярной фазы смесь полярных растворителей и воды. Именно 90 % всех анализов ЛВ в ВЭЖХ приходится на ОФ хроматографию.

Самым распространенным сорбентом в данном варианте ВЭЖХ является сорбент с фазой C18, немного отстает от него сорбент C8. Приведенные сорбенты используются для анализа органических ЛВ с различными средами, а также они дают симметричные пики. Чаще всего применяют объемно-пористый силикагель, который упакован в виде сферических частиц, но в анализе лекарств чувствует огромное количество других различных видов. К примеру, совсем недавно появившиеся монолитные колонки, уже широко используются в анализе ЛС, имеют большие преимущества, а также более высокий срок службы [36-41]. Данные колонки представляют из себя цельный стержень из чистого монолитного силикагеля, их плюсы заключаются в быстром разделении за счет большой скорости подачи элюента и высокопроницаемости. Или же сорбенты Пинкертоны, специальные сорбенты, для анализа ЛВ без пробоподготовки в различных биологических жидкостях.

Сорбенты на основе силикагеля имеют ряд недостатков, такие как сорбционная активность остаточных силанольных групп и маленький рН диапазон. Вышеперечисленные недостатки отсутствуют у полимерных колонок (стирол-дивинильный гель), они позволяют работать в широком

диапазоне рН, способны выдержать концентрацию буферных солей в области 0,5-1 моль/л.

Существует общий параметр колонки — это массовое отношение общей массы атомов углерода к массе сорбента, наиболее распространенные колонки содержат в себе 10% содержания углерода от сорбента, при скоростном анализе возможно использование 3% колонок. Однако в подвижных фазах с большим содержанием воды не рекомендуется использовать высокое содержание углерода, так как это приводит к разрушению сорбента, за эти следует перекрывание его пор, а также уменьшение гидрофобной поверхности и «слипание» алкилов [42, 43].

Чтобы остаточные силанольные группы не приводили к размытию хроматографических пиков, чистый силикагель модифицируют октадецилсиланом достаточно плотно, чтобы задействовать как можно больше силанольных групп на поверхности сорбента и блокировать группы, не участвующие в модификации, имеют место и дальнейшие улучшения, такие как обработка малыми силанизирующими реагентами, мономерная прививка заместителей к поверхности силикагеля, ввод ПАВ в ПФ [44].

Если ЛВ является высокополярным (производные фенола, витамины), а таких имеется большое множество, то будет наблюдаться слабое удерживание в ОФ варианте с фазой С18. Для основных гидрофильных анализируемых компонентов будут наблюдаться несимметричные пики и ухудшение разделения за счет непрореагированных силанольных групп. Для устранения асимметрии пика используют традиционное эндкепирование (закрытие оставшихся групп короткоцепочными углеводородными цепями), но оно никак не влияет на удерживание.

Существуют некоторые варианты достижения оптимального удерживания полярных веществ в водном элюенте: использование длинных цепочек С27- и С30-фаз [45]; гидрофильное полярное эндкепирование, его цепочки триметоксисиланы и триэтоксисиланы способны удерживать полярные вещества; использование алкильных цепочек с различными

полярными группами, привитыми к силикагелю; использование фаз без эндкепирования с короткими С4 цепочками.

В фармацевтическом анализе чаще всего используют колонки с диаметром в диапазоне 2,1-5 мм, а оптимальная длина 5-25 см. Но наиболее распространены колонки 4,0-4,6 мм, что связано с более оптимальной скоростью анализа и количеством анализируемого соединения, а также расходом элюента.

Если говорить о ПФ, то в качестве разбавителя в ОФ ВЭЖХ используется вода, модификатором является в наибольших случаях низкомолекулярный спирт или ацетонитрил, модифицирующие добавки используют в том случае, когда вещество обладает кислотными или основными свойствами, тогда их вводят в ПФ для качественного разделения и симметричных пиков. Распространены следующие виды добавок:

- органические и минеральные кислоты, идет подавление диссоциации кислых силанольных групп сорбента;

- добавление оснований (диэтиламин или триэтиламин) в кислую среду, улучшение симметрии пика, за счет конкурентной сорбции с молекулами сорбата на свободных силанольных группах сорбента.

- буферные системы закрепляют кислотно-основное равновесие сорбатов.

В заключении можно сказать, что большинство фармацевтических анализов методом ОФ ВЭЖХ делается с помощью следующих параметров [46]: колонка С18 (реже С8), диаметр 4 – 4,6 мм, длина 150/250 мм, размер частиц 5 мкм, УФ детектор, ПФ: вода-метанол/вода-ацетонитрил с добавлением различных модификаторов.

#### 1.4. Ионообменная и ион-парная хроматографии в анализе ЛС

Для анализа ионных веществ используют ИОХ, поверхность адсорбента для такой хроматографии имеет положительный или

отрицательный заряд, то есть содержит заряженные функциональные группы.

В качестве элюента в ионной ВЭЖХ используют водные буферные растворы, которые содержат вытесняющий ион. Этот ион вытесняет с противоположно заряженной поверхности разделяемые ионы и заряжен с ними одноименно. Ионообменную хроматографию широко используют для анализа фенолов, аминсахаров, карбоновых кислот, пуриновых, пиримидиновых и других оснований, входящих в состав смесей ЛВ и аминокислот [47].

Распространенным режимом для анализа ЛВ является и ион – парная хроматография. Смысл ИПХ состоит в том, что путем введения основного или кислотного ион-парного реагента в элюент, мы можем сделать так что удерживание основных или кислотных соединений возрастет. При этом сама ионная пара по сравнению с исходным соединением обладает намного большим удерживанием [48].

Такой режим может существовать как в нормально-фазовой, обращенно-фазовой, так и в хроматографии с переносом заряда, а также гидрофильной хроматографии. Но большинство анализов проводят все-таки в ОФ варианте, остальные виды являются экзотикой.

Именно в ОФ варианте в водных средах ионные пары перестают существовать, ионогенные аналиты становятся ионами, а ион-парный реагент соответственно противоионом. Поверхность адсорбента становится частично заряженной, так как фаза С18 должна хорошо удерживать ион-парный реагент. В результате всего данный механизм становится уже смешанным – обращенно-фазовым и ионообменным.

В качестве ион-парных реагентов в данном методе анализа используют поверхностно-активные вещества, молекулы которых состоят из неполярной части и ионной функциональной группы, в роли неполярного фрагмента чаще всего выступает алкильная цепь.

В анализе ЛВ ИПХ используют для более эффективного и селективного разделения, а также для повышения времени удерживания. Для реализации данного разделения в обращенную-фазу добавляют соли тетраалкиламмония в небольших количествах в нейтральной среде. Чаще всего используют соли с углеводородным радикалом до 12 атомов. Чем выше является концентрация модификатора, более кислотные свойства сорбата и длиннее алкильный радикал, тем сильнее с помощью ПАВ воздействие на удерживание сорбатов. Для разделения органических оснований и алкалоидов используются в кислой среде соли алкилсульфонатов. К примеру, для разделения свободных аминокислот применяют соли перфторкарбоновых кислот. На рисунке 1 приведен пример разделения водорастворимых витаминов методом ион-парной хроматографии.

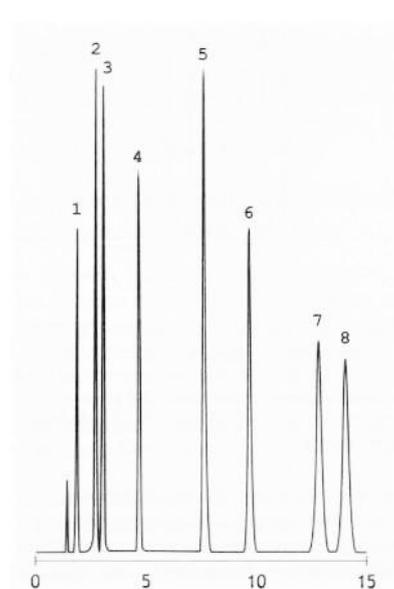


Рисунок 1 – Разделение модельной смеси водорастворимых витаминов. НФ: 150×4.6 WakosilC18 RS, 5мкм. Элюент: ацетонитрил – 5мМ гексилсульфата в 0.1% водной фосфорной кислоте 10:90. 1 – аскорбиновая кислота, 2 – никотиновая кислота, 3 – никотинамид, 4 – пиридоксин, 5 – кофеин, 6 – тиамин, 7 – биотин, 8 – рибофлавин

Но также следует отметить, что в данном методе анализа существуют и недостатки, а именно:

- поверхность сорбента необратимо меняет свои свойства;
- длительное уравнивание колонки;
- плохая воспроизводимость;
- дорогостоящие добавки.

При добавлении ПАВ до критической концентрации мицеллообразования метод анализа переходит в мицеллярный режим, данный режим способствует снижению удерживания ионогенных веществ в колонке и уменьшению по этим веществам емкости сорбента. Значительно изменяют хроматографическое поведение и неионогенные соединения [49, 50].

Следует сказать, что подвижная фаза в мицеллярном режиме имеет достаточно много достоинств: становится менее дорогостоящим анализ, оказывает малое влияние на окружающую среду и маленькая токсичность; возможен анализ компонентов из смеси с достаточно различными полярными свойствами; решение проблем разделения веществ из-за конкуренции нескольких механизмов разделения; возможность ввода сложных матриц без риска повреждения колонки; прогнозирование удерживания и поведения аналитов. На рисунке 2 представлена хроматограмма водорастворимых витаминов в мицеллярном режиме.

