

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

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)
04.03.01 «Химия»
(код и наименование направления подготовки, специальности)
«Медицинская и фармацевтическая химия»
(направленность(профиль)/ специализация)

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему Возможности гидрофильной хроматографии в анализе
фармацевтических препаратов, содержащих ионогенные вещества

Студент	Т.А. Фролова (Вагина)	
	_____ (И.О. Фамилия)	_____ (личная подпись)
Руководитель	О.Б. Григорьева	
	_____ (И.О. Фамилия)	_____ (личная подпись)
Консультанты	Е.Ю. Аношина	
	_____ (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)

« _____ » _____ 2018 г.

Тольятти 2018

АННОТАЦИЯ

Данная бакалаврская работа изложена на 46 страницах, включает в себя 12 таблиц и 18 рисунков. Список литературы представлен 72 источниками.

В работе объектами исследования являются ионогенные вещества, входящие в состав некоторых лекарственных препаратов.

Цель работы - определение возможности гидрофильной хроматографии в анализе фармацевтических препаратов, содержащих ионогенные соединения.

В литературном обзоре рассмотрены особенности строения ионогенных соединений и анализ веществ, содержащих ионогенные формы методом спектрофотометрии и хроматографии. Особое внимание уделено гидрофильной хроматографии.

В экспериментальной части приводятся объекты и методики проводимого хроматографического анализа.

В обсуждениях результатов рассматриваются полученные хроматографические данные. Подобраны оптимальные условия для проведения анализа ионогенных веществ, а также проведено разделение лекарственных форм, содержащих ионогенные соединения. Следовательно, можно сделать вывод, что в работе показаны хорошие перспективы в использовании гидрофильной хроматографии в анализе многокомпонентных фармацевтических препаратов.

ABSTRACT

This work is presented on pages, includes 12 tables and 18 figures. The list of references is presented 72 by sources. In this work, the object of research are drugs containing ionogenic substances. The aim of the work is to determine the possibility of hydrophilic chromatography in the analysis of pharmaceuticals containing ionogenic compounds. In the literature review, the features of the structure of ionogenic compounds and the analysis of substances containing ionogenic forms by spectrophotometry and chromatography are considered. Special attention is paid to hydrophilic chromatography.

The experimental part contains objects and methods of chromatographic data are considered in the discussions of the results. The optimal conditions for the analysis of ionogenic substances were chosen, and the separation of dosage forms containing ionogenic compounds was carried out. Therefore, it can be concluded that the paper shows good prospects in the use of hydrophilic chromatography in the analysis of multicomponent pharmaceuticals.

Содержание

Введение.....	6
1. Литературный обзор.....	7
1.1. Понятие об ионогенных соединениях. Особенности их строения и поведения в растворе.....	7
1.1.1. Влияние природы растворителя.....	10
1.1.2. Влияние pH раствора.....	11
1.2. Ионогенные соединения в составе фармацевтических препаратов.....	12
1.3. Особенности анализа веществ, содержащих ионогенные формы.....	13
1.3.1. Спектрофотометрический анализ.....	13
1.3.2. Хроматографические методы анализа.....	15
1.4. Гидрофильная ВЭЖХ.....	17
2. Экспериментальная часть.....	19
2.1. Реагенты и оборудование.....	19
2.2. Методики экспериментов.....	20
2.2.1. Снятие УФ спектров.....	20
2.2.2. ВЭЖХ.....	21
2.2.3. Метод количественного определения.....	22
3. Обсуждение результатов.....	23
3.1. УФ спектров исследуемых соединений, влияние pH.....	23
3.2. Выбор неподвижной фазы.....	24
3.3. Анализ некоторых фармацевтических форм, содержащих ионогенные вещества.....	29
3.4. Количественное определение парацетамола, ацетилсалициловой кислоты, и кофеина.....	33
Заключение.....	37
Список используемой литературы.....	38

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография.
ПАВ	Поверхностно-активные вещества
УФ	Ультрафиолетовый
ПФ	Подвижная фаза
НФ	Неподвижная фаза
ФП	Фармацевтический препарат
ЛВ	Лекарственное вещество
ГЖХ	Газожидкостная хроматография
НФХ	Неподвижно-фазовая хроматография
ОФХ	Обращенно-фазовая хроматография
ИОХ	Ионообменная хроматография
ДИРФ режим	Режим динамически-индуцированного раздела фаз

Введение

На сегодняшний день значимой является разработка и усовершенствование методов, которые нужны для количественного и качественного анализа лекарственных веществ, биологически активных веществ и др. Для повышения качества и безопасности продукции в фармацевтической индустрии используются современные методы анализа, чаще всего это хроматографические методы, имеющие множество преимуществ, таких как: быстрота, эффективное разделение, высокая чувствительность.

