

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: _____
(подпись)

Зав. Кафедрой Остапенко Г.И.

« » _____ 2017 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение бакалаврской работы

Студенту Салимовой Диане Зуфаровной

1. Тема квалификационной работы:

Определение госсипола методом гидрофильной ВЭЖХ в фармацевтических
препаратах

2. Срок сдачи студентом законченной выпускной квалификационной
работы: 29 июня 2017 года

3. Исходные данные к выпускной квалификационной работе литература по
теме исследования, ЖХ Agilent 1220, анализируемые лекарственные
препараты.

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

4.1 Подготовка литературного обзора с целью изучения
высокоэффективной жидкостной хроматографии, гидрофильной
хроматографии, строения, химических и биологических свойств госсипола и
его производных.

4.2. Подбор колонки для проведения хроматографического анализа
исследуемых лекарственных препаратов.

4.3. Построение градуировочной кривой, для определения концентрации
госсипола в некоторых фармацевтических препаратах, с помощью метода
абсолютной градуировки.

4.4.Подготовка аннотации на английском языке (консультант по разделу к.ф.н., Н.В.Яценко)

5. Ориентировочный перечень графического и иллюстративного материала: хроматограммы, график градуировочной кривой, таблица с результатами, презентация.

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы
12 октября, 2016 года _____

Руководитель выпускной
квалификационной работы

(подпись)

О.Б. Григорьева
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

(подпись)

Д.З. Салимова
(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.
« » _____ 2017 г.

**КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН
бакалаврской работы**

Студента: Салимовой Дианы Зуфаровны

по теме: Определение госсипола методом гидрофильной ВЭЖХ в фармацевтических
препаратах

Наименование раздела работы	Плановый срок выполнения раздела	Фактический срок выполнения раздела	Отметка о выполнении	Подпись руководителя
Подбор литературных источников и написание раздела «Литературный обзор»	01.04.2017 г.			
Выполнение экспериментальной части работы	12.05.2017 г.			
Написание раздела «Экспериментальная часть»	04.05.2017 г.			
Написание остальных разделов	14.05.2017 г.			
Верстка работы, проверка научным руководителем	20.05.2017 г.			
Проверка ВКР в системе «Антиплагиат.ВУЗ»	7.06.2017 г. 16.06.2017 г.			
Верстка и переплетение пояснительной записки	Первая неделя июня 2017 г.			
Оформление демонстрационного материала и устного доклада	За пять дней до защиты ВКР			

Руководитель выпускной
квалификационной работы

(подпись)

О.Б. Григорьева

(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

(подпись)

Д.З. Салимова

(И.О. Фамилия)

АННОТАЦИЯ

Данная выпускная квалификационная работа изложена на 56 страницах, включает в себя 1 таблицу и 7 рисунков. Список литературы представлен 89 источниками.

Исследуемыми объектами являются госсипол и его производные в составе фармацевтических препаратов.

Цель работы заключалась в исследовании возможностей гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГВЖХ) при определении госсипола в лекарственных препаратах.

В литературном обзоре особое внимание уделено способностям высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а именно гидрофильной хроматографии, и изучению строения, химических и биологических свойств госсипола и его производных.

В экспериментальной части, описана методика выполнения хроматографического анализа и перечислены необходимые для этого реактивы и оборудование.

В обсуждении результатов обосновывается выбор хроматографической системы; приводятся результаты разделения исследуемых фармацевтических препаратов; с помощью метода абсолютной градуировки, проводится определение в них концентрации госсипола.

ABSTRACT

This diploma paper deals with gossypol and the physicochemical methods of separation and analysis of various mixtures.

The aim of this work is determination of gossypol in pharmaceutical drugs using a hydrophilic high performance liquid chromatography (HILIC).

The object of the graduation work is to perform chromatographic analysis of gossypol in pharmaceutical preparations.

The subject of the graduation project is gossypol - a polyphenolic compound contained in pigment glands of the cotton plant.

The issues of the nature of gossypol and its derivatives and its content in medicine and chromatographic methods are central in the project.

Under carrying out the chromatographic analysis, two columns, such as C18 and NH₂ were selected and examined, of which, in the process of the test analysis a more efficient and exact one was selected. This was followed by hydrophilic chromatographic analysis of such pharmaceutical products as *Kagocel*, *Ragosin* and *Megosin* for the purpose of detection the content of gossypol and its derivatives in them.

The special part of the graduation work gives details about the chromatographic methods of analysis, in particular, the hydrophilic high-performance liquid chromatography, which was used in this senior thesis. Techniques, as well as the selection of the appropriate chromatographic column for the determination of gossypol in such pharmaceutical preparations as *Kagocel*, *Ragosin* and *Megosin* were considered in the experimental part of the work.

The results of experiments on the analysis of gossypol and its derivatives were discussed in the final part of the graduation work.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1. Распространенные хроматографические методы.....	11
1.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография – один из основных методов разделения	12
1.3. Гидрофильная хроматография.....	15
1.4. Строение и химические свойства госсипола.....	19
1.5. Биологическая активность госсипола и его производных.....	27
1.6. Виды фармацевтических препаратов содержащих госсипол и его производные.....	32
1.7. Методы анализа госсипола и его производных.....	35
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	37
2.1. Оборудование, реагенты и объекты исследования.....	37
2.2. Методика измерения.....	38
2.2.1. ВЭЖХ анализ.....	38
2.2.2. Метод абсолютной градуировки	39
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	40
3.1. Подбор хроматографической системы и идентификация исследуемого вещества.....	40
3.2. Определение концентрации.....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ТСХ	Тонкослойная хроматография
ГТХ	Газотвердофазная хроматография
ГАХ	Газоадсорбционная хроматография
ГЖХ	Газожидкостная хроматография
ЖХ	Жидкостная хроматография
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
НФ-ЖХ	Нормально-фазовая жидкостная хроматография
ОФ-ЖХ	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография
ГВЖХ	Гидрофильная высокоэффективная жидкостная хроматография
ИХ	Ионная хроматография
ЖХ/МС	Жидкостная хромато-масс-спектрометрия
Г	Госсипол
НФ	Неподвижная фаза
ПФ	Подвижная фаза
ЛК	Лекарственный препарат

ВВЕДЕНИЕ

Среди различных хроматографических методов высокоэффективная жидкостная хроматография является наиболее быстрым, чувствительным и распространенным методом качественного и количественного анализа. На сегодняшний день, ВЭЖХ нашел широкое применение в фармацевтической промышленности и в различных лабораториях при исследовании и изучении огромного количества лекарственных веществ.

В последнее время наибольшую популярность среди методов жидкостной хроматографии набирает гидрофильная хроматография. В данном режиме интенсивно используются различные универсальные подвижные фазы, что открывает для данного метода широкие области применения, например для разделения биологических, органических и некоторых неорганических молекул за счет их разности в полярности. Разделение в гидрофильной хроматографии очень легко сочетается с различными детекторами, наиболее часто используют ультрафиолетовый. Уникальная разделительная способность ГВЖХ по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией, делают его идеальным методом для многомерной хроматографии, которая может увеличить эффективность разделения. Гидрофильный режим хорошо дополняет ОФ-ЖХ, которая является одной из основных хроматографических технологий, применяемых сегодня.

Главной целью в данной дипломной работе является установление возможностей определения госсипола в фармацевтических препаратах в гидрофильном режиме хроматографии.

Задачами работы было:

- изучить литературные данные, посвященные хроматографическим методам анализа, в частности высокоэффективной жидкостной хроматографии и гидрофильной хроматографии, а также проанализировать структуру, биологическую роль и фармацевтические препараты, содержащие в своем составе госсипол и его производные;

- подобрать хроматографическую систему для проведения определения госсипола в лекарственных препаратах;
- построить градуировочную кривую и определить концентрацию госсипола в исследуемых объектах.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Распространенные хроматографические методы анализа

Хроматография - это аналитический метод, основанный на разделении молекул из-за различий в их структуре или составе. В общем виде, хроматография представляет собой перемещение образца через систему над неподвижной фазой. Молекулы в образце имеют различное сродство и взаимодействие с неподвижной фазой, что и приводит к разделению молекул. Компоненты, обладающие более сильным взаимодействием с неподвижной фазой, перемещаются по колонке более медленно, чем компоненты со слабыми взаимодействиями. Различные виды соединений могут быть отделены друг от друга, путем их перемещения через колонку [1].

Хроматографическое разделение веществ проводится различными методами с использованием различных подвижных фаз. В тонкослойной хроматографии (ТСХ), твердофазный адсорбент наносится на твердую поверхность в виде твердого слоя, обычно используется стекло, пластик или подложка из алюминия. Этот метод является популярным для анализа широкого спектра органических и неорганических веществ, из-за его отличительных преимуществ, таких как минимальная очистка образца, широкий выбор подвижных фаз, универсальность в разделении образца, высокая емкость нагрузки пробы и низкая стоимость. ТСХ играет важную роль в ранней стадии разработки лекарственных средств, тогда когда информации о примесях и продуктах разложения лекарственного вещества и лекарственного продукта недостаточно. С помощью ТСХ также определяются и выявляются различные примеси в фармацевтических препаратах [2].

Газовая хроматография – вид хроматографии, в котором в качестве подвижной фазы для взаимодействия с анализируемым веществом применяется газ. В этом виде хроматографии, образец растворяют в растворителе и для разделения аналитов испаряют, за счет распределения

образца между двумя фазами: неподвижной фазой и подвижной фазой. Подвижная фаза представляет собой инертный газ, часто применяется гелий, который служит для переноса молекул анализируемого вещества через колонку с подогревом. Неподвижной фазой может быть твердый адсорбент, и такая хроматография будет называться, газотвердофазной (ГТХ) или газоадсорбционной (ГАХ). Если в качестве неподвижной фазы, наносимой на инертный носитель, используется жидкость, то такой метод называется газожидкостной хроматографией (ГЖХ).

В бумажном методе разделения веществ, неподвижная фаза представляет собой полоску бумаги для хроматографии, а подвижная фаза - любой жидкий растворитель или смесь растворителей. Этот метод в основном используется для анализа, идентификации, очистки и количественного анализа смесей компонентов в индивидуальных соединениях.

Жидкостная хроматография (ЖХ) - это метод разделения анализируемой смеси на компоненты. Такое разделение происходит на основе взаимодействия образца с подвижной и неподвижной фазами. В качестве элюента в таком методе используют жидкость, а в качестве неподвижной фазы твердый носитель. Жидкостная хроматография в основном может быть использована для аналитических или препаративных применений.

В данной дипломной работе, основным методом разделения является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

1.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография – один из основных методов разделения

ВЭЖХ метод представляет собой, один из главных и традиционных видов жидкостной хроматографии [3] для разделения и количественного определения соединений [1]. Высокоэффективная жидкостная

хроматография или жидкостная хроматография высокого давления является методом, который используется в аналитической химии для разделения смеси соединений и в биохимии для выявления, количественного определения или очистки отдельных компонентов смеси. Также он является ведущим аналитическим методом в фармацевтическом анализе, который используется преимущественно в фармацевтической промышленности для анализа различных соединений [4] и препаратов в многокомпонентных лекарственных формах, которые могут быть проанализированы данным методом, обладающим такими преимуществами, как быстрота, конкретность, точность и простота автоматизации. В методе ВЭЖХ используется неподвижная фаза, заключенная либо в стеклянную, либо в пластиковую трубку, и подвижная фаза, содержащая смешивающиеся комбинации воды или органических растворителей, наиболее распространенными являются метанол и ацетонитрил [5]. Когда анализируемый образец проходит через колонку, он начинает распределяться между подвижной и неподвижной фазами. Жидкая (подвижная) фаза, выходящая из колонки, имеет фракции, содержащие отдельные компоненты в образце. Устройство жидкостного хроматографа составляют: неподвижная фаза, в качестве нее используют хроматографические колонки C18, NH₂ и другие, насос, который перемещает подвижную фазу через колонку и детектор, который фиксирует времена удерживания каждой молекулы. Время удерживания зависит от природы аналита и состава как стационарной, так и подвижной фаз [6]. Таким образом, ВЭЖХ представляет большую ценность в ответе на множество вопросов фармацевтической промышленности. Тем не менее, ВЭЖХ включает ряд ограничений, такие как, высокая стоимость колонок, растворителей и отсутствие долгосрочной воспроизводимости, за счет собственной природы упаковки колонки [2].

Методы, используемые в хроматографии, подразделяются на один из четырех типов, основанных на механизме их действия, таким образом, выделяют адсорбционную, распределительную, ионообменную и

эксклюзионную хроматографию. Адсорбционная хроматография возникает за счет взаимодействия между растворенными веществами и поверхностью твердой неподвижной фазы. Распределительная включает жидкую стационарную фазу, которая не смешивается с элюентом и покрывается инертной подложкой. Ионообменная хроматография имеет стационарную фазу с ионно-заряженной поверхностью, которая отличается от заряда пробы, то есть, чем сильнее заряд образца, тем сильнее притяжение к неподвижной фазе. Следовательно, потребуется больше времени, чтобы элюировать его с колонки. В эксклюзионной происходит разделение веществ по молекулярным размерам. Стационарная фаза, в этом виде хроматографии, должна состоять из материала с точно контролируемым размером пор. Маленькие частицы попадая в колонку элюируются дольше, чем более крупные частицы. Также существуют несколько других типов хроматографического разделения, например, ионно-парная хроматография, которая используется в качестве альтернативы ионообменной хроматографии и хиральной хроматографии (для разделения энантиомеров) [1]. Для анализа веществ, в основном, используют нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию.

Нормально–фазовая хроматография (НФ-ЖХ) разделяет определяемые вещества на основе их полярности [5], но по сравнению с обращенно-фазовой используется намного реже. Основной причиной этого является то, что разделение веществ легче всего происходит при помощи обращенно-фазовой хроматографии, но иногда, для некоторых анализов, может применяться и нормально-фазовая.