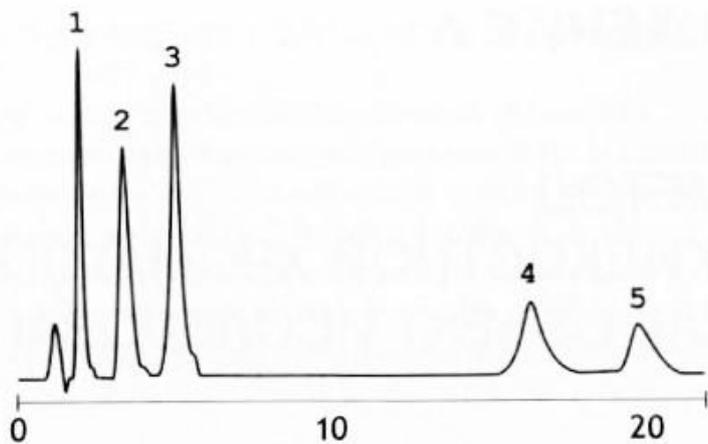


Рисунок 2 – Хроматограмма водорастворимых витаминов в режиме мицеллярной хроматографии. НФ: 150×4 HypersilODS. Элюент: 4% 1-

пентанола в 0.1 М растворе додецилсульфата натрия, рН 3. 1 – рибофлавин, 2 – никотинамид, 3 – пиридоксин, 4 – пиридоксамин, 5 – тиамин

Недостатками мицеллярной ВЭЖХ являются сложность подбора условий для разделения и удерживания сорбатов, а также снижение эффективности колонки. В фармацевтическом анализе данный режим описан для определения кофеина в сложных лекарственных формах [51], тетракаина и прокаина в плазме [52], трициклических антидепрессантов в смесях и различных ЛФ [53], триметоприма и сульфаметоксазола в присутствии в одной лекарственной формы совместно [54].

### 1.5. Гидрофильная хроматография

Интересно отметить, что в последнее время пользуется популярностью так называемая гидрофильная хроматография (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC), данный термин ввел в обращение Эндрю Алперт в 1990 году, он занимался очисткой биологических полимеров и хроматографическим разделением. Однако данный метод применялся и ранее без названия или под иными терминами. По сути, описанный метод хроматографии является нормально-фазовым и используется для разделения водорастворимых и высокополярных соединений, таких как различные ЛВ, бетаины, полипептиды, аминокислоты, органические кислоты, сахара и гликозиды [55-60]. На обычных неполярных фазах гидрофильные вещества дают слабое удерживание. Чтобы получить эффективное разделение и повысить время удерживания часто используют ИПХ, но ион-парные органические модификаторы нарушают работу масс-спектрометрического детектора [61], тогда на помощь может прийти гидрофильная хроматография.

В процессе освоения гидрофильной хроматографии, выяснилось, что она полезна и как самостоятельный метод. Тем не менее закономерности данного вида хроматографии остаются до сих пор до конца не исследованными. Механизм удерживания во многих случаях до конца не

ясен (смешанный – ОФХ, НФХ, ИОХ). Далее на рисунке 3 сопоставлены две хроматограммы одних и тех же ЛС в ОФ и гидрофильном режимах. Следует отметить, что соединение под номером 1, которое содержит две гидроксильные группы, пострадало, ввиду помех, которые часто наблюдаются при вводе пробы в ион-парном режиме хроматографии.

В качестве элюента в гидрофильной хроматографии используют ацетонитрил, а полярной добавкой служит вода или буферный раствор [62]. Вода также служит и модификатором, так как с ее помощью образуется полимолекулярный адсорбционный слой на полярном адсорбенте.

В роли НФ используют аминофазу, силикагель и другие полярные (амидные, цвиттер-ионные) фазы. Чем больше доля полярной добавки (воды), тем меньше становится время удерживания.

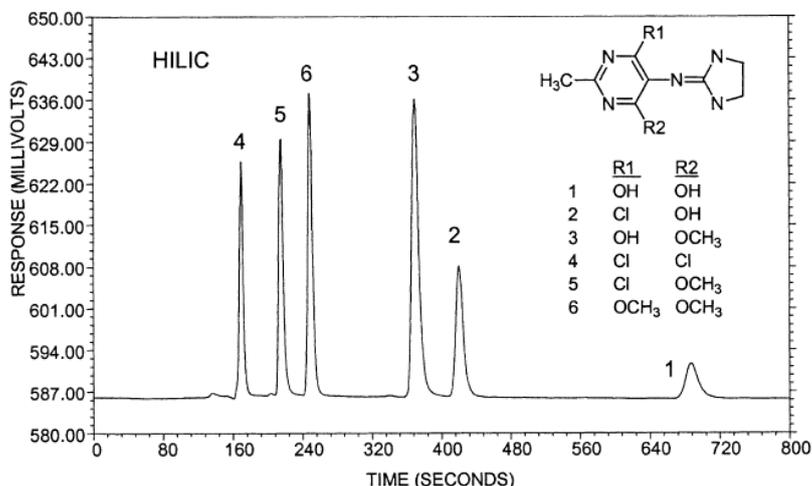
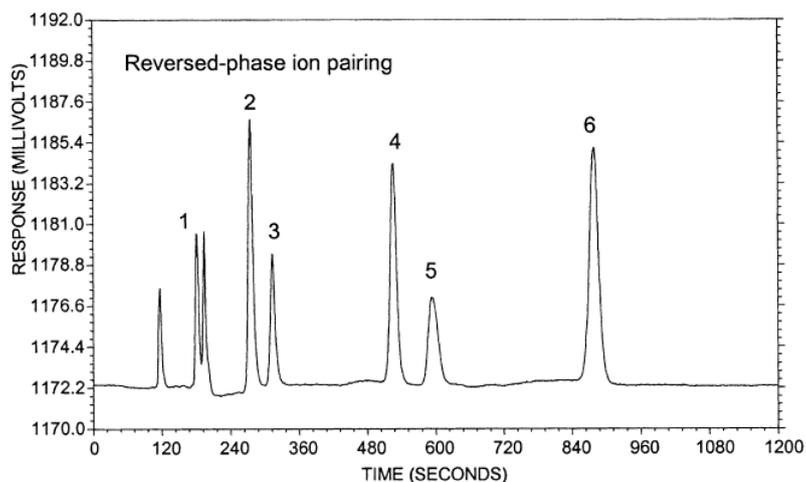


Рисунок 3 – Сравнение анализа полярных ЛС с использованием 1) ОФ ион-парного механизма (LiChrospher RP-Select B) и 2) гидрофильного механизма (ZorbaxNH<sub>2</sub>). Нумерация соединений одинакова для обоих хроматограмм

Гидрофильный режим может приобрести новые отличительные черты если в водной части элюента увеличить концентрацию неорганической соли, чаще всего используют дигидрофосфат калия. Данный вариант хроматографии был назван ДИРФ режимом, то есть режимом динамически индуцированного раздела фаз.

В водной фазе возможно существование такой критической концентрации, выше которой данная водная фаза перестает смешиваться с ацетонитрилом. С повышением ацетонитрильной доли в смеси происходит уменьшение концентрации соли, которой достаточно для расслоения смеси на две фазы: водно-солевой раствор и ацетонитрил (рисунок 4).

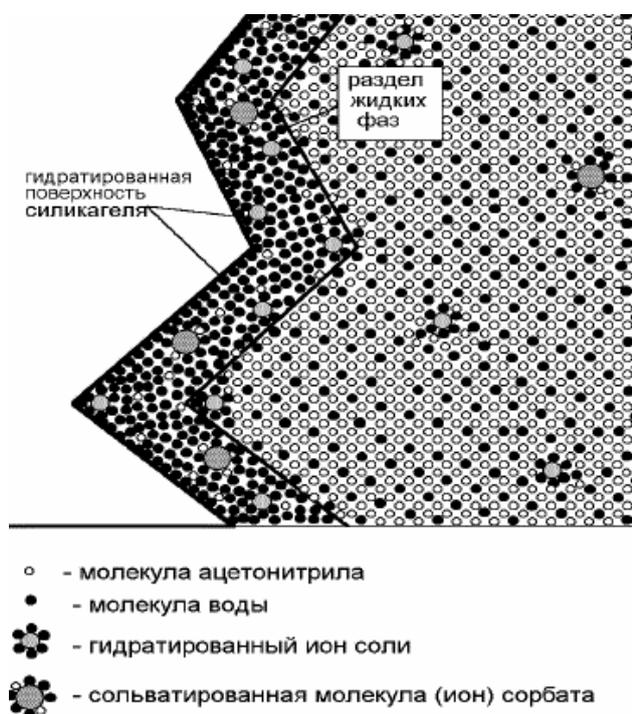


Рисунок 4 – Упрощенная схема формирования раздела фаз на поверхности силикагеля

В таблице 3 представлены зависимости критической концентрации от доли ацетонитрила для дигидрофосфата калия.

Отличительной чертой этого режима является большой объем НФ, такой вариант отлично подходит, к примеру, для препаративного выделения пептидов и белков. А также можно сказать и о чувствительности времени удерживания к изменению концентрации ацетонитрила в элюенте. Было замечено, что в отдельных соединениях факторы удерживания изменялись в несколько раз при изменении доли ацетонитрила на несколько процентов. Данный скачок можно охарактеризовать переходом системы из гомогенного в гетерогенный режим или наоборот, следует тщательно контролировать температуру, так как данный процесс от нее сильно зависит. Возможно такие нюансы могут создать определенные технические проблемы, но они вполне преодолимы при аккуратном выполнении работы.