Все больше появляется исследований, посвященных гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Комбинирование полярной неподвижной фазы, модифицирующей молекулами воды, с полярной неподвижной фазой увеличивает удерживание водорастворимых объектов.

Целью нашей работы является определение возможности гидрофильной хроматографии в анализе фармацевтических препаратов, содержащих ионогенные вещества.

В связи с поставленной целью в задачи работы входило:

- проанализировать литературные данные, связанные с особенностями анализа ионогенных веществ, фармацевтическими препаратами, которые содержат подобные структуры, достоинствами и недостатками методов ВЭЖХ в ионогенных соединениях.

- исследовать ряд ионогенных соединений, входящих в состав фармацевтических препаратов методом ВЭЖХ, выявить влияние природы неподвижной фазы, состава и pH элюента на их хроматографическое поведение

- показать преимущество использования таких соединений, как кофеин, парацетамол и ацетилсалициловая кислота в анализе фармацевтических препаратов гидрофильного режима хроматографии

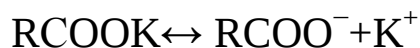
- провести валидацию предложенной методики определения.

1. Литературный обзор

1.1. Понятие об ионогенные соединениях. Особенности их строения и поведения в растворе.

Сегодня проблема стабилизации лекарственных препаратов является одной из самых актуальных. В качестве стабилизаторов можно использовать диспергаторы, загустители, поверхностно-активные вещества и др. Чаще всего используют ПАВ, из-за их полифункциональности. По своему строению они будут являться дифильными, то есть обладают сродством к веществам, имеющим разную природу [1]. А по способности к диссоциации ПАВ делятся на ионогенные и неионогенные. Ионогенные поверхностно-активные вещества диссоциируют в воде на ионы, одни из которых проявляют поверхностную активность, а другие являются не активны [2]. Ионогенные ПАВ бывают:

1) Анионные – диссоциируют на ионы, имеющие отрицательный заряд:



Чаще всего встречаются калиевые, кальциевые, натриевые мыла. Также, распространены лаурилсульфаты, соли высших жирных кислот, бензамидазосульфаты и т.д., использующиеся в производстве моющих средств.

Таблица 1 - Примеры анионных ПАВ.

Классы химических соединений	Строение
Na-соль первичных алкилсульфатов	$\text{R-CH}_2\text{-OSO}_3\text{Na}$
Соли высших жирных кислот	RCOONa
Вторичные алкилсульфаты	$\text{R}_1\text{-R}_2\text{-CH-OSO}_3\text{Na}$
Вторичные алкилсульфонаты	$\text{R}_1\text{-R}_2\text{-CH-SO}_3\text{Na}$
Алкилбензолсульфонаты	$\text{R-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3\text{Na}$

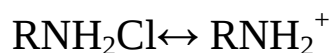
К анионактивным ПАВ относят камеди (абрикосовая, аравийская, сливовая и др.), пектиновые вещества, калиевые, кальциевые, магниевые и других полиуроновых кислот, мыла, также важна натриевая соль альгиновой кислоты и др.

Пектиновые вещества содержатся в клеточных стенках большинства растений. Желатинирующая способность пектинов является его важным свойством. Пектин перспективен для изготовления детских лекарственных форм. Пектины широко используются в пищевой и фармацевтической промышленности [3].

Соли таких кислот как стеариновая, олеиновая и др. называются мылами. Водорастворимыми являются калиевые, аммониевые и натриевые мыла, которые образуют эмульсии типа «масло-вода». Натриевое мыло является медицинским и применяют его для стабилизации эмульсии бензилбензоата. А аммониевые мыла применяют для стабилизации аммиачного линимента.

Нерастворимыми в воде являются магниевые и кальциевые мыла, которые образуют эмульсии типа «вода-масло». Их используют в качестве эмульгаторов для мазей.