Нормальная фаза может использоваться для соединений, которые являются слишком гидрофобными или гидрофильными для разделения с использованием обращенной фазы. Соединения, которые не растворимы в воде или которые могут разлагаться в воде, могут быть проанализированы в нормально-фазовой хроматографии. НФ-ЖХ широко используется для разделения различных соединений, от неполярных до сильно полярных. При

нормальной фазовой жидкостной хроматографии, неподвижная фаза более полярная, чем подвижная фаза. Удерживание возрастает по мере возрастания полярности, таким образом, полярные аналиты удерживаются сильнее, чем неполярные [7,8].

Противоположная ситуация имеет место в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии [9]. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ЖХ) является очень полезным методом для анализа в биохимии, этот способ предполагает разделение молекул на основе их гидрофобности. Отделение зависит от гидрофобного связывания молекулы растворенного вещества из подвижной фазы с иммобилизованными гидрофобными лигандами, прикрепленными к неподвижной фазе, т. е. сорбенту [10]. Обращенно-фазовая хроматография - наиболее часто используемый метод разделения в ВЭЖХ из-за его широкого спектра применения. Более 65% - 90% всех ВЭЖХ-разделений осуществляется в обращенно - фазном режиме. Причинами этого являются простота, универсальность и масштаб данного метода, поскольку он способен обрабатывать соединения различной полярности и молекулярной массы [11-13]. Первые приложения для ВЭЖХ были опубликованы более 30 лет назад и в течение длительного времени ограничивались анализом углеродов. В начале 1990-х годов начали появляться новые режимы, в том числе и гидрофильная хроматография [14].

1.3. Гидрофильная хроматография

Гидрофильная хроматография является альтернативным методом ВЭЖХ для разделения полярных соединений и вариантом нормальной фазовой жидкостной хроматографии, но механизм разделения используемой в ГВЖХ является более сложным, чем в НФ-ЖХ. Как и НФ-ЖХ в ГВЖХ применяют традиционные полярные неподвижные фазы, они состоят из классического диоксида кремния, амино-, циано- групп [15-19] или

силикагелей, модифицированных многими полярными функциональными группами.

Силикагели, используемые в гидрофильной хроматографии, подразделяют на три типа:

1 тип: Силикагели, полученные путем их осаждения из растворов силикатов, являются кислыми, так как они загрязнены некоторыми металлами, которые активируют поверхностные силанольные группы и образуют комплексы с некоторыми хелатными растворами, вызывая сильное удерживание или асимметричность пиков.

2 тип: Силикагели, образующиеся за счет агрегации золь диоксида кремния на воздухе, они содержат очень малое количество металлов и более стабильны при средних и высоких значениях pH, чем материалы типа ксерогеля. Такой тип обеспечивает лучшее разделение, особенно для базовых образцов, поскольку они представляют собой высокоочищенные, менее кислые «золь-гель» сферические частицы диоксида кремния [20].

3 тип: Силикагели с гидрофильной поверхностью, заполненной, вместо силанольных групп, неполярными гидрид - кремниевыми группами Si-H. Такой тип может содержать до 95% удаленных исходных силанолов, что делает его менее полярным, чем силикагели с более высоким содержанием силанольных групп [21].

В качестве подвижной фазы используют аналогичные группы, которые применяются в режиме ОФ-ЖХ [14,18,19]. Типичная подвижная фаза, для гидрофильной хроматографии, включает смешивающиеся с водой полярные органические растворители, такие как ацетонитрил с небольшим количеством воды [22]. Может быть использован и любой апротонный растворитель, который смешивается с водой (например, тетрагидрофуран, ТГФ и / или диоксан). Можно также применять спирты, но требуются более высокие концентрации для получения хорошей степени удерживания исследуемого вещества по отношению к апротонным растворителям и воде [14]. Для выбора подходящего органического растворителя пользуются

элюотропным рядом, в котором растворители, в соответствии с увеличением прочности элюирования, располагаются в следующий ряд:

ацетон < изопропанол □ пропанол < ацетонитрил < этанол < диоксан < ДМФА □ метанол < вода.

Механизм и теоретическое описание удержания аналита в ВЭЖХ были предметом многих статей, до сих пор нет единого мнения о наиболее реалистичном механизме удержания и лучшей теории для его описания [23, 24]. Существуют три возможных способа моделирования механизма разделения. Первый способ-это разделение исследуемого вещества между подвижной и неподвижной фазами [25, 26]. Второй-адсорбция вещества на поверхности адсорбента [27, 28]. Третий способ, предполагает предпочтительную адсорбцию органического подвижного фазового модификатора на поверхности адсорбента с последующим разделением этого вещества на адсорбционном слое [29]. Удерживания в ВЭЖХ одновременно зависит от различных типов межмолекулярных взаимодействий между растворенным веществом и неподвижной фазой, растворенным веществом и подвижной фазой, а также между неподвижной и подвижной фазами. Разделение в ГВЖХ проводится либо в изократической форме с высоким процентом органического растворителя, либо в градиентной, начиная с высокого процента органического растворителя и заканчивая высоким содержанием водного растворителя [22]. Считается, что в ГВЖХ подвижная фаза образует насыщенный водный слой на поверхности полярной неподвижной фазы по отношению к водной недостаточной подвижной фазы, создавая систему экстракции жидкость / жидкость, а исследуемое вещество распределяется между этими двумя слоями [22,30]. Удержание в гидрофильной хроматографии вызвано разделением. Механизм разделения основан на дифференциальном распределении введенных молекул растворенного исследуемого вещества между обогащенной, каким-либо органическим растворителем подвижной фазы, и обогащенным водным слоем, адсорбированным на гидрофильной неподвижной фазе [14,22]. Чем

более гидрофильна анализируемая среда, тем сильнее равновесие смещается в сторону слоя иммобилизованной воды на неподвижной фазе, и, следовательно, тем больше исследуемого вещества на нем сохранится. Другими словами, происходит разделение на основе полярности соединений и степени их сольватации.

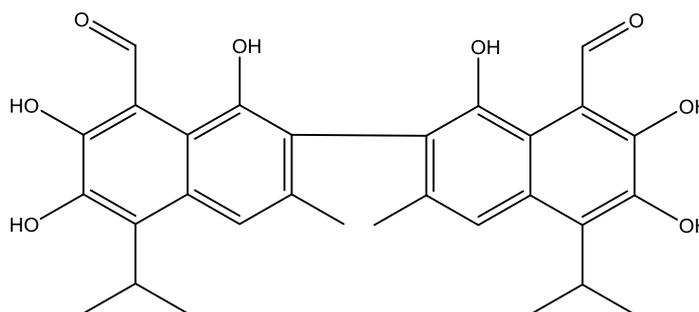
Гидрофильная хроматография так же, как и ионная хроматография (ИХ) позволяет проводить анализ заряженных веществ, то есть включает в себя взаимодействия доноров водорода между нейтральными полярными частицами, и слабые электростатические механизмы в условиях высокого органического растворителя, используемых для удерживания. Существуют различные исследования, указывающие на разносторонний механизм данного вида разделения [14,22]. Например, Альпертом [22] было рассмотрено диполь-дипольные взаимодействия, и водородные связи, которые могут способствовать разложению в неподвижный фазовый слой. Он отметил, что к выраженной гидрофильности и удерживанию приводят основные группы в растворенном веществе, и поэтому их взаимодействие вносит особый вклад в механизм разделения. Йошида [31] также считал, что удерживание в гидрофильной хроматографии охватывает как водородную связь, которая зависит от кислотности/основности Льюиса, так и от диполь-дипольных взаимодействий, зависящих от дипольных моментов и поляризуемости молекул. ГВЖХ имеет много специфических преимуществ по сравнению с нормально-фазовой и обращенно-фазовой хроматографией. Например, она пригодна для анализа соединения в сложных системах, которые всегда элюируют около обращенно-фазовой хроматографии. Полярные образцы всегда показывают хорошую растворимость в водной подвижной фазе, используемой в ГВЖХ, которая преодолевает недостатки плохой растворимости часто встречающейся в НФ-ЖХ. В отличие от ОФ-ЖХ, градиентное элюирование в ГВЖХ начинается с малополярных органических растворителей и элюирование полярных аналитов происходит за счет увеличения полярного водного содержания. Предпочтительно, чтобы

подвижная фаза была с высоким содержанием органических веществ, для улучшения чувствительности, а также, показала на колонке хорошее удерживание полярных ионных соединений.

Гидрофильная хроматография жидкостного взаимодействия зарекомендовала себя, как способ разделения высоко незаряженных гидрофильных и амфифильных соединений, которые являются слишком полярными, чтобы быть хорошо удерживаемыми в ОФ-ЖХ, но они имеют недостаточный заряд, чтобы обеспечить эффективное электростатическое удерживания в ионообменной хроматографии. Разделение ГВЖХ в настоящее время вызывает большой интерес, поскольку она решает многие сложные проблемы разделения сильно полярных веществ, в том числе и биологически активных соединений, таких как нуклеозиды, нуклеотиды, аминокислоты, белки, олигосахариды [32], углеводы[33,34], пептиды[15,31,35], полярные лекарственные средства [18,36] и другие.

1.4. Строение и химические свойства госсипола

Госсипол – это сложное полифенольное соединение, представляющее собой, встречающийся в природе высокоцветный желтый пигмент, обнаруженный в мелких межклеточных пигментных железах листьев, стеблей, корней и семян хлопчатника [37-39]. В 1927 году, Кларк сформулировал общую формулу госсипола - $C_{30}H_{30}O_8$, а спустя тридцать один год, после синтеза госсипола Эдвардсом, была предложена и структурная формула - 2,2-бис-(1,6,7-триокси-3-метил-5-изопропил-8-альдегидонафтил):

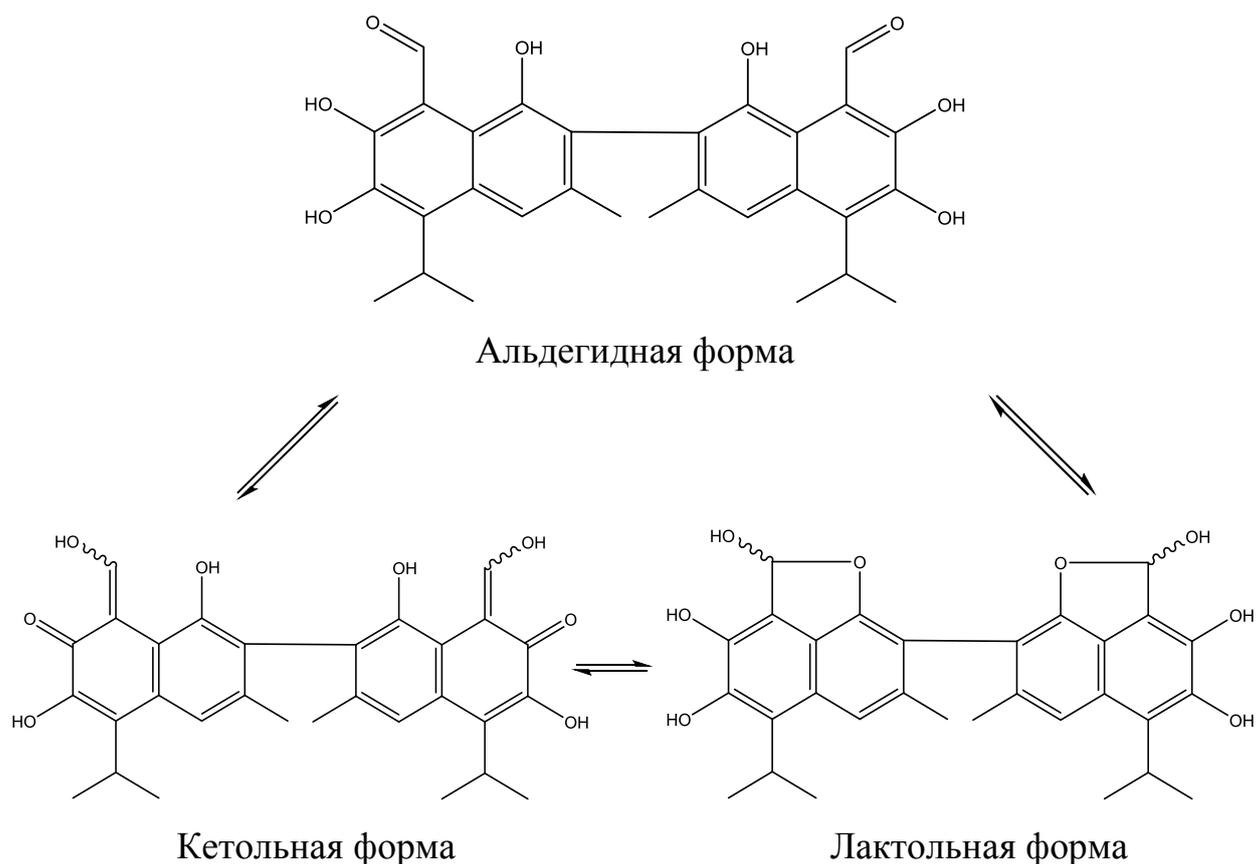


Госсипол, был обнаружен в конце XIX века Лонгмором [40] и Марчлевским [41], он представляет собой сложное полифенольное соединение, которое является, частью системы защищающее растения от патогенных грибов и травоядных насекомых [42,43]. Лонгмор и Марчлевский стремились использовать госсипол в качестве красителя, но обнаружили, что пигмент был нестабильным на свету, что и препятствовало его применению.