Таблица 3 – Критическое содержание ацетонитрила в элюенте, приводящее к гетеронизации, в зависимости от концентрации дигидрофосфата калия при 20°C

Концентрация $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , М	Доля ацетонитрила, об. %
0.01	95.8
0.05	84.3
0.10	75.4
0.20	66.0
0.25	58.7
0.30	53.1
0.50	40.0
0.70	35.7

Следует так же отметить, что спирты не подходят для основы элюента в хроматографическом режиме динамического индуцирования фаз, так как

они в солевых растворах ведут себя совершенно иначе чем ацетонитрил. При добавлении концентрированного водного раствора соли ее избыток выпадает в осадок и остается только жидкая водно-метанольная-солевая фаза. Но если добавить метанола примерно 3-7 % от доли ацетонитрила, то можно улучшить хроматографическое разделение и «смягчить» зависимость удерживания аналитов от концентрации ацетонитрила.

#### 1.6. Влияние pH ПФ на хроматографическое поведение ЛВ

Величина pH элюента играет важную роль в удерживание анализируемых веществ, эффективном и селективном разделении сложных лекарственных форм и воспроизводимости полученных результатов. Для оптимальных условий разделения нужно оценить хроматографическое поведение ЛП с учетом активности незащищенных силанолов неподвижной фазы в зависимости от изменяемости интервала pH ПФ, для большинства сорбентов находящегося в диапазоне 2-7,5. По кислотно – основным свойствам подразделяют на ЛВ, имеющие:

- слабоосновные свойства ( $pK < 7$ ), примеры: 4-аминофенол и кофеин;
- средние основные свойства ( $pK > 7$ ), примеры: тетракаин и левокаин;
- сильноосновные свойства ( $pK > 9$ ), примеры: хлоргексидин и фенилэфрин;
- слабые кислые свойства ( $pK > 4$ ), примеры: парацетамол и аскарбиновая кислота;
- средние кислые свойства ( $pK > 2$ ), примеры: салициловая и ацетилсалициловая кислота.

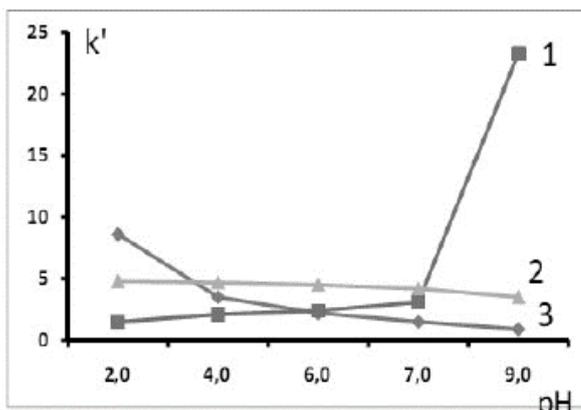


Рисунок 5 - Зависимость фактора удерживания тетракаина (1), пропилпарабена (2), салициловой кислоты (3) от pH ПФ. XTerra RP18. Элюенты А: 0.02М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; Б: ацетонитрил, А/Б = 72/28 (об.,%). 40°С

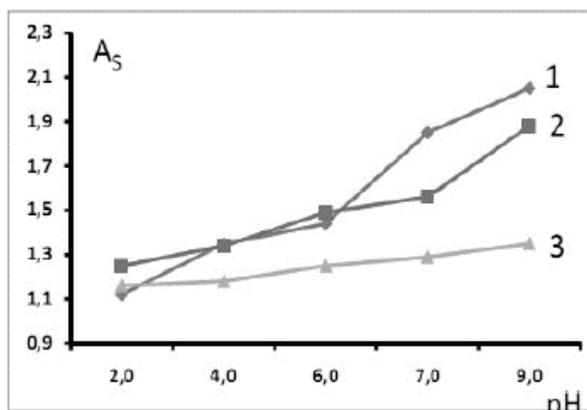
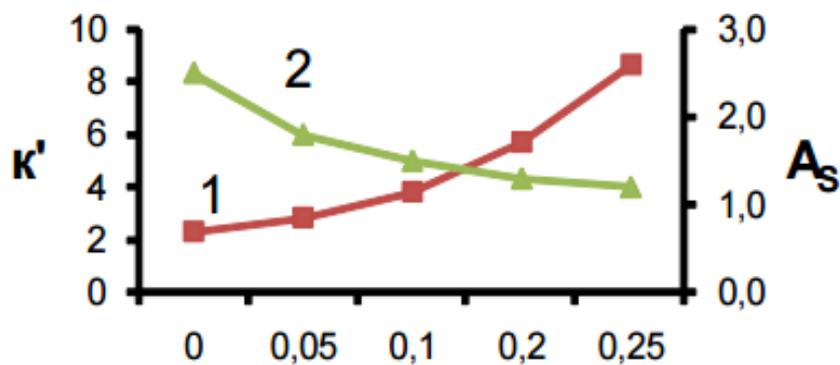


Рисунок 6 - Зависимость коэффициента асимметрии пика салициловой кислоты (1), тетракаина (2), пропилпарабена (3) от pH ПФ. Условия — см. на рис. 6

Именно полярные ионизированные группы приводят к меньшему удерживанию. Данные группы могут взаимодействовать с незащищенными силанолами сорбента, изменяя воспроизводимость и форму пика. На рисунках 5 и 6 показано хроматографическое поведение ЛВ с основными и кислыми свойствами.

Наилучшими значениями pH ПФ для анализа ЛП являются значения от 2 до 3, при этом учитывается рабочий диапазон колонки, рК оснований и кислот, свойства активных силанолов сорбента. Для создания среды этих значений используется раствор фосфатного буфера и фосфорной кислоты, с его помощью удалось получить разделение аналитов с оптимальной селективностью. В случае неудовлетворительного разделения веществ с третичным атомом азота можно изменить селективность разделения при использовании трифторуксусной кислоты. От концентрации модификатора зависят коэффициенты асимметрии пиков и емкости, данная зависимость представлена на рисунке 7.



Содержание CF<sub>3</sub>COOH в ПФ, %

Рисунок 7 – Зависимость коэффициента емкости (1) и асимметрии пика (2) хлорфенирамина от концентрации модификатора трифторуксусной кислоты в ПФ 0.2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – ацетонитрил 95 :5 (об. %), колонка SymmetryC18, 40°C

На примере лекарственной формы антигриппина показан унифицируемый хроматографический анализ действующих, вспомогательных компонентов и нормируемых примесей. На рисунке 8 приведен хроматографический анализ антигриппина с подобранными для него условиями анализа.

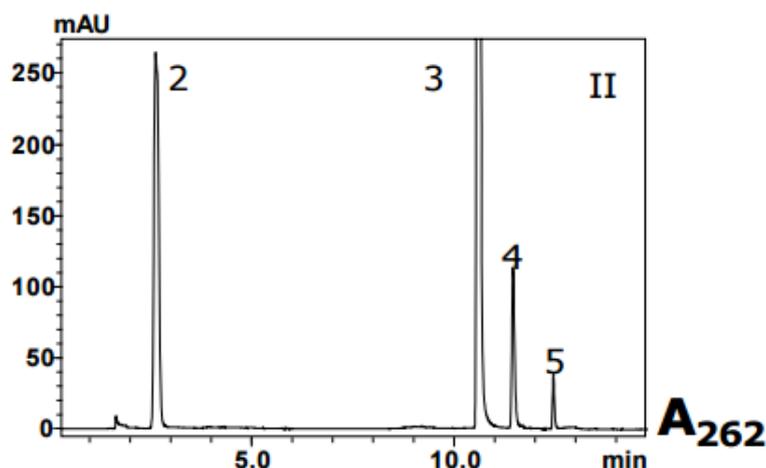


Рисунок 8 – Хроматографический анализ антигриппина (мкг/мл): аскорбиновая кислота – 2, парацетамол – 3, сахаринат натрия – 4, хлорфенирамин малеат – 5, λ = 262 нм, ПФ: А – 0.05% CF<sub>3</sub>COOH; Б – ацетонитрил, 0.2% Б 3 мин, градиент Б 0,2 → 55 за 10 мин, 55% Б 2 мин. Symmetry C18. 30°C

В случае 4-аминофенола не произошло приемлемое разделение, его количественный анализ осложнился малым содержанием и фоном матрицы.

В таблице 4 приведены показатели пригодности данного хроматографического анализа, а в таблице 5 представлена проверка возможности определения на готовых ЛП.

Таблица 4 – Оценка пригодности хроматографической системы (n = 9)

Определяемое соединение	Время удерживания, мин	Симметрия пика	Число теоретических тарелок	Разрешение	RSD, % $t_{уд}$ пика	RSD, % $S$ пика
4-Аминофенол	2.28	1.42	2300	-	0.18	0.31
Аскорбиновая кислота	2.81	1.21	6902	2.62	0.17	0.58
Парацетамол	10.58	1.16	183119	55	0.21	0.26

Продолжение таблицы 4.

Хлорфенирамина малеат	12.35	1.14	299971	8.8	0.25	0.41
Критерий приемлемости		0.8-2.0	2000	не менее 1.5	не более 2	не более 2

Таблица 5 – Результаты анализа антигриппина (таблетка) (n = 5, P = 0.95)

Компоненты	Норма по НД, мг	$X_{cp}$	S	$S_x$	$\Delta X_{cp}$	$\epsilon_{cp}$ , %
Парацетамол	237.5-262.5	248.3	1.92	0.86	2.38	0.96
Хлорфенирамина малеат	2.7-3.3	3.06	0.052	0.023	0.0646	2.11
Аскорбиновая кислота	46.25-53.75	48.86	1.42	0.64	1.77	3.61
Сахаринат натрия	30	29.21	0.89	0.40	1.11	3.7
4-Аминофенол	не более 0.25	$6 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-5}$	$4.9 \cdot 10^{-5}$	8.28

Для анализа поливитаминов используют такие хроматографические условия, как введение ион-парных реагентов (алкилсульфонаты с алкильными цепями C6-C8) в кислую среду ПФ. Не смотря на то, что данный метод имеет повышенную эффективность разделения и улучшает форму пика, имеется и ряд недостатков: дорогостоящая, усложненная подготовка элюента, долгое уравнивание колонки, сложность при использовании градиентного режима элюирования, а так же необратимая сорбция

модификатора за счет введения ион-парного реагента.