2) Катионные – при диссоциации образуют положительно заряженные катионы:



К ним относятся аммониевые соли, различной степени замещения. Например, соли первичных аминов, соли вторичных аминов, фосфониевые соединения и т.д.

Таблица 2 - Примеры катионных ПАВ.

Классы химических соединений	Строение
Соли первичных аминов	$[R-NH_3]^+ A^-$
Четвертичные аммониевые соли	$[R-N-(R_1, R_2, R_3)]^+ A^-$
Сульфониевые соединения	$[R-S-(R_1, R_2)]^+ A^-$
Фосфониевые соединения	$[R-P-(R_1, R_2, R_3)]^+ A^-$

К положительно заряженным ПАВ относятся четвертичные аммониевые соли (катамин АБ, бензалконий хлорид). Чаще применяются как консерванты, а не как ПАВ из-за их токсичности.

3) Амфотерные – ведут себя как катионные или анионные в зависимости от условий среды.

В кислой среде проявляют катионную активность:



А в щелочной – анионную:



Амфотерными ПАВ обычно являются соединения, содержащие одновременно несколько функциональных групп:



Амфотерные ПАВ включают бетаины, бентониты, глины, лецитин, белки и т.д.

В производстве фармацевтической продукции используются катионные ПАВ, так как они включают в себя бактерицидные и поверхностно-активные свойства [4].

1.1.1. Влияние природы растворителя

Голубицкий Г.Б. и его соавторы провели исследования и показали, что не всем ионогенным соединениям типа кодеина подходит элюент ацетонитрил: вода. Чтобы эти вещества элюировались вводят в подвижную фазу фосфатный буфер. Использование ацетатного буфера ограничено, поскольку в этом случае УФ-детектирование в области ниже 230 нм становится невозможным [5-7]. Буферные растворы цитрата используются еще реже [8,9].

Но также есть мнение, что фосфатный буфер в составе элюента не влияет на удерживание, а зависит от типа обращено-фазовых сорбентов. Например, сравнивали характер влияния дигидрофосфата калия на удерживание ионогенных веществ на Nova Pak C18 и Symmetry C18 фазах [10]. Удерживание кофеина, фенobarбитала и продуктов разложения анальгина почти не зависит от концентрации дигидрофосфата калия. Удерживание напроксена, кодеина и, в частности, анальгина зависит от концентрации фосфатного буфера в подвижной фазе. С увеличением концентрации соли, удерживание кодеина уменьшается, а удерживание напроксена увеличивается. Эта разница в хроматографических свойствах обусловлена их состоянием при pH 5,9: в подвижной фазе анальгин и напроксен встречаются в элюате в виде анионов, тогда как кодеин - в виде катионов. При увеличении ионной силы подвижной фазы, удержание катионов уменьшается, а удержание анионов увеличивается.

Голубицкий выявил преимущества использования полярного сорбента [11,12]. Они заключаются в том, что удерживание гидрофобных веществ уменьшается, и фактор ионной силы подвижной фазы, которая содержит буфер, используется более полно. И в дальнейшем, у компонентов, сильно различающихся по свойствам, есть вероятность одностадийного определения, и возникает сближение характеристик удерживания.

1.1.2. Влияние pH раствора

В удерживании анализируемых соединений, а также в разделении многокомпонентных лекарственных средств значение pH элюента играет большую роль. Значение pH подвижной фазы должно быть определенным, так как большинство лекарственных препаратов имеют кислотный или основной характер. При не высоком значении pH подавляется ионизация кислотных компонентов и оптимизируется удерживание в системе с обращенной фазой. Большинство анализов проводят при pH 2,5-5,0. Не рекомендуется использовать растворы с $\text{pH} > 8$ на колонках с силикагелем, потому что он разлагается. Некоторые адсорбенты стабильны в щелочных средах. Один из этих адсорбентов использовали для отделения шести фармацевтических компонентов при pH 8,0 и 10,6; эффективность не уменьшалась [13]. Смеси аминостигмина и флюацизин анализировали в щелочной среде (pH 9,5).

Чтобы изменить термодинамические свойства хроматографической системы, к подвижной фазе добавляют конкретные модификаторы в небольших количествах (0,01-2%). Например, использование диэтиламина позволило разделить все четыре компонента препарата каффетин [14]. Кислотные добавки подавляют активность остаточных силанольных групп и улучшают форму пика.