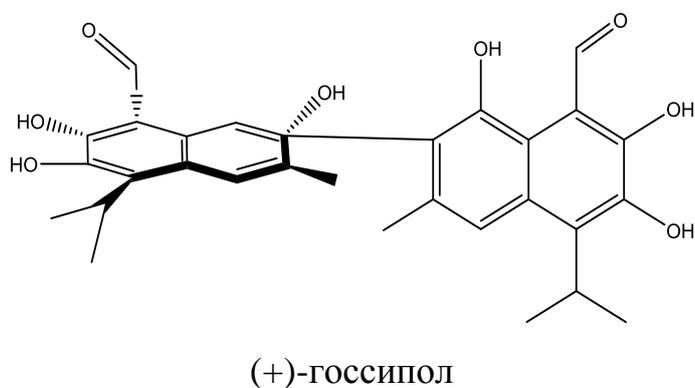
Госсипол содержит полярные группы (шесть гидроксильных и две альдегидные группы), что делает его растворимым в большинстве органических растворителей, таких как метанол, этанол, диоксан, диэтиловый эфир, ацетон, этилацетат, хлороформ, фенол, пиридин и другие. Он менее растворим в глицерине, циклогексане, бензоле, бензине и петролейном эфире. Однако из-за присутствия двух тяжелых диалкилнафталиновых групп он является нерастворимым в воде. Используя диэтиловый эфир, хлороформ и лигроин, Кемпбелл в 1937 году получил три формы госсипола с различными точками плавления 184°C, 199°C и 214°C, а в 1960 году Адамс предположил, что эти образцы представляют собой три таутомерные формы госсипола, что и было продемонстрировано Ибрагимовым в 1995 году [44]. Образец с температурой плавления 214°C представлял собой альдегидную форму, то есть сам госсипол, такая форма присутствует в неполярных растворителях, таких как хлороформ, ацетон, диоксан и т.д. Два других соединения являются кетольной формой, существующей в основных растворителях, и лактольной формой.

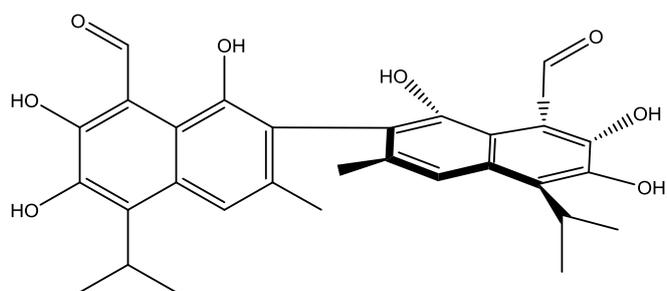
В полярных растворителях, например в диметилсульфоксиде (ДМСО), госсипол находится в равновесном состоянии между лактольным и альдегидным таутомерами и равновесие, из-за повышения нуклеофильности растворителя, смещается в сторону лактольной формы [45].

Кроме таутомерии, для госсипола свойственна энантиомерия, то есть оптическая изомерия. Молекула госсипола содержит два одинаковых нафталиновых фрагмента соединенных между собой С-С связью и образующих между ними двугранный угол близкий к 90°. Взаимодействие



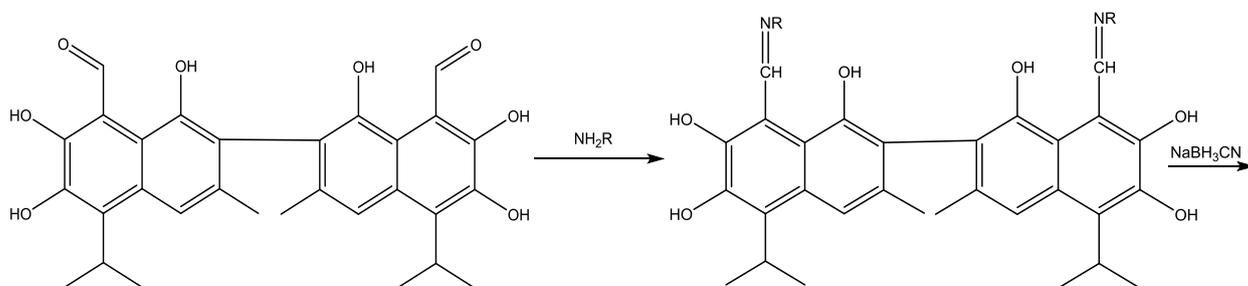
между 3,3'-метильными и 1,1'-гидроксильными заместителями приводит к пространственному затруднению связи 2,2' по которым происходит соединение между двумя нафталиновыми циклами, поэтому вращение вокруг этой связи ограничено. Это затрудненное вращение приводит к образованию двух симметричных энантиомеров (-)-госсипола и (+)-госсипола [41].





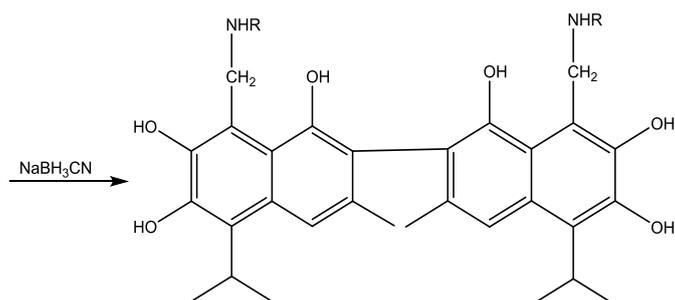
(-)-госсипол

На сегодняшний день, получено много производных госсипола, но наиболее широко были исследованы его основания Шиффа, образованные при действии первичного амина на карбонильную группу молекулы госсипола [46,47].



Госсипол

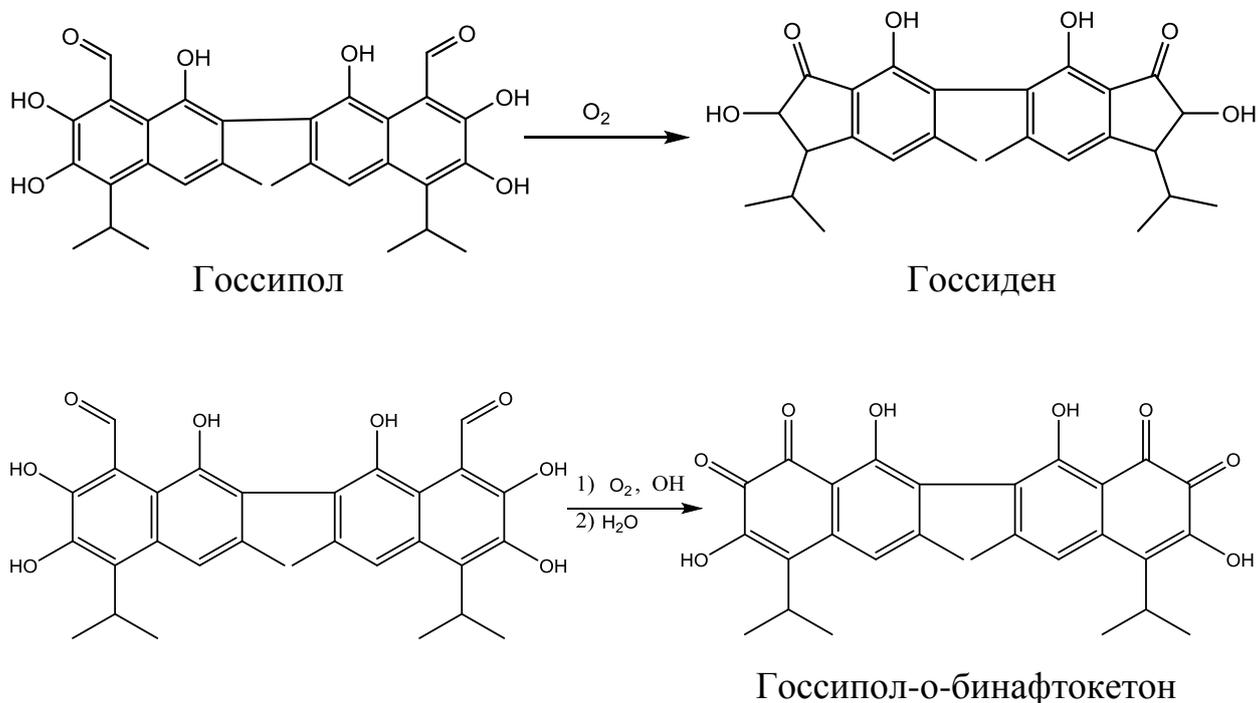
Основание Шиффа



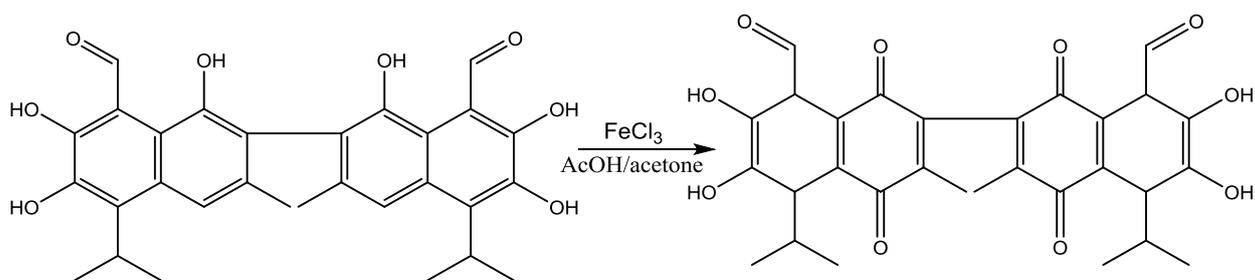
Вторичный амин

Основание Шиффа, по реакции восстановительного аминирования, можно восстановить до вторичного амина путем добавления боргидрида натрия или цианоборгидрида натрия. Цианоборгидрид, является более мягким восстановителем, по сравнению с боргидридом натрия, и он не

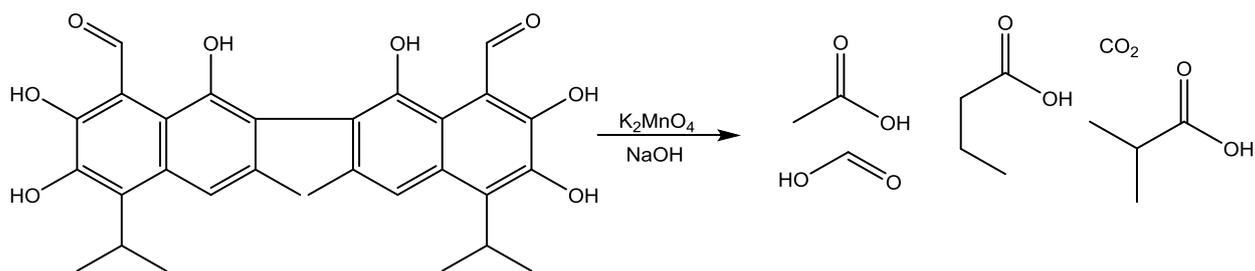
восстанавливает альдегидные группы, но он очень эффективен для восстановления основания Шиффа. Госсипол является нестабильным соединением и легко может окисляться при различных условиях. В основном окисление происходит в щелочной среде. В 1994 году Исмаиловет путем окисления госсипола чистым кислородом в щелочной среде, получил госсиден. В 1999 году Талипов и Ибрагимов при помощи рентгеноструктурного анализа определили монокристаллическую структуру госсидена и определили, что он вместо нафталинового цикла, как у госсипола, содержит индан. Также окислением госсипола можно получить госсипол-о-бинафтокетон. Госсиполон, получают под действием гексагидрата хлорида железа(III) в уксусной кислоте или ацетоне. Кларк в 1928 году при окислении госсипола перманганатом калия в среде NaOH, обнаружил такие соединения как: муравьиную кислоту, уксусную кислоту, масляную кислоту, изомаляную кислоту и углекислый газ [44].



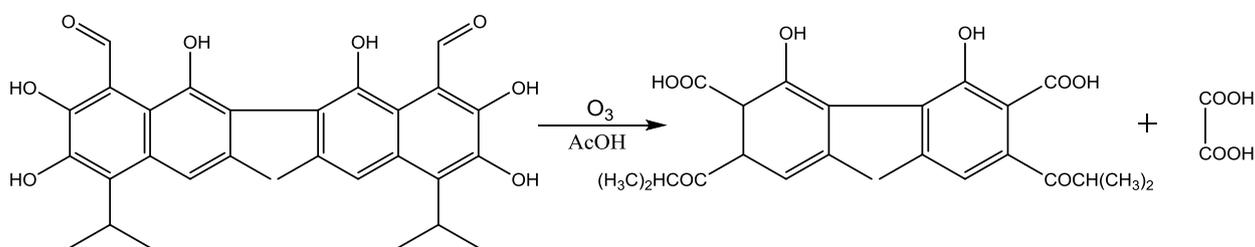
Госсипол также можно озонировать в растворе уксусной кислоты, в результате получают госсиполовую и щавелевую кислоты, но выход госсиполовой кислоты значительно меньше щавелевой.