Большое количество витаминов являются полярными, на их разделение и удерживание сильно влияет среда ПФ и вид сорбента. Меняя значение рН в интервале от 4,0 до 6,9 в ПФ за счет фосфатного буфера, было проведено исследование по хроматографическому разделению витаминов С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР, В<sub>5</sub>, В<sub>2</sub> на колонке «Symmetry С18». Лишь при рН=6,7 произошло приемлемое разделение всей группы витаминов, но пик тиамина при этом имеет нестабильное время удерживания и не обладает достаточной симметрией, Чтобы решить эту проблему в ПФ был добавлен 0, 001 М ДДС в нейтральной среде. При дальнейшем изучении разделения витаминов, было замечено, что добавление модификаторов диэтиламина и триэтиламина в нейтральной среде в больших количествах подобно действию ион-парного реагента. Основываясь на этом, был предложен элюент с относительно большими концентрациями данных модификаторов в нейтральной среде ПФ. В результате была улучшена симметрия пика тиамина и воспроизводимость его времен удерживания. В таблице 6 представлены анализы 10 гидрофильных витаминов в различных ЛП по подобранным условиям.

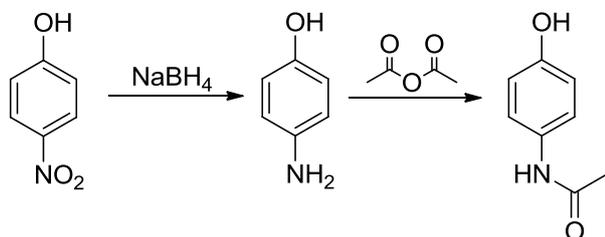
Таблица 6 – Характеристики методики анализа водорастворимых витаминов в нейтральной ПФ на основе алкиламинов

Вита-мин	Оптимальная $\lambda$ , нм	Диапазон, мкг/мл	Наклон	b	$r^2$
С	300	150-500	5261	1653	0.9978
В <sub>5</sub>	206	5-50	12608	1911	0.9994
В <sub>6</sub>	324	5-100	53085	2032	0.9994
В <sub>1</sub>	267	5-100	29581	1057	0.9992
В <sub>2</sub>	445	5-100	45803	1412	0.9997
РР	262	25-250	33258	1921	0.9993
Р	362	10-150	31300	1749	0.9998

### 1.7. Определение 4-аминофенола в ЛП

В настоящее время существует огромное количество ЛП от простуды и гриппа, все они являются многокомпонентными. Наиболее частым компонентом в таких ЛП является парацетамол, он является хорошим анальгетиком и жаропонижающим средством и имеет широкое применение в медицине. В свою очередь именно из 4-аминофенола (АФ) происходит химико-фармацевтический синтез парацетамола, при взаимодействии его с уксусным ангидридом (схема 1).

Схема 1



Из-за высокой гепато-, гено- и нефротоксичности АФ, его содержание в ЛП строго нормируется, предельное допустимое содержание в парацетамоле составляет 0,005%. Основные физико-химические свойства АФ представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Основные физико-химические свойства 4-аминофенола

Физико-химические свойства	
Внешний вид	бесцветные листовидные кристаллы
Брутто-формула	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO
Молекулярная масса (в а.е.м.)	109.14
Температура плавления (в °С)	184
Температура разложения (в °С)	184
Показатели диссоциации	pK <sub>ВН</sub> <sup>+</sup> (1) = 5.48 (25°С, вода) pK <sub>а</sub> (1) = 10.3 (25°С, вода)

Продолжение таблицы 7.

ЛД <sub>50</sub> , в мг/кг	375 (крысы, перорально) 420 (мыши, перорально)
Дополнительная информация	На воздухе окисляется, окрашиваясь в темно-коричневый цвет. В кислой среде окисляется азотистой кислотой до хинона
Растворимость (в г/100г растворителя или характеристика)	вода: 1.1 (0°C) вода: 1.283 (10°C) вода: 1.575 (20°C) вода: 1.865 (30°C) вода: 2.248 (40°C) вода: 3.475 (60°C) вода: 7.322 (80°C) вода: 27.01 (100°C) диэтиловый эфир: трудно растворим этанол: 5.7 (0°C)

Среди методов определения АФ преобладают методы хроматографии, а также спектрофотометрические и электрохимические. Также это возможно и с помощью титриметрических методов. Некоторые методы просто недостаточно чувствительны для обнаружения АФ на фоне парацетамола или высокочувствительны, но достаточно технически сложные.

Рассмотрим анализ АФ с помощью метода хроматографии. Как уже говорилось ранее, ввиду относительно малых концентраций данного соединения, а также ввиду сложности фоновой матрицы, определение АФ является весьма затруднительной задачей. Кроме того, АФ является гидрофильным веществом и почти не удерживается в традиционном ОФ режиме на C18.

Доктор химических наук С. Ю. Гармонов в своей статье предложил анализ АФ в парацетамоле методом ОФ ВЭЖХ с введением ион-парного реагента[66]. Пробоподготовка заключалась в растворении анализируемого вещества в 0,05%-ном растворе трифторуксусной кислоты, так как АФ в кислой среде является более стабильным, обработка ультразвуком и фильтрование пробы.

Для улучшения формы хроматографического пика и более эффективного разделения был введен ион парный реагент, в данном случае использовался додецилсульфат натрия. С. Ю. Гармонов показал возможность количественного определения трудноудерживаемой примеси АФ в присутствии аскорбиновой кислоты одновременно с количественным анализом основных веществ в ЛП.

В таблице 8 представлены аналитические характеристики методики, хороший результат разделения компонентов отражается и в разрешающей способности.

Таблица 8 – Аналитические характеристики анализа 4-аминофенола методом ОФ ВЭЖХ

Длина волн, нм	Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл	Наклон градуировочной зависимости	В	Коэффициент корреляции	Предел детектирования, мкг/мл	Предел обнаружения, мкг/мл
272	0.1-5	18089	630	0.9999	0.093	0.306
$E_{\text{возб}}=260$ $E_{\text{эмис}}=340$	0.1-2	319376	1003	0.9999	0.012	0.040

Оценка специфичности методики давалась по доказательству отсутствия влияния действующих компонентов и вспомогательных веществ на аналитическое определение, а также по совпадению времен удерживания анализируемых веществ со стандартными образцами. В таблице 9 показаны

результаты правильности определений, которые оценивались добавкой стандарта АФ в ЛП. Экспериментальное подтверждение возможности определения АФ в готовых лекарственных формах представлено в таблице 10.

Предложенная данным автором методика количественного анализа АФ в присутствии действующих веществ на основе парацетамола обеспечивает получение воспроизводимых и достоверных результатов.

Таблица 9 – Оценка правильности определений 4-аминофенола

Компонент (анализируемая матрица)	Содержание компонента, моль/л	Введено 4-аминофенола, мкг/мл	Найдено 4-аминофенола, мкг/мл	S <sub>r</sub>
Парацетамол	$0.50 \cdot 10^{-5}$	0.545	0.540±0.020	0.03
	$1.00 \cdot 10^{-4}$	1.090	1.150±0.069	0.05
	$2.50 \cdot 10^{-3}$	2.725	2.77±0.16	0.05
Аскорбиновая кислота	$5 \cdot 10^{-5}$	1.09	1.053±0.045	0.03
Ацетилсалициловая кислота	$5 \cdot 10^{-5}$	1.09	1.093±0.046	0.02
Фенол	$5 \cdot 10^{-5}$	1.09	1.062±0.040	0.03
Терафлю (порошок)	-	2.47	2.35±0.15	0.04
Антигриппин (таблетки)	-	1.20	1.19±0.03	0.04
Цитрамон (таблетки)	-	0.55	0.55±0.020	0.03

Таблица 10 – Результаты количественного определения 4-аминофенола в готовых лекарственных препаратах (n = 5, P = 0.95)

Лекарственная форма	Найдено $\times 10^{-3}$ , %
---------------------	------------------------------

Парацетамол	3.9±0.2
-------------	---------

Продолжение таблицы 10.

Панадол	2.6±0.1
Эффералган	1.30±0.08
Цитрамон П	2.1±0.1
Антигриппин	0.6±0.03
Колдрекс	0.8±0.03

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Реагенты, оборудование и объекты исследования

#### Оборудование:

1. Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы Agilent Technologies 1220
2. Хроматографический шприц Agilent 1220
3. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм), произведена в Agilent
4. Колонка хроматографическая ZORBAX NH<sub>2</sub> (4.6×150мм), произведена в Agilent
5. Колонка хроматографическая ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм), произведена в Agilent
6. Ультразвуковая ванна «Сапфир»
7. Аналитические весы
8. Ионномер лабораторный И-160М

#### Реагенты:

1. Ацетонитрил для ВЭЖХ, марки Macron Fine Chemicals
2. Дистиллированная вода
3. 0,05 % трифторуксусная кислота
4. 4-аминофенол, аналитический стандарт
5. Дигидрофосфат калия, ч.
6. Фосфорная кислота, х.ч.
7. Нитрит натрия, ч.д.а.
8. Фиксанал: калий фосфорнокислый однозамещенный 0,025 М и натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,025 М

#### Объекты исследования:

1. ЛФ «ТераФлю» в виде порошка, производитель Фамар Орлеан (Франция)
2. ЛФ «РИНЗАсип» в виде порошка, производитель Unique Pharmaceutical

Laboratories (Индия)

3. ЛФ «Колдрекс хотрем» в виде порошка, производитель SmithKline Beecham Consumer Healthcare (Испания)

4. ЛФ «Парацетамол Renewal» в виде таблеток, производитель фармацевтическая компания Обновление (Россия, г. Новосибирск)

## 2.2. Методики экспериментов

### 2.2.1. Хроматографический метод

Хроматографический анализ 4-аминофенола и содержащих его ЛВ на основе парацетамола выполнялся на жидкостном хроматографе AgilentTechnologies 1220 с УФ-спектрофотометрическим детектором в изократическом режиме. Анализы проводились в следующих условиях: скорость потока – 0,6 мл/мин, аналитическая длина волны 272 нм, объем вводимой пробы 20мкл.