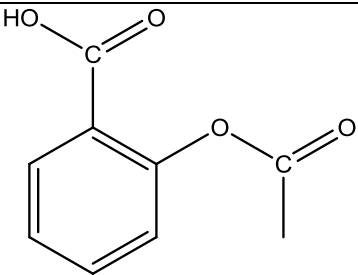
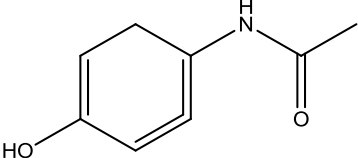
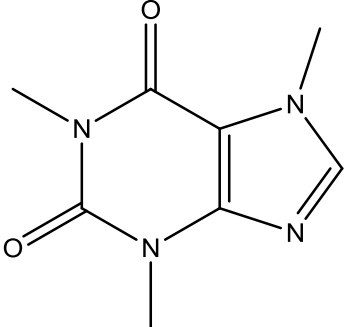
Помимо этого, используют градиент pH подвижной фазы. Так, например, для препарата максиколд из-за содержания в составе сложных вспомогательных веществ, ученые предложили методику, которая основана на раздельном определении компонентов двумя разными способами. Первым методом являлось титрование, а вторым – ион-парная ВЭЖХ. Но, так как этот процесс затратный и длительный, доктор химических наук Голубицкий и его соавторы Иванов И.В., Иванов В.М., Басова Е.М. предложили использование градиента pH подвижной фазы, что значительно ускорило процесс и увеличило воспроизводимость результатов. Градиент pH ПФ включает в себя

последовательную смену одного элюента с одной pH, на другой элюент с другой pH. Его используют при разделении многокомпонентного препарата, когда невозможно при одной и той же pH разделить одновременно несколько компонентов одного и того же препарата [15].

1.2. Ионогенные соединения в составе фармацевтических препаратов.

К ионогенным веществам можно отнести большое количество соединений. К ним также относятся лекарственные средства – кофеин, эфедрин, напроксен, аспирин и т.д. в составе различных фармацевтических препаратах –пенталгин, беллалгин, аскофен и др [16]. В нашей работе мы будем рассматривать препарат «Кофицил плюс», содержащий кофеин, аспирин и парацетамол.

Таблица 3 - Химические формулы лекарственных средств

Лекарственное средство	Химическое название	Химическая формула	Структурная формула
Аспирин	2-ацетокси-бензойная кислота	$C_9H_8O_4$	
Парацетамол	N-(4-Гидроксифенил)ацетамид.	$C_8H_9NO_2$	
Кофеин	1,3,7-триметил-ксантин.	$C_8H_{10}N_4O_2$	

Совокупность этих лекарственных веществ являются ненаркотическими анальгетиками и являются очень распространенными. Все они борются с воспалением, жаром и болью [17]. Кофеин возбуждает дыхательные центры и уменьшает слипание тромбоцитов. В малой дозе кофеин почти не стимулирует нервную систему, но ускоряет циркуляцию крови и приводит к нормализации тонуса сосудов мозга. Парацетамол оказывает слабое противовоспалительное и жаропонижающее действие. Аспирин ослабляет боль, вызванную воспалительным процессом, и обладает жаропонижающим действием [18]. Изменив дозировку, можно изменить направление действия это и является главным свойством, на которое обращают внимание при выборе ФП.

1.3. Особенности анализа веществ, содержащих ионогенные формы.

1.3.1. Спектрофотометрические методы анализа

Спектрофотометрические методы широко распространены в анализе фармацевтических препаратов и имеют ряд достоинств. Например, точность, доступность, дешевизна, простота использования, определение многокомпонентного препарата, заранее не разделенного [19-29].

Широко распространен метод прямой спектрофотометрии, которые относятся к спектрофотометрии в УФ области спектра.

За последнее время очень много разработано методик определения ФП по их УФ спектрам поглощения [30-35]. Для препаратов, которые содержат в своем составе одно активное вещество, например, аспирин [36], анальгин [31], новокаин [32] и т.д., применим такой способ определения по собственному светопоглощению, на определенно выбранных аналитических длинах волн.