Госсиполон



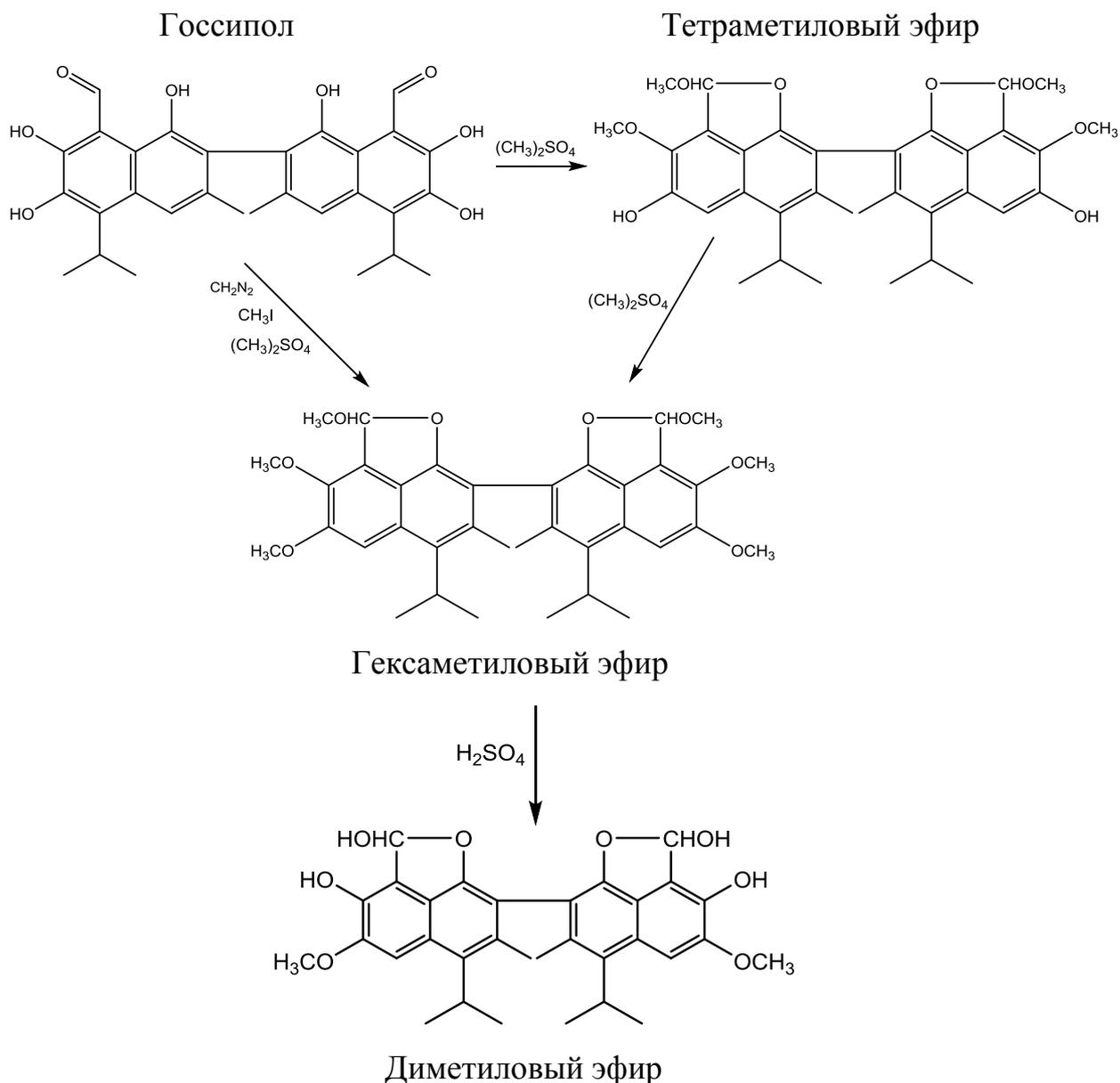
Муравьиная, уксусная, масляная и
изомасляная кислоты



Госсиполовая кислота

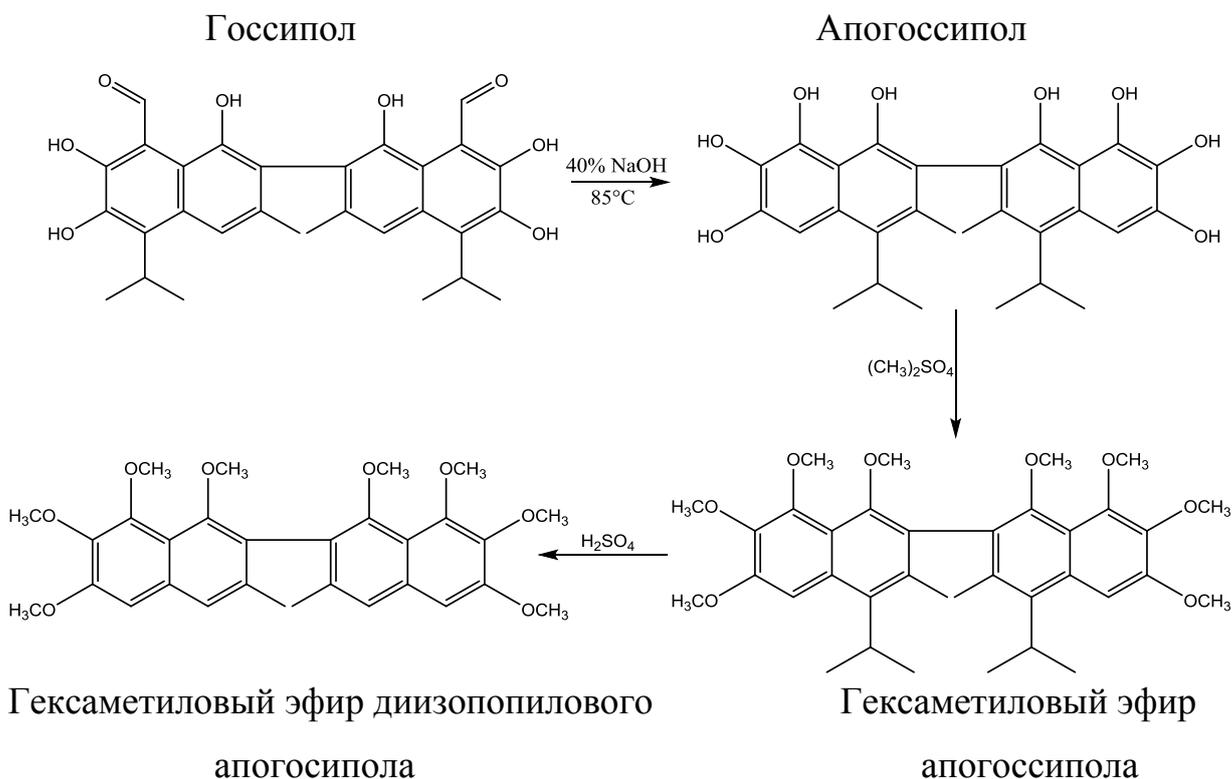
Высокой стабильностью также обладают и эфиры госсипола, например гексаметиловый эфир образуется под действием на госсипол диметилсульфата и менее сильных метилирующих агентов, таких как метилиодид и диазометан в эфире [48]. Из гексаметилового эфира, путем обработки госсипола раствором концентрированной серной кислоты в уксусной кислоте, можно получить диметиловый эфир. Тетраметиловый эфир госсипола образуется под действием диметилсульфата в метанольном

гидроксиде калия, и в дальнейшем, под действием диметилсульфата, он может быть метилирован в гексометиловый эфир[49].

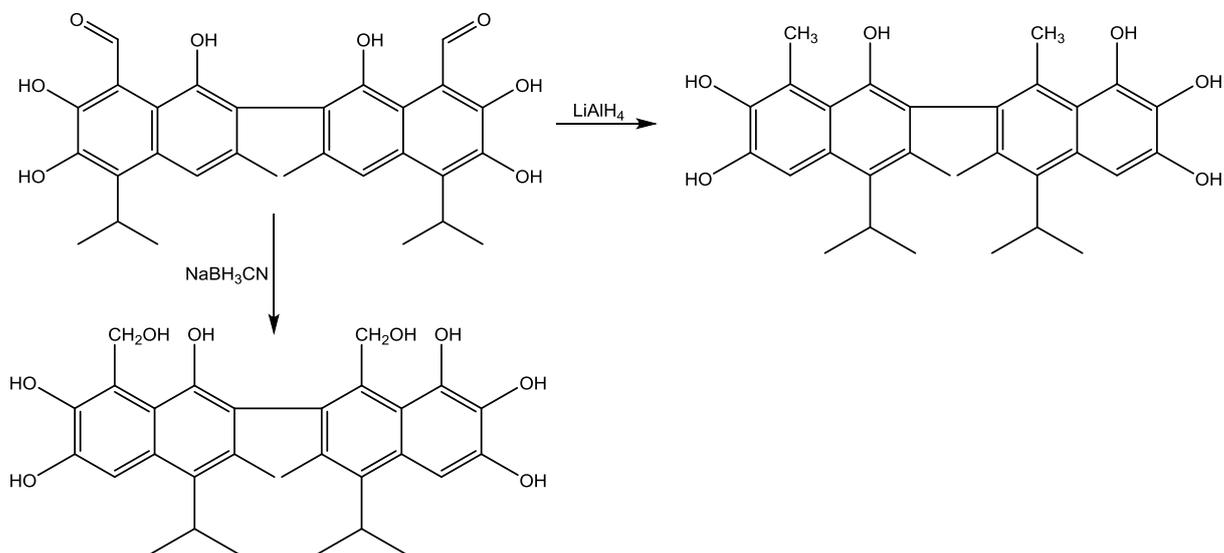


Еще одним производным госсипола является апогоссипол, он является очень чувствительным соединением, так как даже под небольшим влиянием воздуха, меняет свой первоначальный цвет с желтого на коричневый. Образуется апогоссипол за счет реакции взаимодействия между госсиполом и 40% водным раствором натрия гидроксида в атмосфере азота, в течение 1,75 ч и при температуре 85 °С. Апогоссипол может превратиться в гексаметиловый эфир апогоссипола под действием диметилсульфата, а затем, при дальнейшей обработке данного эфира концентрированной серной

кислотой, получают гексаметиловый эфир диизопопилового апогоссипола [44].



Восстановление госсипола может проводиться под действием таких сильных восстановителей как алюмогидрид лития LiAlH_4 и цианоборгидрид натрия NaBH_3CN , при этом альдегидные группы, при использовании LiAlH_4 , восстанавливаются до метильных, а при использовании NaBH_3CN до метанольных [38,44,50,51].



1.5. Биологическая активность госсипола и его производных

Госсипол является реакционноспособным соединением благодаря присутствию шести фенольных и двух альдегидных групп. Эта реакционноспособность также способствует и биологической активности госсипола. Госсипол является перспективным средством для лечения лейкемии [52], лимфомы [53], карциномы толстой кишки [54,55], рака молочной железы [56, 57], миомы, рака предстательной железы [58] и других злокачественных новообразований [59-63], а также характеризуется широкими противовирусными, противоопухолевыми и противогрибковыми свойствами.

Антиоксидантные свойства

Биологическая активность многих растительных полифенолов во многом определяется их способностью ингибировать свободно-радикальные процессы [64]. Полифенолы являются вторичными метаболитами растений и обычно участвуют в защите от ультрафиолетового излучения или агрессии со стороны патогенов. Как и многие другие ароматические фенольные химические вещества, госсипол является эффективным и мощным природным антиоксидантом. Например, было обнаружено, что госсипол защищает каротин от предварительно переработанных пероксидов жира *in vitro*, а также действует как антиоксидант, предохраняющий каротин *in vivo* [65]. В некоторых случаях, модификация фенольных гидроксильных групп на госсиполе значительно снижают химические антиокислительные способности свободных активных радикалов, а также предотвращают повреждения ДНК демонстрируя, что гидроксильные группы имеют решающее значение для антиоксидации [66]. В 2000 году Ли и соавторы обнаружили, что госсипол в присутствии Fe^{3+} и аскорбата [67], защищает суперспирализованную плазмидную ДНК от повреждения дозозависимым

образом, а в 2005 году Додью предположил, что антиоксидантные свойства госсипола могут быть полезны при заболеваниях, характеризующихся липидным окислительным повреждением, таких как псориаз [68].

Противораковая активность

Госсипол также может быть противоопухолевым химиотерапевтическим средством, так как способен ингибировать рост ряда клеточных линий, включая клетки молочной железы, толстой кишки, предстательной железы и лейкемии.

Исследователи оценили противоопухолевые свойства госсипола, против многих типов линий раковых клеток, с помощью МТТ-теста. Данный метод используется для проверки цитотоксичности разного рода соединений, а также для определения лекарственной чувствительности опухолей [69]. Суть МТТ-теста заключается в восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида клетками, обладающими метаболической активностью, например фермент клеточной оксидоредуктазы, превращает желтую соль тетразолия 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид в 5-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-1,3-дифенилформаза (формаза). Образованные таким образом кристаллы формаза растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО), а затем спектрофотометрически определяют концентрацию по интенсивности излучения, которая будет прямо пропорциональна числу метаболически активных клеток и, следовательно, будет указывать на жизнеспособность клетки [70,71].

Эффект клетки (-) - госсипола в более низких концентрациях был более сильным по сравнению с (+) - госсиполом или рацемическим госсиполом [72,73,74]. Эти эффекты включали ингибирование цитоплазматических и митохондриальных ферментов, участвующих в выработке энергии и расщепление окислительного фосфорилирования. Госсипол также ингибирует ключевые ядерные ферменты, ответственные за репликацию и

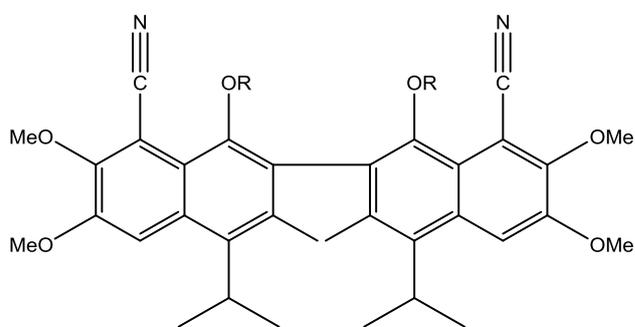
восстановление ДНК, включая ДНК-полимеразу и топоизомеразу II, а также блокируют синтез ДНК в клетках HeLa. (-) - Госсипол вызывает полное высвобождение цитохрома из митохондрий, увеличивает активность каспазы-3 и каспазы-9 и вызывает апоптотическую смерть. Балакришнан и соавторы в 2008 году обнаружили, что (-) - госсипол действует как миметик VH_3 и связывается с VH_3 -связывающим доменом в проапоптотических белках семейства Bcl_2 , вытесняя смертельные вещества, чтобы индуцировать апоптоз. Это усиливает противоопухолевую активность рентгеновского облучения и химиотерапевтических агентов, таких как доцетаксел, которые оказывают противоопухолевую активность посредством ингибирования антиапоптотического белка Bcl-xL и увеличивают проапоптотическую активность белков Noxa и Puma [75,76].