Для пробоподготовки ЛФ брали точные навески с помощью аналитических весов и разбавляли дистиллированной водой (в случае с ЛФ «Колдрекс хотрем» для количественного извлечения разбавляли 0,05%-ным раствором трифторуксусной кислоты) до нужной метки, энергично встряхивали, после этого обрабатывали ультразвуком 5 мин.

Для доказательства, что ОФ режим является достаточно проблематичным для анализа ЛВ на основе парацетамола, прокалывали нитрит натрия, аналитический стандарт 4-аминофенола и ЛФ «Парацетамол Renewal» на колонке ZORBAXEclipsePlusC18 (4.6×100мм), в качестве элюента использовали чистый ацетонитрил марки MacronFineChemicals с дистиллированной водой в соотношении 8:2, предварительно его дегазировав в ультразвуковой ванне «Сапфир». Рассчитывали индексы удерживания.

Далее выбирали условия для анализа исследуемых соединений в гидрофильном режиме на примере нормируемой примеси 4-аминофенола. Для этого прокалывали 4-аминофенол на колонках ZORBAXNH<sub>2</sub> (4.6×150мм)

и ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм), в качестве элюента использовали ацетонитрил-воду 8:2, смотрели времена удерживания и симметричность пиков. После подбора колонки искали оптимальный состав элюента в виде ацетонитрила и воды, для этого готовили элюенты ацетонитрил-вода в соотношении 8:2, 7:3 и 1:1, обработав ультразвуком каждый по 10 минут. В следующем этапе мы исследовали влияниерН ПФ на удерживание и форму пика, для чего готовили 0,05 М раствор дигидрофосфата калия и фиксанал калий фосфорнокислый однозамещенный 0,025 М и натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,025 М. Подкисляли фосфорной кислотой данные растворы до следующих рН: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, измеряя рН на лабораторном иономере И-160М. Приготовленные буферные растворы использовали в качестве замены воды в элюенте в соотношении ацетонитрил-буфер 8:2, поочередно прокалывали 4-аминофенол с каждым буферным раствором, анализируя времена удерживания и формы пиков.

После завершения подбора условий прокалывали ЛФ «Парацетамол Renewal», «РИНЗАсип», «Колдрекс хотрем» и «ТераФлю» на колонке ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм), в качестве элюента использовали ацетонитрил-буфер в соотношении 8:2, предварительно продегазировав. С помощью метода добавок проводили идентификацию пика 4-аминофенола.

### 2.2.2. Метод количественного измерения

Массу определяемых веществ находили с помощью метода абсолютной калибровки, для этого прокалывали стандартные смеси 4-аминофенола и строили градуировочный график. После чего по методу наименьшего квадрата находили уравнение, в которое подставляли площади пиков 4-аминофенола в ЛФ и определяли его количество, а также его процентное содержание в навеске, которую мы взвешивали.

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 3.1. Подбор хроматографических условий

В настоящее время жидкостная хроматография является одним из мощнейших методов фармацевтического анализа. ВЭЖХ активно используют для определения основных показателей качества ЛВ: определение действующего вещества, подлинность, растворение, содержание примесей, однородность дозирования. Данный метод хроматографии широко применяют в процессе поиска новых ЛП, а также при разработке производственного контроля ЛВ.

Самым популярным методом анализа является ОФ ВЭЖХ, на его долю приходится до 90 % всех определений ЛВ, но не всегда вышесказанный хроматографический метод является актуальным, так как высокополярные, гидрофильные ЛВ слабо удерживаются на обычных неполярных фазах. В качестве решения этой проблемы в этих случаях используют ион-парную хроматографию, она обеспечивает эффективное разделение и повышает время удерживания аналита. Однако при введении ион-парного реагента в рассматриваемом методе появляются существенные недостатки, а именно долгое уравнивание колонки, нарушение работы масс-спектрометрического детектора, поверхность сорбента необратимо меняет свои свойства. Ввиду этого в настоящее время ведутся поиски альтернативных методов анализа ЛВ. Одним из таких методов является гидрофильная хроматография.

В последнее время именно гидрофильная хроматография начала набирать популярность, тем не менее публикаций по поводу анализа данным методом пока достаточно мало. В связи с этим мы решили оценить возможности гидрофильного режима хроматографии в анализе некоторых фармацевтических препаратов.

Основной задачей моей работы является подбор хроматографических условий гидрофильного режима для анализа ЛВ, содержащих нормируемую

примесь 4-аминофенола, на основе парацетамола.

1) Для того, чтобы убедиться в том, что ОФ для анализа нашего соединения является достаточно проблематичным, был найден фактор удерживания ( $k$ ), в качестве несорбируемого вещества использовали нитрит натрия. По экспериментальным данным  $k = 0.11$ , такая величина фактора удерживания не рекомендуется для анализа в связи с низкими избирательностью и селективностью в анализе сложных фармацевтических препаратов. На рисунке 9 можно увидеть доказательство того, что в ОФ режиме исследуемое нами соединение выходит намного быстрее, это означает, что 4-аминофенол практически не сорбируется в данном варианте хроматографии.

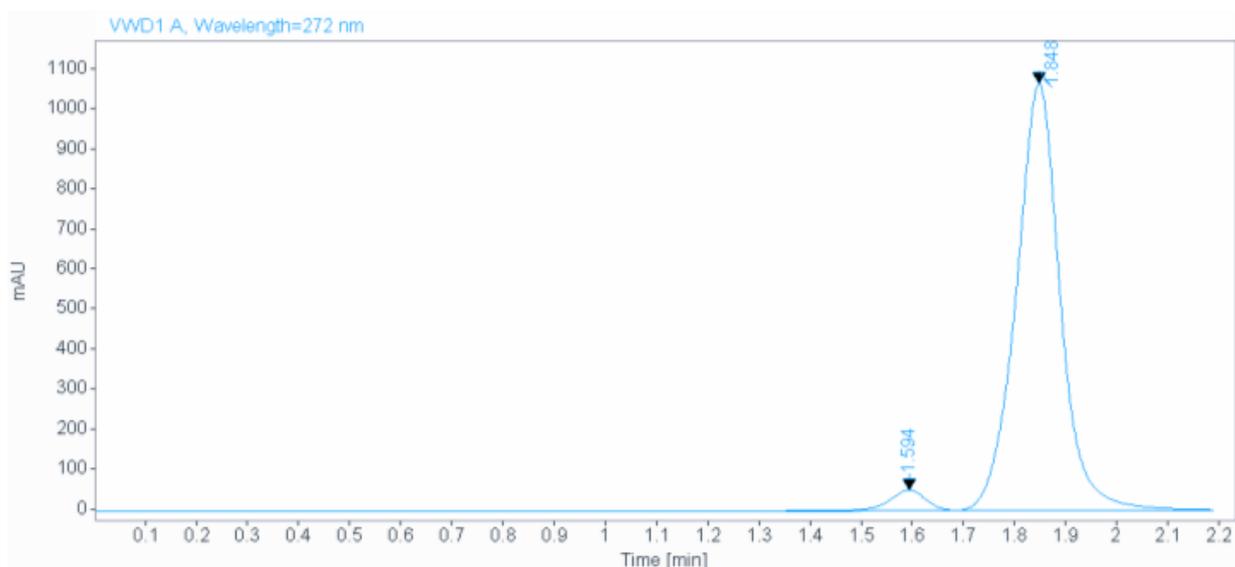


Рисунок 9 – ОФ вариант анализа 4-аминофенола.

НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). Элюент: ацетонитрил-вода 8:2,

СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

2) Подбор хроматографической колонки. Анализ 4-аминофенола проводился на колонках RX-SiLi NH<sub>2</sub>. НФ с силикагелем оказалась более оптимальным вариантом, хроматографический пик анализируемого соединения более симметричен (рисунок 10).