Существует такой метод Фирордта, который используют, когда спектры являются перекрывающимися. Этот метод используют как в России [21-25, 32-35], так и за границей [26-31]. Он применим, когда в составе препарата имеется два активных ЛВ (например, кофеин и парацетамол [37]).

Известно, что метод Фирордта был использован и для определения трех активных ионогенных веществ в препаратах аскофен, «Кофицил плюс» [24,25,38].

Для определения одного, двух и реже трех активных компонентов можно использовать метод производной спектрофотометрии. Он исключает влияние так называемых примесей, содержащихся в ФП, за счет регистрации производных [39].

Стоит сказать и про спектрофотометрию в видимой области спектра. Большинство лекарственных препаратов не поглощаются в видимой области. Поэтому проводят фотометрические реакции для окрашивания этих веществ. Хотя они и являются более сложными методиками, но широко и долгое время используются в фармацевтическом анализе. Для ионогенного вещества, парацетамола была предложена методика определения, основанная на реакции с диазолом алым 2Ж [40].

Т. Аман и его соавторы [41] определяли индометацин, а в роли реагента использовали молибдат аммония. Преимуществом этого определения являлось то, что остальные компоненты этого препарата не были затронуты и не оказывали никакого влияния на определение, ну и, конечно же, малая погрешность результата.

Кроме того, в последнее время стала чаще использоваться методика экстракционно-фотометрического анализа фармацевтических препаратов димедрола и папаверина [42], анальгина [43, 44], пентоксифиллина и др.

В статье [45] была описана методика определения не лекарственных компонентов, а примесей, содержащихся в препарате.

Украинский ученый А. И. Гризодуба и его соавторы [46-48] описали методику валидации спектрофотометрических методов анализа ЛС.

1.3.2. Хроматографические методы анализа.

Создание многокомпонентного препарата, имеющего высокую эффективность, является одной из основных проблем современной фармакологии и фармацевтики; поэтому, точная оценка качественного и количественного состава препаратов очень важна.

Анализ многокомпонентных смесей спектрофотометрическим методом сложен; он включает множество независимых процедур для определения отдельных компонентов и, следовательно, является трудоемким. Современные хроматографические методы - хроматографическая масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая и тонкослойная хроматография широко используются для изучения чистоты, однородности, и стабильности промышленной продукции. ВЭЖХ является идеальным методом для изучения чистоты и качества фармацевтических препаратов, особенно в случаях, когда газожидкостная хроматография не подходит из-за недостаточной термической стабильности компонентов. Поэтому ВЭЖХ, а не ГЖХ, широко используется для контроля качества продуктов в большинстве фармацевтических компаний.

Также есть случаи использования НФХ, но их очень мало. Чаще всего используется ОФХ. Некоторые смеси фармацевтических препаратов промежуточного полярного соединения могут быть проанализированы как в нормальной фазовой, так и в обращенной фазовой хроматографии [49-50]; К тому же, нормально-фазный режим может использоваться для определения высокополярной молекулы, которые имеют низкое удержание в обратно-фазном режиме [51].

В ионообменной ВЭЖХ смесь разделяется, поскольку взаимодействия между ионизируемыми веществами и ионными группами адсорбента обратимы. Противомаларийные препараты, антидепрессанты и сердечно-сосудистые ЛВ [52] анализировали с использованием силикагеля с иммобилизованными ионогенными группами, тогда как четыре тетрациклина

(гидрокситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин, и доксициклин) были разделены с применением полимерного катионита [53]. Флюклоксациллин и амоксициллин определяли в растворе для инъекций с использованием изократического элюирования [54]. Недостатками ИО адсорбентов является их меньшая эффективность, меньшая стабильность, и меньшая воспроизводимость, по сравнению с ОФ адсорбентами.

Большинство из них можно разделить с помощью ионно-парной хроматографии, которая является промежуточной между ИОФ, адсорбционной хроматографии [55]. Метансульфоновая и этансульфоновая кислоты, пентансульфонат натрия [56], используют в качестве противоионов для компонентов основного характера; тетраметиламмония [56] и соли тетрабутиламмония [57, 58] используют для компонентов кислотного характера.