Исследование производных госсипола [77] показало, что апогоссиполон может ингибировать рост клеточной линии лимфомы. Апогоссипол селективно ингибирует пролиферацию трех линий клеток NPC, которую высоко выражают антиапоптотические белки Bcl-2 с высвобождением цитохрома, активацией каспаз -9 и -3 и апоптоз чувствительных клеток NPC [78]. Апогоссипол показал лучшую активность в плане снижения спленомегалии, то есть увеличение селезенки и снижения количества В-клеток в селезенке трансгенных мышей, что указывает на потенциал производных госсипола для лечения рака. Госсиполон был менее активным, чем госсипол, в ингибировании клеток рака молочной железы человека. Сниженная эффективность госсиполон по сравнению с госсиполом в клетках рака молочной железы согласуется с эффектами антифертильности, но в отличие от антистероидных и антирепродуктивных эффектов госсиполон, которые показали такую же эффективность, как госсипол. Метилированный госсипол, 6-метоксигоссипол и 6,6-диметоксигоссил по сравнению с исходным соединением показали лучшую противораковую активность против раковых клеток молочной железы и толстой кишки [66]. Таким образом, считается, что госсипол останавливает рост клеток в фазе

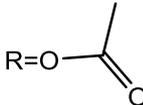
G_0/G_1 и индуцирует клеточный апоптоз в раковых клетках путем регуляции клеточного цикла, ферментов, антиапоптоза и проапоптозных белков.

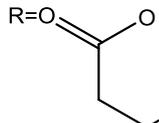
Антивирусная активность

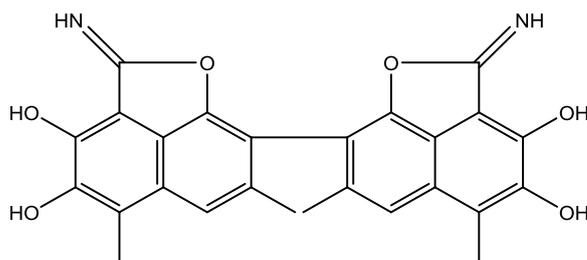
Госсипол обладает противовирусными свойствами против вируса иммунодефицита типа I (ВИЧ-I) и обнаруживает, что (-) -госсипол является более ингибирующим по сравнению с (+) - госсиполом. Помимо ВИЧ-I, госсипол также показал противовирусную активность в многочисленных оболочечных вирусах, включая вирус герпеса простого типа II (ВПГ- II), вирус гриппа и вирус парагриппа [79]. Госсипол и ряд его производных проявляли противовирусную активность против ВПГ-II, а такие его производные как, госсиполовый нитрил-1,1'-диацетат и госсиполовый нитрил-1,1'-дивалерат были способны ингибировать размножение вируса в клетках Vero, которые были инфицированы вирусом перед введением препарата. Модификация альдегидных групп госсипола привела к снижению его токсичности по отношению к клеткам-хозяевам Vero, но не отменяла противовирусную активность (ВПГ- II) соединения. Госсипол и его производные, госсиполовый нитрил-1,1'-диацетат, госсиполовый иминолактон и госсиполовый лактон ингибируют репликацию ВИЧ-I *in vitro*, что указывает на то, что производные госсипола могут сохранять противовирусную активность.



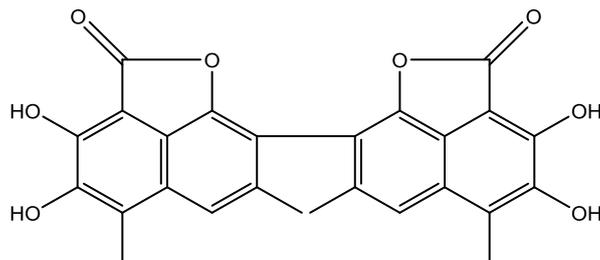
Госсиполовый нитрил

Если , то госсиповый нитрил-1,1'-диацетат

Если , то госсиповый нитрил-1,1'-дивалерат



Госсиповый иминолактон



Госсиповый лактон

Противопаразитарные свойства

Малярия - заболевание, переносимое простейшими паразитами (комарами), вызываемое инфекцией *Plasmodium falciparum*. Противомалерийная активность госсипола и его производных составляют от 13 до 83 мМ. Производные с этильными, пропильными или изопропильными боковыми цепями, а также 1,1-дивалерат госсипола показали более сильное ингибирование по сравнению с другими производными госсипола против роста данной инфекции [80].

Противомикробная активность

Госсипол обладает противогрибковой активностью и оказывает ингибирующее действие на микроорганизмы, включая аэробные спорообразователи, лактобактерии и некоторые дрожжи. Маргалит в 1967 году продемонстрировал антибиотические свойства госсипола против спорообразующих и лактобактерий, испытав его ингибирующее действие на

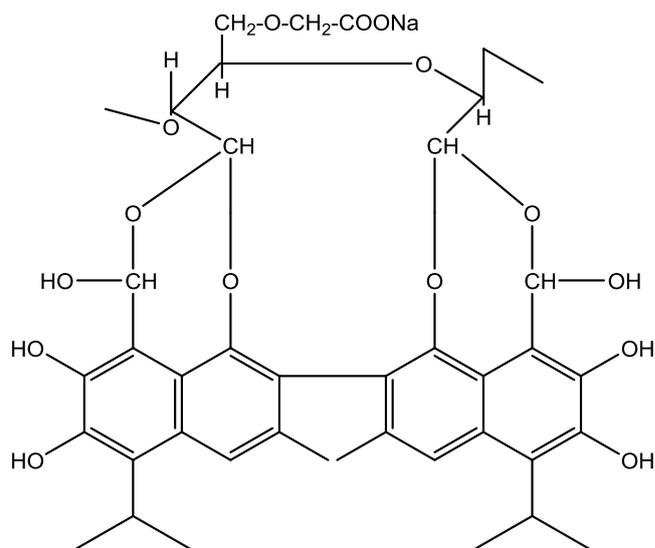
микроорганизмах животных получавших питание из хлопковой кормовой муки. Результат показал, что госсипол вызывал фундаментальное изменение равновесия микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Госсипол является более мощным антибактериальным агентом против грамположительных организмов, чем грамотрицательных, это может происходить из структурных различий в клеточной стенке и клеточной мембране грамположительных и грамотрицательных групп. Например, грамположительные бактерии имеют больше пептидогликана в своих клеточных стенках и не имеют наружной мембраны, обнаруженной в грамотрицательных организмах. Это, возможно, влияет на перенос госсипола на его сайт-мишень [65].

1.6. Виды фармацевтических препаратов, содержащих госсипол и его производные

На основе госсипола и его производных разработано огромное множество лекарственных препаратов таких как: «Кагоцел», «Батриден», «Гозалидон», «Рагосин», мазь «Мегосин» и другие.

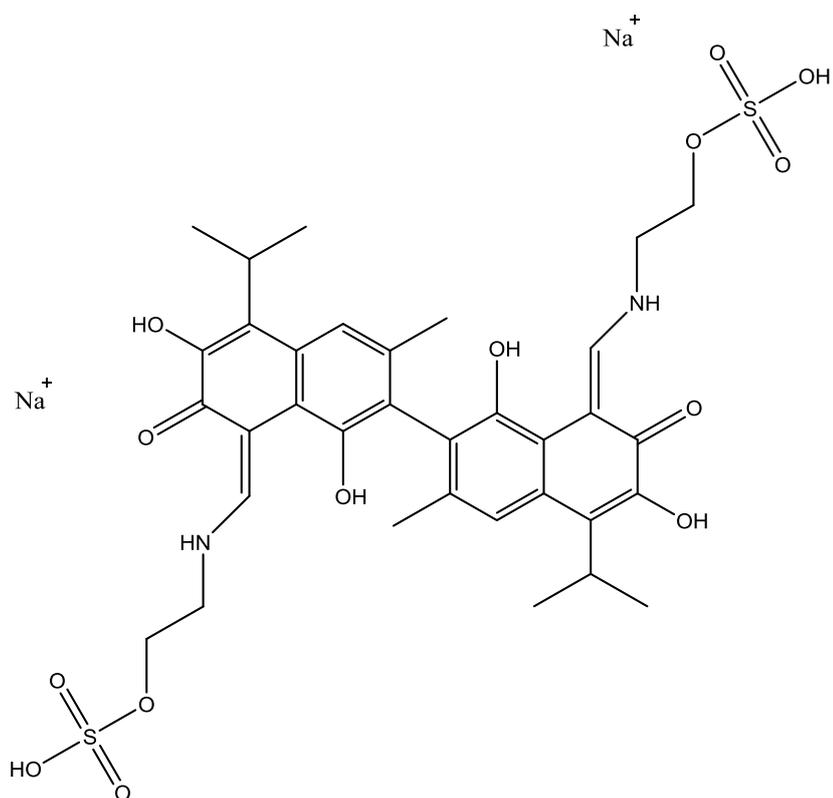
«Кагоцел» - это одно из средств для лечения и профилактики острых респираторно-вирусных заболеваний у детей и взрослых, а также он проявляет высокую активность в лечении герпеса. Основными активными веществами данного препарата является сополимер карбоксиметилцеллюлозы и госсипола - одного из пигментов хлопчатника.

Структурная формула «Кагоцела»:

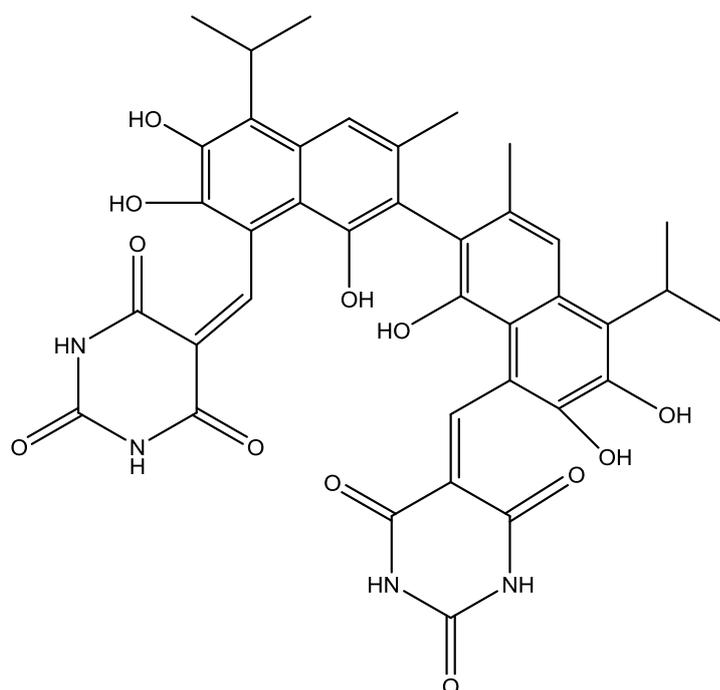


Основной механизм действия госсипола заключается в стимуляции выработки α - и β -интерферонов, то есть белков, оказывающих противовирусное и иммуно-моделирующей эффекты: понижение температуры и противовирусное действие. Спецификой этого лекарственного препарата является то, что может применяться как при первых признаках заболевания, так и при сильно выраженных симптомах.

«Мегосин» - общая формула $C_{34}H_{40}Na_2O_{14}S_2$, представляет собой противовирусный препарат, применяемый при поражениях участков кожи образованных в результате вируса герпеса и обладающий подавляющей активностью к данной инфекции. Структурная формула данного препарата приведена ниже:



«Батриден» - общая формула $C_{38}H_{34}N_4O_{12}$, данный препарат чаще всего применяют после операций в качестве иммунодепрессанта. Неблагоприятным действием «Батридена» является то, что он при применении в большом количестве может вызывать вред организму, такой как гноение послеоперационной раны, заражение крови и прочее. Структурная формула «Батридена» приведена ниже:



1.7. Методы анализа госсипола и его производных

Госсипол в хлопковых продуктах может существовать в двух формах: в свободной и в связанной. Для определения одной из этих форм требуют различных методов подготовки образца. Свободная форма госсипола может быть экстрагирована при помощи различных органических растворителей, например, гексаном или водным раствором ацетона [81]. Связанная форма представляет собой ковалентные аддукты госсипола с белками, из которого при нагревании с кислотами, может быть выделена свободная форма [82].

Существует множество методов определения госсипола и его производных, такие как спектрофотометрия, неводный титриметрический метод, газовая хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография [82,83]. Спектрофотометрический метод определения свободного госсипола заключается в экстракции при комнатной температуре смесью изопропанол-гексан (3:2), содержащей 0,2 об. % 3-аминопропан-1-ола, 0,8 об. % уксусной кислоты и 5 об. % воды. Для экстракции общего госсипола образец следует нагревать до 100 °С с помощью раствора ледяной уксусной кислоты в диметилформамиде, содержащем 2 об. % 3-аминопропан-1-ола. Затем экстрагированный госсипол определяют спектрофотометрически, при длине волны 440 нм в качестве аддукта (основание Шиффа) с анилином, т.е. дианилин-госсипола. Этот метод имеет ограничения, так как соединения, отличные от госсипола, могут адсорбировать при данной длине волны [84]. Высокоэффективная жидкостная хроматография является более точным методом и чаще используется для количественного и качественного определения госсипола благодаря существованию хромофорных групп, которые имеют сильное поглощение в УФ диапазоне [42]. Определение госсипола с помощью ВЭЖХ обычно проводят с применением колонки C18, а в качестве подвижной фазы используют ацетонитрил - воду или метанол - воду, подкисленные H_3PO_4 . УФ - детектирование проводят при длине волны около 385 нм, что

соответствует максимуму поглощения госсипола. Также существует хиральный метод ВЭЖХ для определения энантиомеров госсипола на основе образования диастереомеров с (*R*)-(-)-2-аминопропан-1-олом [85]. Так в 2008 году из корневой коры были выделены и определены после дериватизации с (*R*)-(-)-2-аминопропан-1-олом хиральные формы госсипола 6-метоксигоссипол и 6,6-диметоксигоссипол [86]. В последнее время разработаны методы определения госсипола, в биологических образцах, на основе жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС) (электрораспылительная ионизация в режиме положительных ионов) [87,88] определение этим методом стало более чувствительным, точным и эффективным.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Оборудование, реагенты и объекты исследования

Оборудование:

1. Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы Agilent Technologies 1220
2. Хроматографический шприц Agilent 1220
3. Колонка хроматографическая ZORBAX NH₂ (4.6×150мм), произведена в Agilent
4. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм), произведена в Agilent
5. Ультразвуковая ванна «Сапфир»
6. Мембранный фильтр PTFE с размером пор 0,45мкм.
7. Аналитические весы

Реагенты:

1. Ацетонитрил, фирмы Macron Fine Chemicals
2. Госсипол стандартный образец
3. Калия фосфат однозамещенный, ч.
4. Дистиллированная вода
5. Ледяная уксусная кислота

Объекты исследования:

1. Лекарственный препарат «Кагоцел» в виде таблетки, производитель ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» (Россия, г. Москва).
2. Лекарственный препарат «Рагосин» в виде таблетки, производитель АО Узхимфарм, (Узбекистан, г. Ташкент).
3. Лекарственный препарат «Мегосин» в виде порошка, производитель Опытное производство института биоорганической химии (Узбекистан, г. Ташкент).