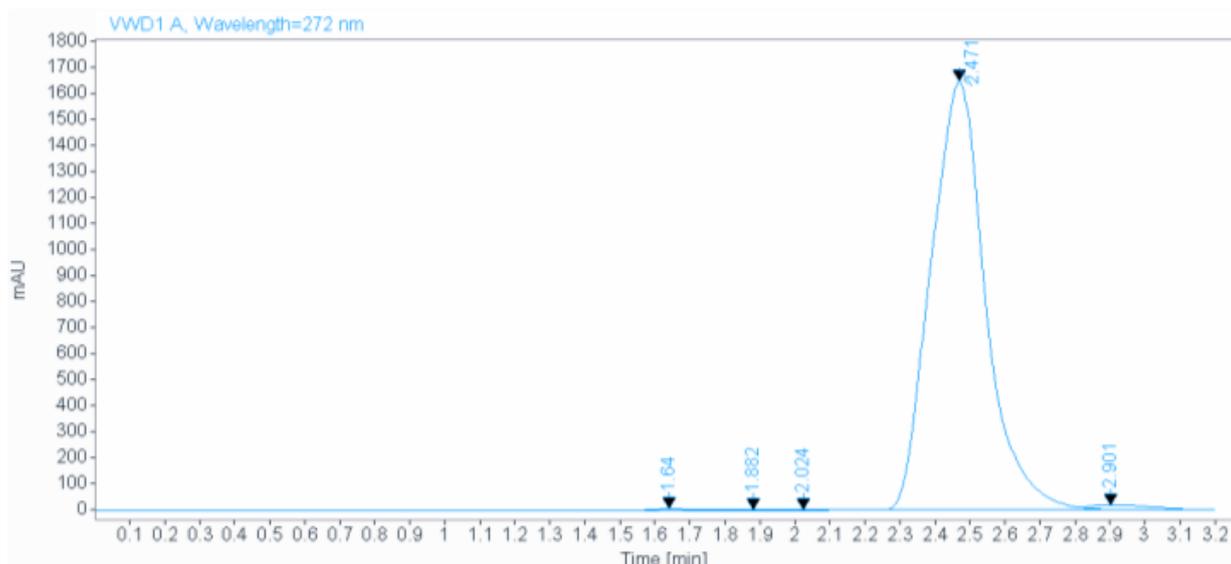


Рисунок 10 – Анализ 4-аминофенола. НФ: ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм).

Элюент: ацетонитрил-вода 8:2, СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

3) Подбор состава элюента. В данном пункте осуществлялся подбор соотношения ацетонитрила и разбавителя, в связи с этим 4-аминофенол анализировали с элюентами ацетонитрил-вода в соотношениях 8:2, 7:3 и 1:1. Наилучшим вариантом оказался элюент ацетонитрил-вода 8:2, остальные результаты показали более ассиметричные пики.

4) Исследование влияния рНПФ на время удерживания и симметрию пика. Подбор среды осуществлялся с помощью добавления в элюент буферных растворов с рН: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 и 4.5. В кислой среде (рН=2.5, 3.0) достигаются более высокие симметрии пиков (рисунок 11). Эксперимент выявил, что исследуемые среды элюента не влияют на время удерживания вещества. Однако, если не использовать буферный раствор и проводить анализ в элюенте ацетонитрил-вода, то результаты симметрии пиков аналогично достаточно хорошие, что позволяет нам использовать данный элюент в эксперименте в связи с его преимуществом в виде более экспрессной подготовки элюента.

5) После подбора оптимальных условий для анализа, рассматриваемого нами 4-аминофенола мы провели разделение ЛВ,

содержащих его нормируемую примесь. На рисунках 12-15 представлены хроматограммы разделения ЛФ на основе парацетамола.

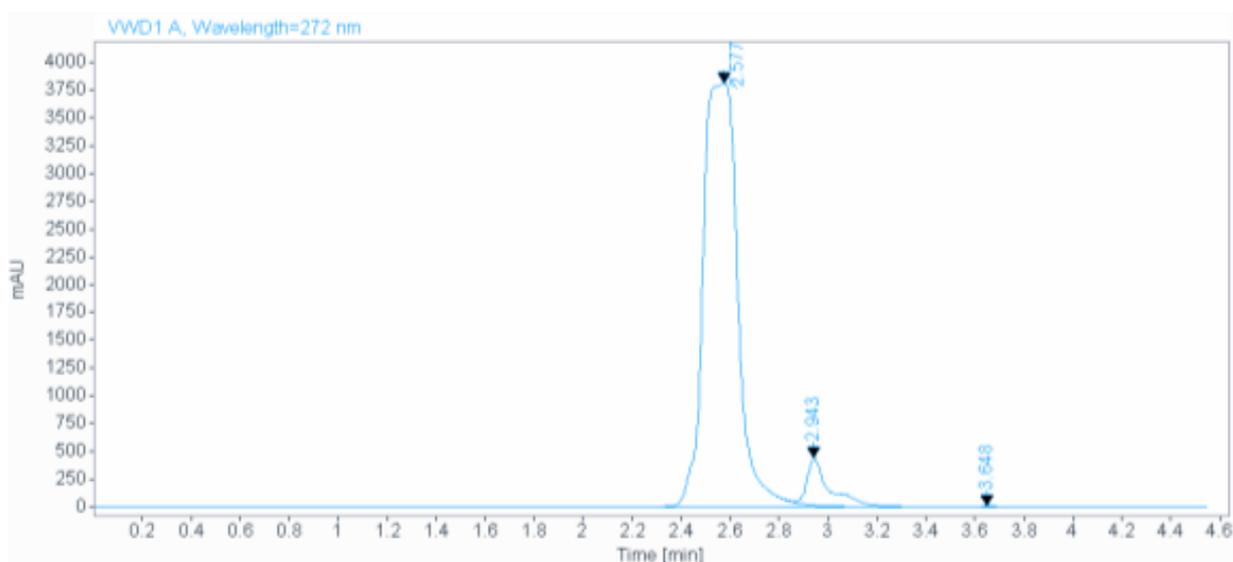


Рисунок 11 – Подбор среды ПФ для 4-аминофенола. ПФ: ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм). НФ: элюентА ацетонитрил, элюентБ 0,05 МКН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, А/Б=80/20. СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

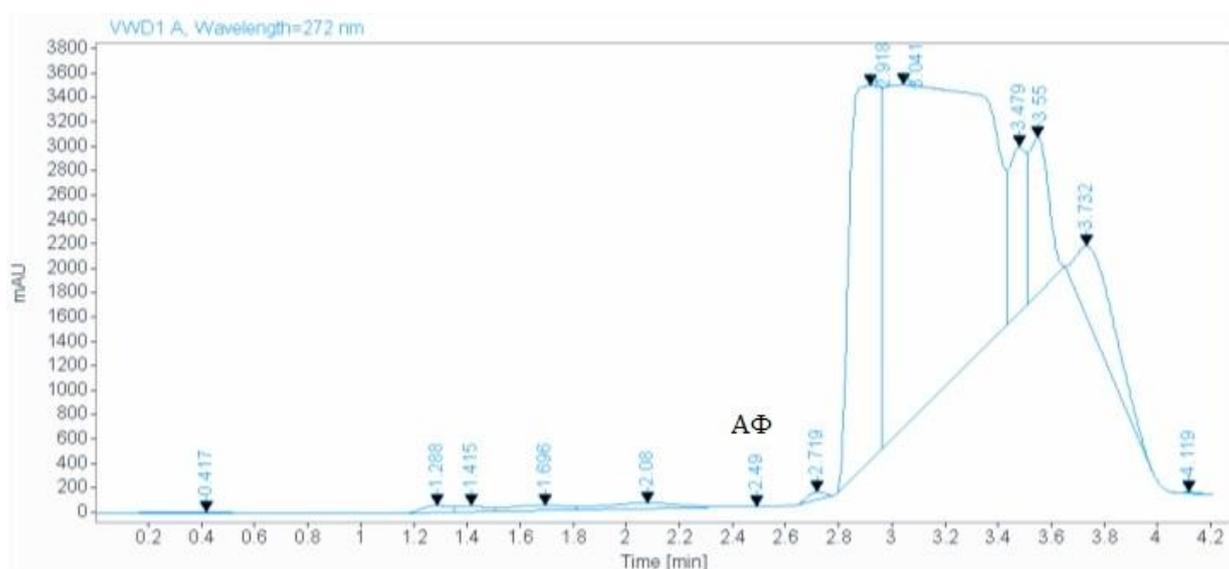


Рисунок 12–Анализ ЛФ «Колдрекс хотрем» в виде порошка. НФ: ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм). Элюент: ацетонитрил-вода 8:2, СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

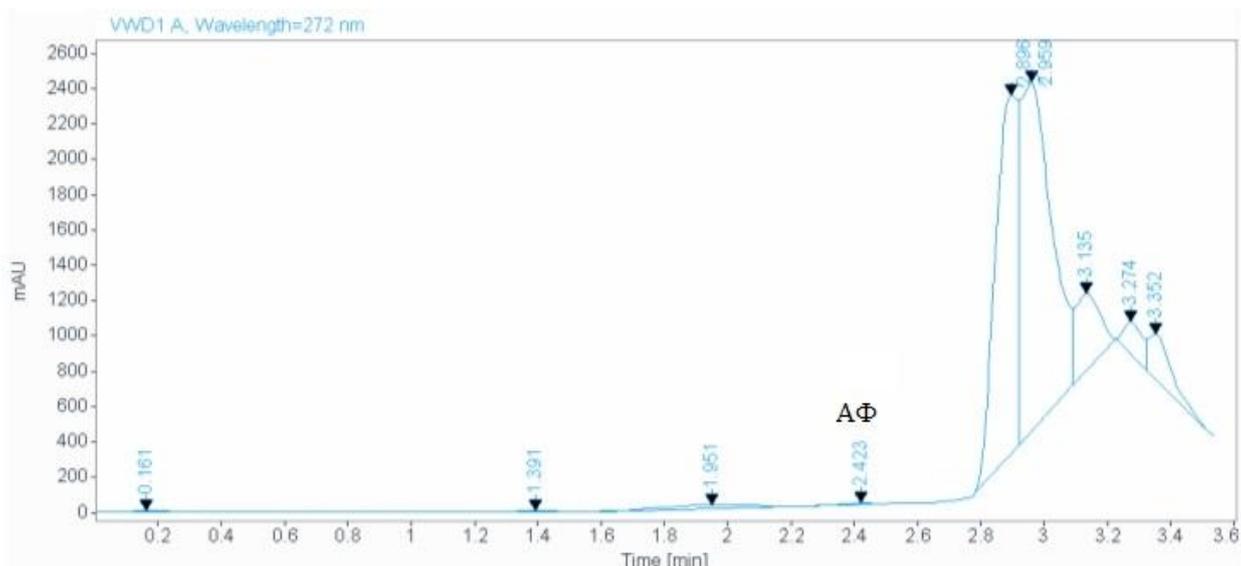


Рисунок 13 – Анализ ЛФ «Ринзасип» в виде порошка. НФ: ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм). Элюент: ацетонитрил-вода 8:2, СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