2.2. Методика измерения

2.2.1. ВЭЖХ анализ

Хроматографический анализ госсипола и лекарственных препаратов на его основе, проводили на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220, оборудованный спектрофотометрическим детектором. Обработку данных производили при помощи программы LC 1220 OpenLAB online.

В качестве раствора сравнения брали стандартный образец госсипола. Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил, однозамещенный фосфат калия и воду.

Для приготовления испытуемых растворов, в ступке измельчаем лекарственные вещества, точную навеску взвешиваем на аналитических весах и переносим в коническую колбу, приливаем ацетонитрил и ледяную уксусную кислоту, затем все хорошо перемешиваем и в течение 15 минут обрабатываем ультразвуком. Полученный раствор фильтруем через мембранный фильтр.

После чего, на примере свежеприготовленного «Кагоцела» проводим выбор хроматографической колонки, для проведения гидрофильного анализа, между ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм) и ZORBAX NH₂ (4.6×150мм), а в качестве подвижной фазы используем ацетонитрил-воду в соотношении 8:2.

После выбора подходящей колонки проводим само разделение лекарственных веществ с целью обнаружения в них пика госсипола. В качестве элюента используем однозамещенный фосфат калия с рН=2,5 и ацетонитрил в соотношении 2:8. Анализы проводили при условиях: объем вводимой пробы - 20мкл, длина волны - 235нм, скорость потока – 1мл/мин.

2.2.2. Метод абсолютной градуировки

Концентрацию госсипола в определяемых веществах находим по методу абсолютной градуировки. Для их определения, прокалывали серию растворов госсипола, и по полученным значениям строили градуировочную кривую. Затем, по методу наименьших квадратов находим уравнение для расчета содержания госсипола в определяемых лекарственных препаратах.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Подбор хроматографической системы и идентификация исследуемого вещества

На сегодняшний день, в литературе известны различные методики анализа госсипола методом ОФ-варианта ВЭЖХ [89]. Определение госсипола в этом случае не вызывает больших проблем, так как, он является высокомолекулярным соединением, которое достаточно долго находится в колонке. Данный эксперимент был воспроизведен нами на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм) с использованием стандарта, пик госсипола в данном случае был идентифицирован. Следует отметить, что компоненты основного состава при этом не делятся, что и является частой проблемой при анализе фармацевтических препаратов.

Все большее количество исследований в практике хроматографии полярных водорастворимых соединений проводятся в условиях гидрофильного режима (комбинации полярной подвижной фазы и полярного же водно-органического элюента). Возможно, в ближайшее время многие анализы фармпрепаратов будут переведены в эти условия.

Таким образом, представляет интерес исследование возможностей гидрофильной хроматографии при анализе госсипола. У госсипола также можно отметить перспективы его дальнейшего использования во многих отраслях производства, кроме фармацевтической, например, в качестве хлопковой муки богатой белками и предназначенной для кормления животных.

Исследование госсипола показало, что данное соединение проявляет противоопухолевую, антиоксидантную, противовирусную активность, а также иммуномоделирующее действие. Раньше на его основе изготавливали лекарственные препараты, но оказалось, что при системном введении и накоплении госсипол проявляет токсическое действие. Такое действие

сводится к минимуму при сшивке госсипола с молекулярными, в том числе и полимерными структурами. В таком виде он находится, например, в структуре кагоцела. Содержание свободного госсипола при этом обязательно контролируется.

В процессе пробоподготовки исследуемых образцов, могут возникать различные примеси, точное содержание чистого госсипола при этом определяется после воздействия на стандартный образец госсипола кислотного или щелочного гидролиза или окислительного воздействия. При проведении ВЭЖХ анализа было обнаружено, что в образце подвергнутом щелочному гидролизу NaOH и пероксидному окислению, происходило полное разрушение госсипола, и его пик на хроматограмме отсутствовал. Следовательно, для проведения дальнейшего исследования анализируемых образцов, мы использовали кислотный гидролиз ледяной уксусной кислотой, под действием которого, разрушения госсипола не происходило.

При проведении гидрофильной хроматографии в качестве неподвижной фазы использовали колонку ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). В процессе анализа данная колонка показала хорошую высоту и симметричность пика, а также более лучшие и точные результаты, так как помимо хроматографического пика определяемого вещества, как было с использованием колонки C18 (рисунок 1), были обнаружены пики соответствующие различным примесям, содержащимся в данном фармацевтическом препарате (рисунок 2).

Также на примере «Кагоцела» можно заметить, что и у свежеприготовленного раствора (рисунок 2), и у раствора, хранящегося в течение одного месяца (рисунок 3) пик госсипола не исчезает и все также обнаруживается на хроматограмме.

После выбора подходящей хроматографической системы, в условиях гидрофильной ВЭЖХ проводим анализ исследуемых ЛП, а именно: «Рагосин», «Мегосин» и «Кагоцел» (рисунок 4-6).

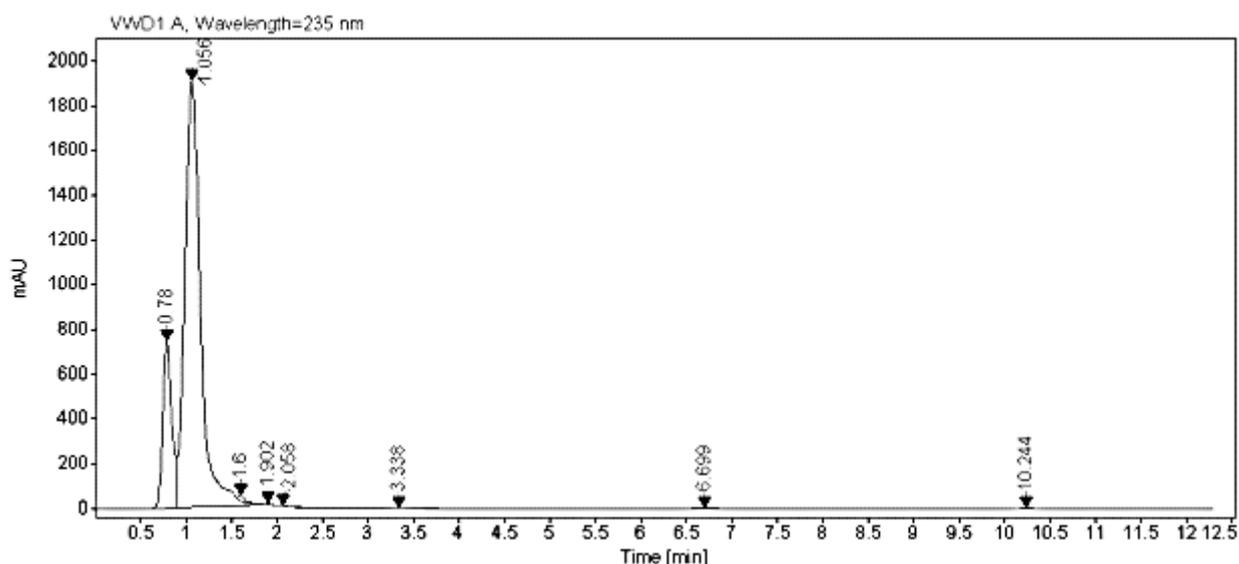


Рисунок 1 - Анализ лекарственного препарата «Кагоцел» в виде таблетки.
 Неподвижная фаза: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). Подвижная фаза:
 ацетонитрил-вода 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны
 235нм, скорость потока 1мл/мин

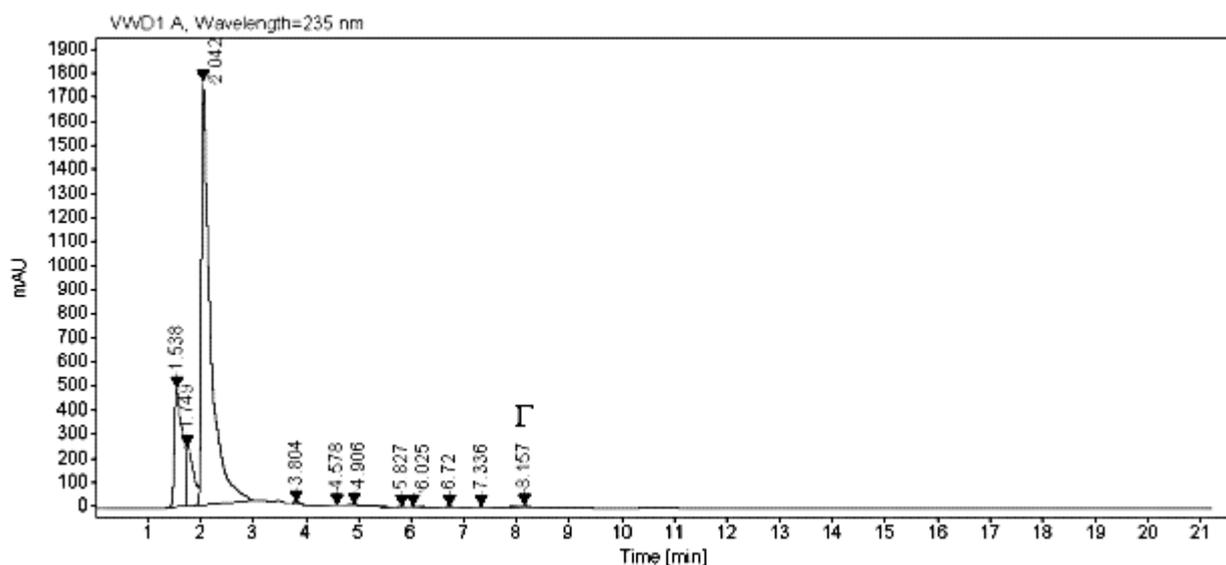


Рисунок 2 - Анализ лекарственного препарата «Кагоцел» в виде таблетки.
 НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 8:2,
 спектрофотометрический детектор с длиной волны 235нм,
 скорость потока 1мл/мин

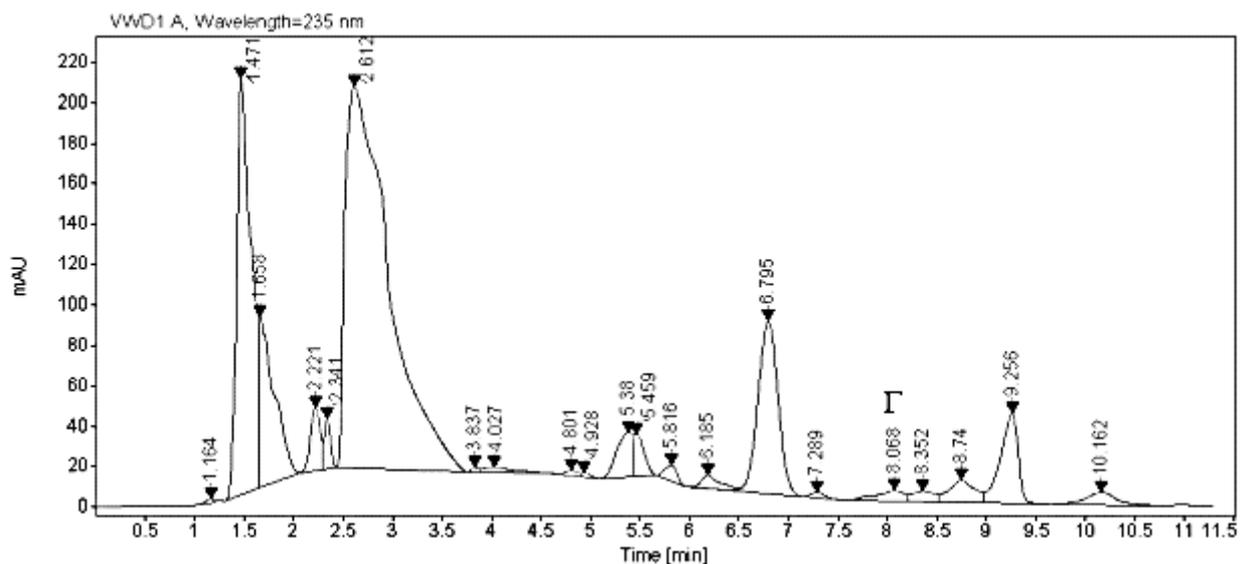


Рисунок 3 - Анализ лекарственного препарата «Кагоцел» в виде таблетки, по истечению одного месяца. НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны 235нм, скорость потока 1мл/мин

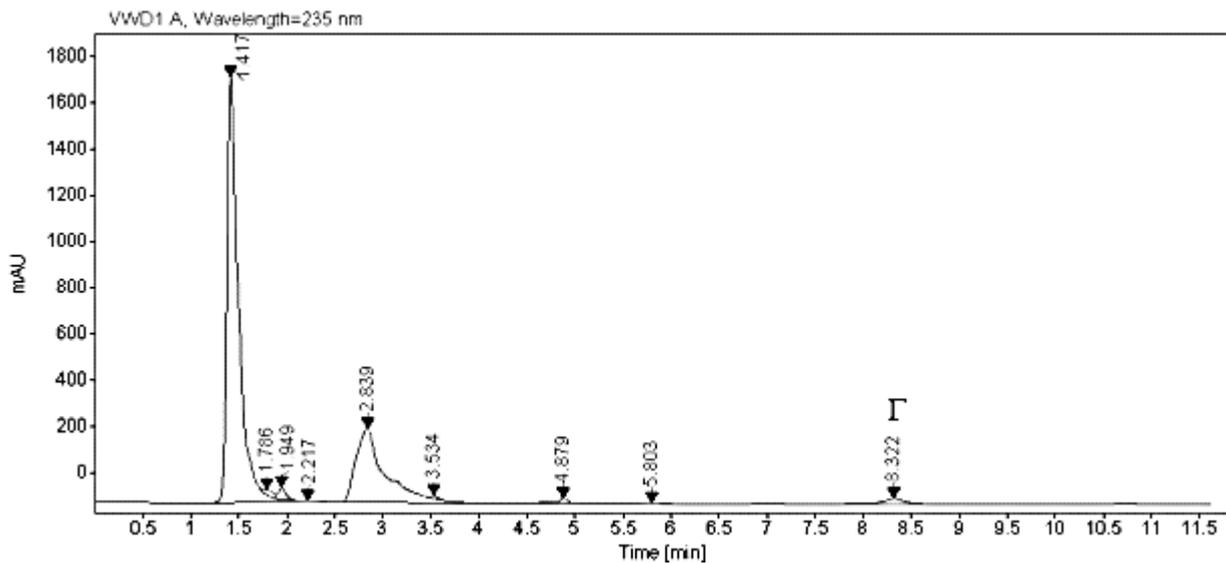


Рисунок 4 - Анализ лекарственного препарата «Рагосин» в виде таблетки. НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 8:2, спектрофотометрический детектор с длиной волны 235нм, скорость потока 1мл/мин

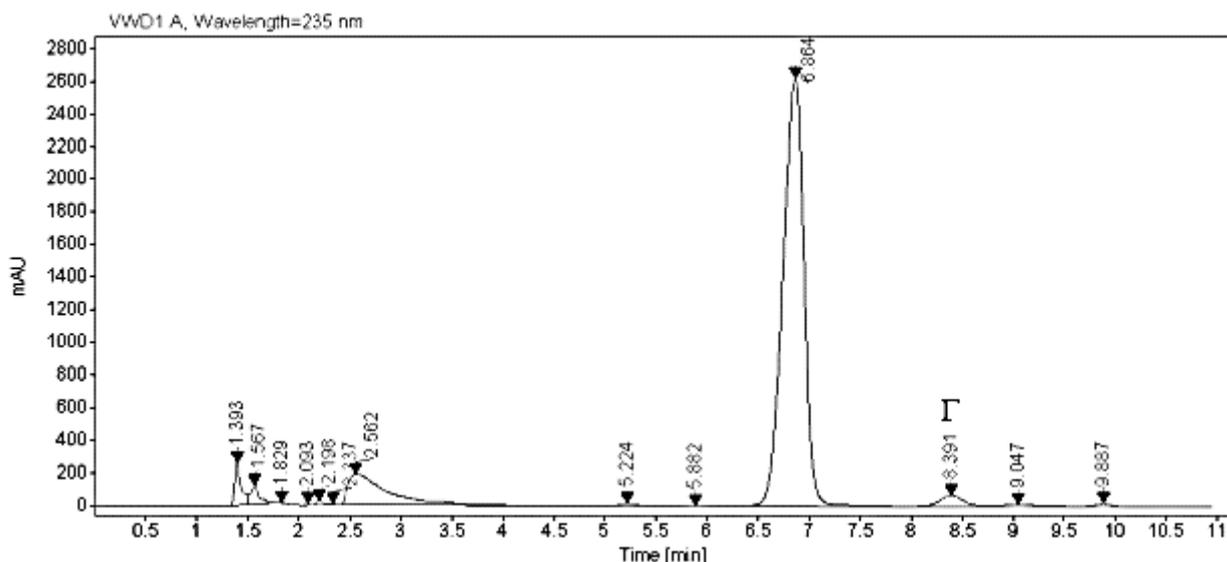


Рисунок 5 - Анализ лекарственного препарата «Мегосин» в виде порошка.
 НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 8:2,
 спектрофотометрический детектор с длиной волны 235нм,
 скорость потока 1мл/мин

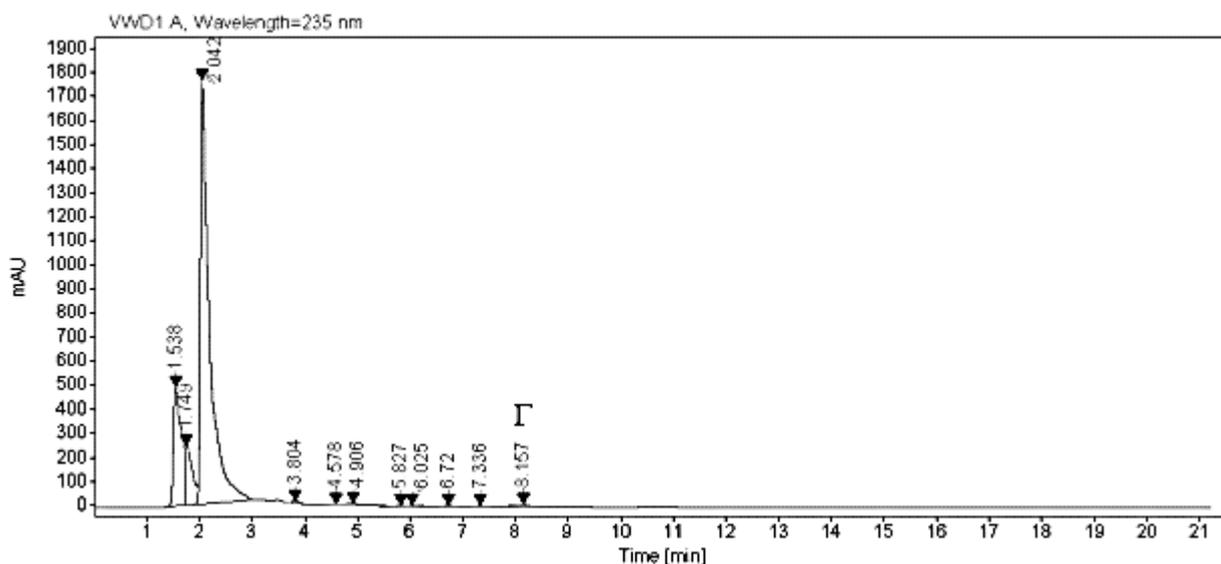


Рисунок 6 - Анализ лекарственного препарата «Кагоцел» в виде таблетки.
 НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 8:2,
 спектрофотометрический детектор с длиной волны 235нм,
 скорость потока 1мл/мин

Из хроматограмм видно, что пик госсипола в анализируемых веществах присутствует, и для определения его концентрации воспользовались методом абсолютной градуировки.

3.2. Определение концентрации

Так как госсипол в больших дозах и концентрациях может нанести вред организму, мы провели анализ наших фармацевтических препаратов, с целью соответствия их концентраций нормам. Для этого, мы по методу абсолютной калибровки построили кривую стандартного образца госсипола в координатах площадь пика - концентрация (рисунок 7).

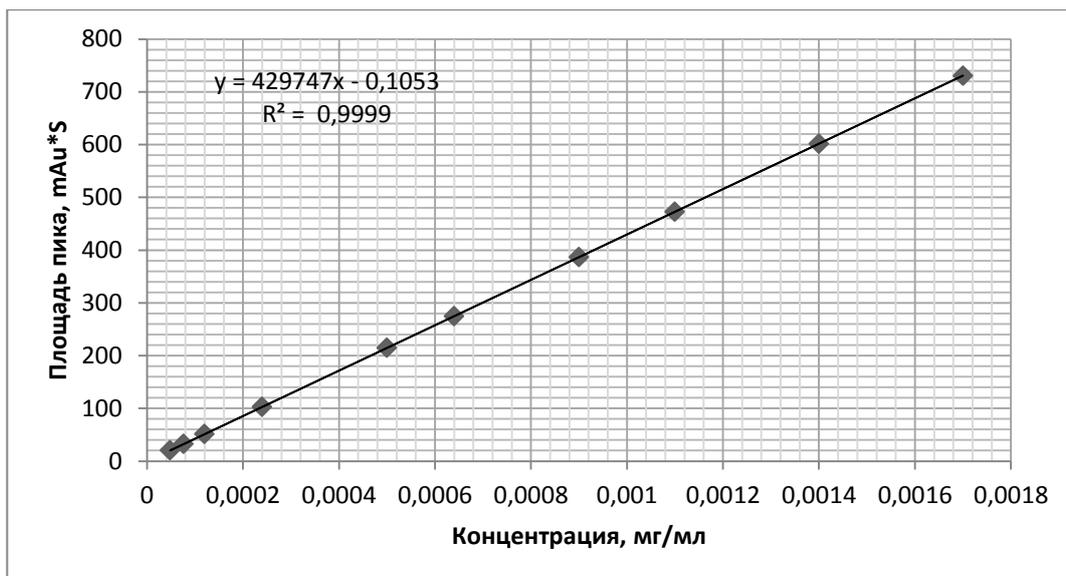


Рисунок 7 – Градуировочная кривая стандартного образца госсипола

По построенной кривой получили уравнение, подставляя в которое площади пика госсипола, мы определили его концентрацию в исследуемых лекарственных препаратах. Результаты анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты анализа госсипола в лекарственных препаратах.

Лекарственный препарат	Концентрация, мг/мл
«Рагосин»	0,00080 ± 0,00002
«Мегосин»	0,00250 ± 0,00006
«Кагоцел»	0,00040 ± 0,00001

По результатам анализа, можно сделать вывод, что все исследуемые ЛП соответствуют нормам. Минимальная токсическая доза госсипола 150

мг/кг. Предельно допустимое содержание примесей свободного госсипола в продуктах питания составляет 0,45–0,6 мг на 1 г продукта [89]. Наибольшая концентрация госсипола была обнаружена у ЛП «Мегосин», наименьшая у ЛП «Кагоцел».

Таким образом, метод гидрофильной ВЭЖХ может быть рекомендован для анализа образцов, содержащих госсипол.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе литературных данных были проанализированы возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ее гидрофильного варианта. Также были рассмотрены и изучены особенности структуры, химические свойства, биологическая роль госсипола и некоторые виды фармацевтических препаратов, содержащих госсипол и его производные.

Были подобраны условия гидрофильного хроматографического режима, и на примере лекарственного препарата «Кагоцел», показана возможность использования данного варианта ВЭЖХ для определения госсипола.

При помощи метода абсолютной градуировки, были определены концентрации госсипола в некоторых лекарственных препаратах. По результатам исследования наибольшая концентрация госсипола содержалась в ЛП «Мегосин», а наименьшая в ЛП «Кагоцел».

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Kupiec T., Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography// International Journal of Pharmaceutical Compounding.-2004.-№.3. - PP.223-227.
2. Masoom R. S., Zeid A. A., Rahman N., Analytical techniques in pharmaceutical analysis // Arabian Journal of Chemistry.-2013.-№.10.-PP.1409–1421.
3. John W., High-Performance Liquid Chromatography for Hormone Assay. In: Methods in Molecular Biology: Hormone Assays in Biological Fluids. Totowa, New Jersey.-2006.-Vol.324.-PP. 25-52.
4. Setinder A. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Elsevier Inc.: Setinder A., Michael W.Dong, 2005.
5. Malviya R., Bansal V., Pal O.P., Sharma P.K., High performance liquid chromatography: a short review // of Global Pharma Technology.-2010.-Vol.2.-№.5.-PP.22-26.
6. Y. Xiang, Y. Liu, M. L. Lee, Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature // Journal of Chromatography A.-2006.-Vol.1104.-№.1-2.-PP. 198–202.
7. Karewashi. Instrumental analysis and separations: normal-phase chromatography // Food Biochemistry.-2014.-PP.1-5.
8. Buszewski B., Noga S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique // Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2012. - PP. 231–247.
9. Jandera P. Liquid chromatography—normal phase. In: Encyclopedia of analytical science, 2nd edn. Elsevier, Oxford,-2005.-PP.142–152.
10. Aguilar M.I. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography // Methods in Molecular Biology: HPLC of Peptides and Proteins.-2004.-Vol.251.-PP. 9-22.
11. Willard H.H., Dean A.J. Instrumental Methods of Analysis. 7th ed. New Delhi: CBS Publishers and distributors.-1986.-PP. 513-515.

12. Connors AK. A Text Book of Pharmaceutical Analysis. 3rd ed. A Wiley Interscience publication. -2005. -PP. 373-400.
13. Ahuja S. High Pressure Liquid Chromatography. In: Ahuja S, Jespersen, editors. Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier;-2006.
14. Hemström P., Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography // Journal of Separation Science.-2006. - Vol. 29. -PP.1784–1821.
15. Oyler A.R., Armstrong B.L., Cha J.Y. et al. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis // Journal of Chromatography A.-1996.-Vol.724.-№.1-2.-PP.378–383.
16. Garbis S.D., Melse-Boonstra A., West C.E .et al. Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry // Analytical Chemistry.-2001.-Vol. 73.-№ 22.-PP. 5358–5364.
17. Olsen B.A. Hydrophilic Interaction Chromatography Using Amino and Silica Columns for the Determination of Polar Pharmaceuticals and Impurities // Journal of Chromatography A.- 2001.-Vol. 913.-PP. 113–122.
18. Li R., Huang J. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography // Journal of Chromatography A.-2004.-Vol.1041.-№ 1-2.-PP. 163-169.
19. Guo Y., Gaiki S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography // Journal of Chromatography A.-2005.–Vol.1074.-PP.71–80.
20. McCalley D.V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? // Journal of Chromatography A.- 2007.-Vol. 1171.-PP. 46–55.
21. Sandoval J.E., Pesek J.J. Synthesis and characterization of a hydride-modified porous silica material as an intermediate in the preparation of chemically bonded chromatographic stationary phases // Journal of Analytical Chemistry. -1989.-Vol. 61.-№.18. -PP. 2067–2075.