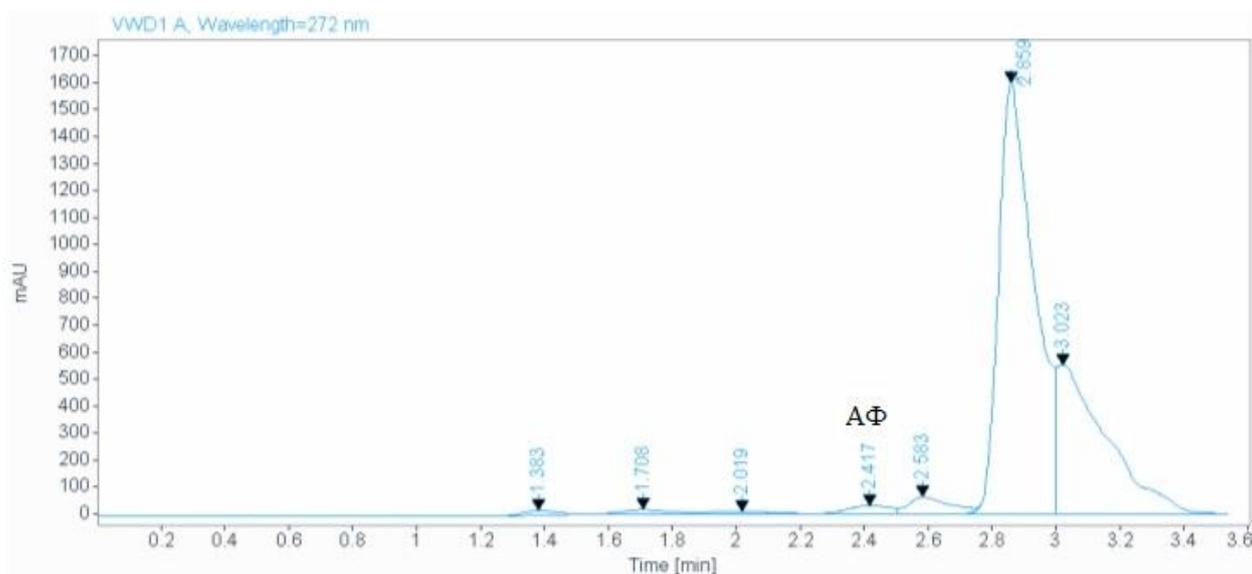


Рисунок 14 – Анализ ЛФ «ТераФлю» в виде порошка. НФ: ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм). Элюент: ацетонитрил-вода 8:2, СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

Как видно, хроматографический пик 4-аминофенола присутствует, чтобы удостовериться в его подлинности, мы воспользовались методом добавок.

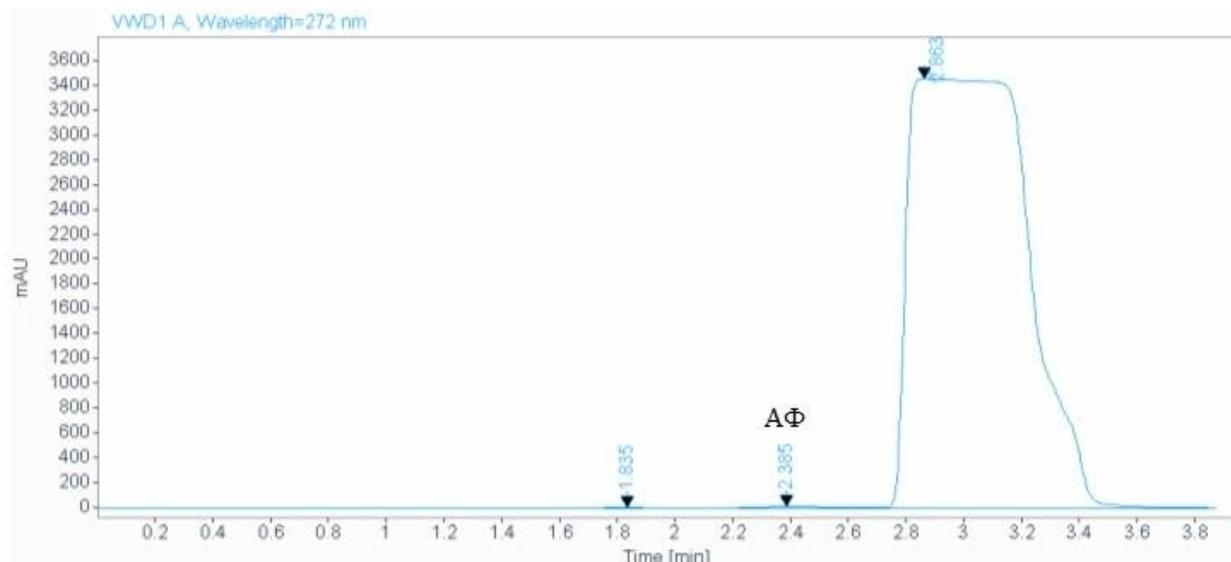


Рисунок 15 – Анализ ЛФ «Парацетамол Renewal» в виде таблетки. НФ: ZORBAXRX-SIL (4.6×150мм). Элюент: ацетонитрил-вода 8:2, СФД 272 нм, скорость потока 0.6 мл/мин

### 3.2. Количественное определение 4-аминофенола

4-Аминофенол является высокотоксичным соединением и строго нормируется в парацетамолсодержащих ЛС, для того, чтобы удостовериться соответствует ли нормам данная примесь в наших ЛФ и найти ее точное содержание, мы воспользовались методом абсолютной калибровки, построили градуировочную кривую по стандартным растворам и исходя из линейного уравнения нашли массу анализируемого соединения, после чего было определено процентное содержание 4-аминофенола. На рисунке 16 проиллюстрирована градуировочная кривая стандартных растворов 4-аминофенола, коэффициент корреляции, как можно заметить, близок к 1.

В таблице 11 приведены результаты анализа 4-аминофенола: масса навески, которую мы брали, объем пробы, количественные расчеты анализируемой примеси, а также инструментальная погрешность.

По результатам процентного содержания 4-аминофенола все ЛФ соответствуют нормам. ЛФ с наименьшим содержанием примеси оказалась «Ринзасип» в виде порошка, с наибольшим – «ТераФлю» в аналогичной ЛФ.

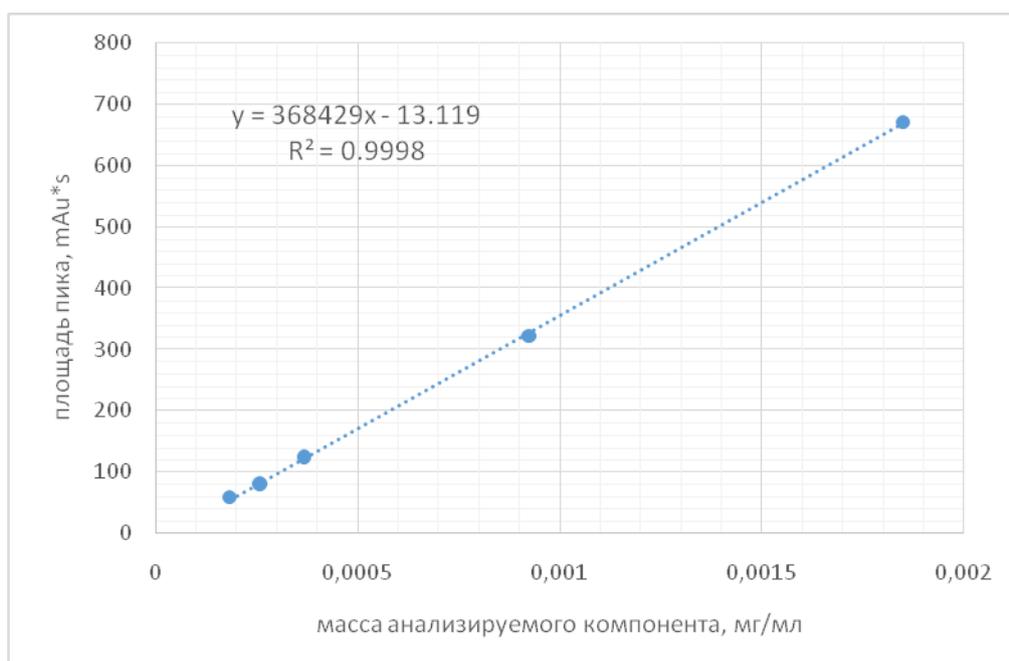


Рисунок 16 – Градуировочная кривая стандартных растворов 4-аминофенола

Таблица 11 – Результаты анализа АФ в лекарственных формах

Лекарственная форма	Масса анализируемого компонента, мг/мл	Объем пробы, мл	Масса навески, мг/мл	Процентное содержание $\times 10^{-3}$ , %
Колдрекс хотрем	0.00014	2	43.025	1.4±0,07
Ринзасип	0.00012	5	11.8	1.2±0,06
Парацетамол Renewal	0.0004	5	11.83	3.4±0,17
ТераФлю	0.00045	5	11.25	4.0±0,2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По литературным данным проанализированы возможности ВЭЖХ в анализе фармацевтических препаратов, сделан вывод, что ОФ метод хроматографии не всегда подходит для водорастворимых ЛС, в связи с низкими значениями фактора удерживания.