22. Alpert A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds // Journal of Chromatography A.-1990.-Vol.499.-PP. 177-196.
23. Vailaya A, Horváth Cs. Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? // Journal of Chromatography A.- 1998.-Vol. 829. – PP. 1–27.
24. Gritti F., Guiochon G. Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography // Journal of Chromatography A.-2005.-Vol.1099. –PP.1–42.
25. Dill K.A. The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography // Journal of Physical Chemistry A. –1987.-Vol.91.-PP. 1980–1988.
26. Ying P.T., Dorsey J.G., Dill K.A. Retention mechanisms of reversed-phase liquid chromatography: Determination of solute-solvent interaction free energies // Journal of Analytical Chemistry.-1989.-Vol.61.-PP. 2540–2546.
27. Wang H.L., Duda U., Radke C.J. Solution adsorption from liquid chromatography // Journal of Colloid and Interface Science. -1978.-Vol.66.-PP. 153–165.
28. Riedo F., Kováts E.S. Adsorption from liquid mixtures and liquid chromatography // Journal of Chromatography A.-1982.-Vol.239.-PP. 1–26.
29. Knox J.H., Pryde A. Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography // Journal of Chromatography A.-1975.-Vol.112.-PP. 171–188.
30. Naidong W. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases // Journal of Chromatography B.-2003.-Vol.796.-№.2.-PP. 209–224.
31. Yoshida T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review // Journal of Biochemical and Biophysical Methods.-2004.-Vol.60.-№.3.-PP. 265–280

32. Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., et al. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography // *Journal of Chromatography A*.-2008.-Vol.1184.-PP. 474–503.
33. Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K. et al. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates // *Journal of Chromatography A*.-1994.-Vol.676.-№.1.-PP.191-202.
34. Churms S.C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion // *Journal of Chromatography A*.-1996.-Vol.720.-№.1-2.-PP. 151–166.
35. Hao Z.G., Lu C., Xiao B.M. et al. Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature // *Journal of Chromatography A*.- 2007.-Vol.1147.-№.2.- PP. 165–171.
36. Strege M.A., Stevenson S., Lawrence S.M. Mixed-Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2000. –Vol.72.-№.19.-PP. 4629–4633.
37. Benedict CR, Martin GS, Liu J. et al. Terpenoid aldehyde formation and lysigenous gland storage sites in cotton: variant with mature glands but suppressed levels of terpenoid aldehydes // *Phytochemistry*.-2004.-Vol.65.- №.10.-PP. 1351–1359.
38. James A. Kenar. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives // *Journal of the American Oil Chemists' Society*.- 2006.-Vol.83, -№.4.-PP. 269–302.
39. Tian, X., Ruan, J., Huang, J. et al., Gossypol: phytoalexin of cotton // *Science China Life Sciences*.-2016. –Vol.59.-№.2.-PP.122–129.
40. Longmore, J. Cotton-Seed Oil: Its Colouring Matter and Mucilage, and Description of a New Method of Recovering the Loss Occurring in the Refining Process, *Journal Chemistry and Industry*.-1886.-Vol.5.-PP.200–206.
41. Marchlewski, L. Gossypol, ein Bestandtheil der Baumwollsamensamen // *Journal fur Praktische Chemie*.-1899.-Vol. 60.-PP.84–94.

42. Liu, J., C.R. Benedict, R.D. Stipanovic, Bell A.A. Purification and Characterization of S-Adenosyl-L-methionine: Des-oxyhemigossypol-6-O-methyltransferase from Cotton Plants. An Enzyme Capable of Methylating the Defense Terpenoids of Cotton, *Physiologia Plantarum*.-1999.-Vol.121.-PP.1017–1024.
43. Gershenzon J., Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world // *Nature Chemical Biology*.-2007.-Vol.3.-№.7.-PP.408-414.
44. Wang X., Howell C., Chen F. et al. Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant Chapter 6 // *Advances in Food and Nutrition Research*.-2009.-Vol.58.-PP. 215–263.
45. Juanjuan Y. Chemical modification and biological activity exploration of the natural product-gossipol, PhD Dissertation, Clemson University, 2010.
46. Ashraf M. A., Mahmood K., Wajid A. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Schiff Bases // *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*.-2011.-№.10.-PP.1–7.
47. Kalaivani S., Priya N. P., Arunachalam S. Schiff bases: facile synthesis, spectral characterization and biocidal studies // *The International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*.- 2012.-№.3.-PP. 219–223.
48. Zhang H.P., Wang X., Chen F. et al. Anticancer activity of limonoid from *Khaya senegalensis* // *Phytotherapy Research Journal* -2007. -Vol. 21. –PP. 731-734.
49. Stipanovich R.D., Bell A.A., Howell C.R. Spectral Identification of the Ketol Tautomer of Gossypol // *National Cotton Pathology Research*. –1973. –PP. 462-463.
50. Zhang M., Liu H., Tian Z. et al. Differential growth inhibition and induction of apoptosis by gossypol between HCT116 and HCT116/Bax (+/-) colorectal cancer cells // *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*. -2007. -Vol.34. -PP. 230-237.

51. Dao, V. T., Gaspard, C., Mayer, M. et al. Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds // *European Journal of Medical Chemistry*.-2000.-Vol.35.-PP. 805–813.
52. Balakrishnan K., Wierda W. G., Keating M. J., Gandhi V. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells // *Blood*.-2008.-Vol. 112.-№.5. -PP. 1971–1980.
53. Johnson P. W. M. New targets for lymphoma treatment // *Annals of Oncology*.-2008.-Vol. 19.-№.4. -PP. 56–59.
54. Wang X., Wang J., Wong S. C. H. et al. Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells // *Life Sciences*.-2000.-Vol. 67.-№.22. -PP.2663–2671.
55. Ping C., Li Z., Jing-Wen L. et al. Antitumor activity of gossypol polyphenol is mediated through apoptosis induction and sub-G1 cell cycle arrest in SEG-1 human esophageal cancer cell line // *Biomedical Research*.-2016.- Vol. 27.-№.2. -PP.419-423.
56. C. van Poznak, Seidman A. D., Reidenberg M. M. et al. Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial // *Breast Cancer Research and Treatment*.-2001.-Vol. 66.-№.2. -PP. 239–248.
57. Ye W., Chang H.-L., Wang L.-S. et al. Modulation of multidrug resistance gene expression in human breast cancer cells by (–)-gossypol-enriched cottonseed oil // *Anticancer Research*.- 2007.-Vol. 27. -№.1.–PP.107–116.
58. Jiang J., Slivova V., Jedinak A., Sliva D. Gossypol inhibits growth, invasiveness, and angiogenesis in human prostate cancer cells by modulating NF- κ B/AP-1 dependent- and independent-signaling // *Clinical and Experimental Metastasis*.-2012.- Vol. 29. -№.2.–PP.165–178.
59. Badawy S. Z. A., Souid A.-K., Cuenca V. et al. Gossypol inhibits proliferation of endometrioma cells in culture // *Asian Journal of Andrology*.-2007.-Vol. 9, -№.3 –PP. 388–393.
60. Ko C.-H., Shen S.-C., Yang L.-Y. et al. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells // *International Journal of Cancer*.-2007.-Vol. 121-№.8. –PP.1670–1679.

61. Chien C.-C., Ko C.-H., Shen S.-C. et al. The role of COX-2/PGE2 in gossypol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells // *Journal of Cellular Physiology*.-2012.-Vol. 227-№.8. –PP.3128–3137.
62. Hsiao W.-T., Tsai M.-D., Jow G.-M. et al. Involvement of Smac, p53, and caspase pathways in induction of apoptosis by gossypol in human retinoblastoma cells // *Molecular Vision*.-2012.-Vol. 18.-PP.2033–2042.
63. Wong F. Y., Liem N., Xie C. et al. Combination therapy with gossypol reveals synergism against gemcitabine resistance in cancer cells with high BCL-2 expression // *PLoS ONE*.-2012.-Vol. 7, -№.12 –PP.1-10.
64. Илькевич Н.С., Рыбаченко В.И., Шредер Г. и др. Антиоксидантные свойства госсипола и его некоторых имино-производных // *Наукові праці донецького національного технічного університету. Серія: "Хімія і хімічна технологія"*.-2009.-№13.-С.110-117.
65. Keshmiri-Neghab, H., Goliaei, B. Therapeutic potential of gossypol: An overview // *Pharmaceutical Biology*.-2014.-Vol. 52.-№. 1.-PP. 124-128.
66. Wang X, Beckham T, Morris J, et al. Bioactivities of Gossypol, 6-Methoxygossypol, and 6,6'-Dimethoxygossypol // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.-2008.-Vol. 56, .-№. 12.-PP. 4393–4398.
67. Li A, Bandy B, Tsang SS, Davison AJ. DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. *Free Radical Research*.-2000.-Vol.33.-PP. 551–566.
68. Dodou K, Anderson R.J., Lough W.J., et al. Synthesis of gossypol atropisomers and derivatives and evaluation of their antiproliferative and antioxidant activity // *Expert Opin Investig Drugs*.-2005.-Vol. 13.-PP. 4228–4237.
69. Черепович В.С, Волочник Е. В., Антоненко Е. В. и др. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности // *Медицинский журнал*.-2006.-№.2.-С.106-108.
70. Wang H., Cheng H., Wang F., et al. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the

viability of Escherichia coli cells // Journal of Microbiological Methods.-2010.-Vol. 82.-№ .3.-PP. 330-333.

71. Bahuguna A., Khan I., Bajpai V. K., et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug // Bangladesh Journal of Pharmacology.-2017.-Vol. 12.-№.2.-PP.115-118.

72. Kitada S., Leone M., Sareth S., et al. Discovery, characterization, and structure–activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins // Journal of Medicinal Chemistry.-2003.-Vol. 46.-PP.4259–4264.

73. Liu S., Kulp S.K., Sugimoto Y., et al. The (-)-enantiomer of gossypol possesses higher anticancer potency than racemic gossypol in human breast cancer // Anticancer Research.-2002.-Vol. 22.-PP.33–38.

74. Oliver C.L., Bauer J.A., Wolter K.G., et al. In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells // Clinical Cancer Research.-2004.- Vol.10.-PP.7757–7763.

75. Meng Y., Tang W., Dai Y., et al. Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa // Molecular Cancer Therapeutic.-2008.- Vol.7.-PP.2192–2202.

76. Xu L.Y., Wang S., Tang W., et al. (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer // Molecular Cancer Therapeutic.- 2005.-Vol. 4.-PP.197–205.

77. Arnold A. A., Aboukameel A., Chen J., et al. Preclinical studies of apogossypolone: A new nonpeptidic pan small-molecule inhibitor of Bcl-2, Bcl\XL and Mcl-1 proteins in follicular small cleaved cell lymphoma model // Molecular Cancer .-2008.-Vol.7.-PP.20–29.

78. Hu Z.Y., Zhu X. F., Zhong Z. D., et al. ApoG2, a novel inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 family proteins, induces apoptosis and suppresses tumor growth in nasopharyngeal carcinoma xenografts // International Journal of Cancer.-2008.-Vol.123.-PP. 2418–2429.

79. Vander Jagt D. L., Deck L. M., Royer R. E. Gossypol: Prototype of inhibitors targeted to dinucleotide folds // *Current Medicinal Chemistry*.-2000.-Vol.7.-PP. 479–498.
80. Razakantoanina V., Nguyen Kim P.P., Jaureguiberry G. Antimalarial activity of new gossypol derivatives // *Parasitology Research*.-2000.-Vol.86.-PP. 665–668.
81. Kuk M.S., Tetlow R., Dowd M.K. Cottonseed extraction with mixtures of acetone and hexane // *Journal of the American Oil Chemists Society*.-2005.-Vol.82.-№.8.-PP. 609-612.
82. Karishma R., Lakshmi Sahithya U., Suneetha P., et al. Determination of Total Gossypol and Free Gossypol Content in different varieties of Bt and Non Bt Cotton seed extracts by High- Performance Liquid Chromatography (HPLC) // *Research journal of biotechnology*.-2016.-Vol.11.-№.2.-PP.70-74.
83. Chandrashekar R., Karunakar Rao Kudle, P.Jyothi Chaitanya, N.Lakshmi Bhavani. Gossypol Analysis in Bt and Non-Bt Cotton Seed Extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) // *International Journal of Herbal Medicine*.-2013.-Vol.1.-№.2.-PP.53-58.
84. Alexander J., Benford D., Cockburn A., et al. Gossypol as undesirable substance in animal feed // *European Food Safety Authority Journal*.-2008.-Vol.908.-PP.1-55.
85. Lee K-J, Dabrowski K. High-performance liquid chromatographic determination of gossypol and gossypolone enantiomers in fish tissues using simultaneous electrochemical and ultraviolet detectors // *Journal of Chromatography B*.-2002.-Vol.779.-PP.313-319.
86. Dowd M. K., Pelitire S. M. HPLC preparation of the chiral forms of 6-methoxy-gossypol and 6, 6'-dimethoxy-gossypol // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*.-2008.-Vol.867.-PP. 69–77.
87. Coward L., Gorman G., Noker P., et al. Quantitative determination of apogossypol, a pro-apoptotic analog of gossypol, in mouse plasma using

LC/MS/MS // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.-2006.-Vol.42.-
PP.581-586.

88. Jia L., Coward L.C., Kerstner-Wood C.D., et al. Comparison of pharmacokinetic and metabolic profiling among gossypol, apogossypol and apogossypol hexaacetate // Cancer Chemotherapy and Pharmacology.-2008.-
Vol.61.-PP.63-73.

89. Киселева И.В., Рудой Б.А., Пирогов А.В. и др. Валидация ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел» // Фармация.-
2016.-№8.-С.18-24.