На примере контроля примеси 4-аминофенола проанализировано влияние на удерживание природы сорбента, состав элюента и рНПФ.

Установлено, что в ОФ ВЭЖХ 4-аминофенол имеет низкий фактор удерживания, что говорит нам о том, что данный вариант не желателен в аналитическом контроле содержания 4-аминофенола.

Исследованы возможности гидрофильной хроматографии. Показано, что время удерживания 4-аминофенола увеличилось примерно в два раза в сравнении с ОФ режимом, исследуемая примесь достаточно хорошо разделяется с парацетамолом. Подобраны колонка и состав элюента.

Методом абсолютной градуировки проведен анализ содержания 4-аминофенола в парацетамолсодержащих ЛС, показано что гидрофильная хроматография имеет хорошую перспективу в фармацевтическом анализе.

Было выявлено, что все исследуемые ЛФ с примесью 4-аминофенола соответствуют нормам. ЛФ с наименьшим содержанием примеси оказалась «Ринзасип» в виде порошка, с наибольшим – «ТераФлю» в аналогичной ЛФ.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карцова А. А. // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35.
2. Wilson I.D. Handbook of analytical separations. Bioanalytical separations Amsterdam: Elsevier science, 2003. 433 p.
3. Ettre L. S. // Chromatographia. 2000. Vol. 51. No. 1/2. P. 7.
4. Шатц В. Л. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.
5. Kazakevich Y. HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: John Wiley, 2007. 1135 p.
6. Lode F., Ronfield G. A., Yuan Q. S., Root T. W., Lightfoot E.N. // Journal of Chromatography A. 1998. No. 796. P. 3.
7. Wellings A. D. A practical handbook of preparative HPLC. Amsterdam: Elsevier science, 2005. 679 p.
8. Siley C.M., Lough W.J., Wainer I.M. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Liquid Chromatography. Oxford: Pergamon Division of Elsevier, 1994. 379 p.
9. Deyl Z. Quality Control in Pharmaceutical Analysis — Separation Methods. Amsterdam: Elsevier, 1997. 241 p.
10. Ahuja S. Trace and Ultratrace Analysis of HPLC. New York: Wiley–Interscience, 1992. 419 p.
11. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М. //Журн. аналит. химии. 2005. Т. 60. № 10. С. 1080.
12. Ларионова С.Г., Дементьева Н.Н., Нечаева Е.Б., Назаренко П.В., Нестерова Г.А. //Фармация. 2002. Т. 51. С. 16.

13. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М.// Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. № 1. С. 74.
14. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М., Басова Е.М. // Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61. № 4. С. 383.
15. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М., Костарной Е.М., Басова Е.М. //Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 2. С. 170.
16. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М., Костарной Е.М., Басова Е.М. //Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 6. С. 636.
17. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Иванов В.М., Костарной Е.М., Басова Е.М.// Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 9. С. 969.
18. Вергейчик Т.Х., Онегова Н.С. // Фармация. 2002. № 6. С. 13.
19. Лайпанов А.Х., Сланский В.Э. // Хим.-фарм. журнал. 1991. № 25. С. 75.
20. Голубицкий Г.Б., Иванов В.М. // Вест. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. Т. 49. № 4. С. 246.
21. Metwally M // Chromatographia. 1999. Vol. 50. No. 1/2. P. 113.
22. Бубенчикова Р.А., Дроздова И.Л. // Фармация. 2004. № 2. С. 11.
23. Бубенчикова Р.А., Дроздова И.Л. // Фармация. 2003. № 3. С. 12.
24. Антипова Е.А., Юдина С.М., Тимофеева Л.Е., Лейтес Е.А.// Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 103.
25. Федосеева Л.М., Кудрикова Л.Е., Турчанинов А.А., Сивова Ю.С. // Химия растительного сырья. 2006. № 4. С. 49.

26. Govindarajan R.A., Singh D.P., Singh A.P., Pandey M.M., Singh Rawat A.K. // *Chromatographia*. 2007. Vol. 66. No. 5/6. P. 401.
27. Bilia A.R., Salvini D., Mazzi G., Vincieri F.F. // *Chromatographia*. 2001. Vol. 53. No. 3/4. P. 210.
28. Sheu S.J., Huang M.H. // *Chromatographia*. 2001. Vol. 54. No. 1/2. P. 117.
29. Филимонов В.Н., Замуруев О.В., Балятинская Л.Н., Колосова И.Ф. // *Журн. аналит. химии*. 2000. Т. 55. № 7. С. 738.
30. Арбатский А.П., Афоньшин Г.Н., Востоков В.М. // *Журн. аналит. химии*. 2004. Т. 59. № 12. С. 1304.
31. Савватеев А.М., Белобородов В.Л., Тюкавкина Н.А., Тихонов В.П. // *Фармация*. 2004. № 3. С. 11.
32. Кожанова Л.А., Федорова Г.А., Барам Г.И. // *Журн. аналит. химии*. 2002. Т. 57. № 1. С. 53.
33. Wynne P.M., Batty D.C., Vine J.H., Simpson N.J.K. // *Chromatographia*. Supplement. 2004. Vol. 59. P. 51.
34. Wynne P.M., Simpson N. *Solid Phase Extraction, Principles, Techniques, and Applications*. New York: Marcel Dekker, CRC Press, 2000. 306 p.
35. Rozou S., Michaleas S., Antoniadou-Vyza E. // *Chromatographia*. Supplement. 2003. Vol. 57. P. 81.
36. Aboul-Enein H.Y., Hefnawy M.M. // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2003. Vol. 26. P. 2897.

37. Satinsky D. Huclova J., Solich P., Karlicek R. //J. Chromatogr. 2003. Vol. 1015. P. 239.
38. Schneider R.C., Kovar K.A. // Chromatographia. 2003. Vol. 57. P. 287.
39. Zeng H., Deng Y., Wu J.T. //J. Chromatogr. B. 2003. Vol. 788. P. 331.
40. Hefnawy M.M., Aboul-Enein H.Y. // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 504. P. 291.
41. Samanidou V.F., Ioannou A.S., Papadoyannis I.N. // J. Chromatogr. B. 2004. Vol. 809. P. 175.
42. Przybyciel M., Majors R.E. // LC GC Europe. 2002. Vol. 15. No. 10. P. 2.
43. Nagae N., Enami T., Doshi S. // LC GC North America. 2002. Vol. 20. No. 10. P. 964.
44. Lochmuller C.H. Ion–Pair Chromatography and Related Techniques. Boca Raton. CRC Press, 2010. 201 p.
45. Majors R.E., Przybyciel M. // LCGC North America. 2002. Vol. 20. No. 7. P. 584.
46. Рудаков О.Б., Селеменов В.Ф. Физико-химические системы сорбат–сорбент–элюент в жидкостной хроматографии. Воронеж, 2003. 240 с.
47. Хеншен А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М.: Мир, 1988. 688 с.
48. Sadek P.C. Troubleshooting HPLC System: A Bench Manual. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999. 306 p.

49. Boichenko P. A., Loginova P. L., Kulikov A. U. // Методы и объекты химического анализа. 2007. Т. 2, No. 2. С. 92.
50. Басова Е. М., Иванов В. М., Шпигун О. А // Успехи химии. 1999. Т. 68. № 12. С. 1083.
51. Perez-Martinez I., Sagrado S., Medina-Hernfindez M. J. // Chromatographia. 1996. Vol. 43. No. 3/4. P. 149.
52. Escuder-Gilabert L., Sagrado S., Medina-Herndndez M. J., Villanueva R. M. // Chromatographia. 2001. Vol. 53. No. 5/6. P. 256.
53. Bermudez-Saldana J. M., Quinones-Torrelo C., Sagrado S., Medina M. J. // Chromatographia. 2002. Vol. 56. No. 5/6. 299–306.
54. Kulikov A. U., Verushkin A. G., Lo L. P. //Chromatographia. 2005. Vol. 61. No. 9/10. P. 455.
55. Naidong W. //J. Chromatogr. B. 2003. Vol. 796. P. 209.
56. Bajad S. U., Lu W., Kimball E. H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J. D. // J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1125. P. 76.
57. Wang X., Li W, Rasmussen H. T. // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1083. P. 58.
58. Aversano C., Hess P., Quilliam M. A. // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1081. P. 190.
59. Xue Y. J., Liu J., Unger S. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. Vol. 41. P. 979.
60. Schilichtherle-Cerny H., Affloter M., Cerny C. // Anal. Chem. 2003. Vol. 75. P. 2349.

61. Wilson I.D., Smith R.M. Handbook of analytical separation. Amsterdam: Elsevier science, 2003. 425 p.
62. Quiming, N.S., Denola N.L., Saito Y., Catabay A.P., Jinno K. // Chromatographia. 2008. No. 39 (7/8). P. 507.
63. Гармонов С.Ю., Салахов И.А., Нурисламова Г.Р., Исмаилова Р.Н., Иртуганова Э.А. // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия «Естественные науки». 2010. Т. 152. Кн. 3. С. 106–113.
64. Салахов И.А., Гармонов С.Ю. // Вестник Казанского технологического университета. 2007. № 6. С. 34–36.
65. Салахов И.А., Гармонов С.Ю., Зыкова И.Е. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2009. № 4. С. 61–63.
66. Гармонов С.Ю., Салахов И.А., Нурисламова Г.Р., Исмаилова Р.Н., Сопин В.Ф. // Вестник Казанского технологического университета. 2010. № 10. С. 46–51.