Так же известны и другие хроматографические методы количественного анализа многокомпонентных препаратов. Такие авторы, как Голубицкий Г.Б., Будко Е.В. и Иванов В.М. предложили две методики (на примере Пенталгина) с использованием изократической [10, 11] и градиентной ВЭЖХ и сравнили полученные результаты. Преимущества изократического режима заключаются в использовании более простых и недорогих инструментов и в менее жестких требованиях, предъявляемых к качеству воды и органических растворителей, которые будут использоваться для подготовки ПФ. А использование градиентного элюирования для количественного анализа имеет практический и научный интерес. В градиентном режиме вещества с коэффициентами мощности, различающимися в тысячах, могут быть эффективно разделены за несколько минут, можно улучшить пиковые формы и повысить чувствительность определения. Обе методики обеспечивают достоверные результаты анализа, но изократический вариант предпочтительнее при контроле продуктов серийного производства как технически более простой.

Так же Голубицкий и его соавторы исследовали хроматографические свойства ионогенных соединений, содержащихся в препарате аскофен, на сорбентах с привитыми нитрильными группами [12]. Изучили влияние концентрации ацетонитрила, фосфата калия в подвижной фазе и pH подвижной фазы на удерживание названных компонентов, а также вероятной примеси салициловой кислоты. По сравнению с ранее использовавшейся колонкой в серийном анализе с сорбентом C18 полученные хроматограммы характеризуются более высокой эффективностью разделения, а предлагаемая методика экономичнее и экспресснее [59].

1.4. Гидрофильная хроматография.

Последнее время популярностью пользуется гидрофильная хроматография. Термин «хроматография за счет гидрофильного взаимодействия» появился в 1990 году, но сам режим гидрофильной хроматографии использовали и ранее при этом приписывая ему другие названия или вовсе оставляя без него. Например, Сапрыкин выдвигал гидрофильную хроматографию под названием динамически-индуцированный раздел фаз [60, 62]. В ДИРФ автор варьировал селективность силикагеля, в режиме динамического индуцирования. Этот режим используют и сейчас его сущность заключается в увеличении концентрации неорганического соли, например, дигидрофосфата калия в водной части ПФ. Гидрофильная хроматография получила известность из-за сочетания масс-спектроскопического детектирования с жидкостной хроматографии [61].

По своей сущности она является НФ и применяется для разделения высокополярных и водорастворимых соединений. Например, лекарственных вещества, органические кислоты, бетаины, аминокислоты, сахара, полипептиды и гликозиды [63-68]. Гидрофильные соединения имеют слабое удерживание на неполярных фазах. Чтобы увеличить время удерживания и

получить хорошее разделение используют ион-парную хроматографию, но тогда работа масс-спектрометрического детектора нарушается из-за ион-парных модификаторов, в этом случае на помощь приходит гидрофильная хроматография.

Особенностью гидрофильной хроматографии является механизм разделения компонентов [69]. Подвижной фазой служит ацетонитрил с добавлением воды или буферного раствора [70]. Подготовка ПФ включает в себя следующие действия: приготовление элюента в нужных пропорциях и его дегазирование.

Существует критическая концентрация в водной фазе, выше которой ацетонитрил и водная фаза не смешиваются между собой. С увеличением количества ацетонитрила в смеси уменьшается концентрация неорганической соли и смесь расслаивается на две фазы: ацетонитрил и водно-солевой раствор.

В качестве элюента также можно применять спирты, но для достижения лучшего удерживания требуется большая концентрация по сравнению с водой и другими апротонными растворителями [71].

Чтобы выбрать подходящий растворитель, используют следующий элюотропный ряд: вода > метанол > ДМФА > диоксан > этанол > ацетонитрил > пропанол [72].

Не смотря на все это, гидрофильный режим хроматографии и его закономерности до сих пор остаются не до конца изученным. Даже специалист не сможет быстро и точно сказать какое вещество будет удерживаться, а какое нет.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Оборудование, реагенты и объекты исследования.

Оборудование:

1. Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы AgilentTechnologies 1220
2. Хроматографический шприц Agilent 1220
3. Колонка хроматографическая ZORBAX EclipsePlus C18 (4.6×100мм), произведена в Agilent
4. Колонка хроматографическая ZORBAX NH2 (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. Иономер лабораторный И-160М
9. Спектрофотометр Unicо 2800

Реагенты:

1. Ацетонитрил для ВЭЖХ, марки MacronFineChemicals
2. Дистиллированная вода
3. Дигидрофосфат калия, х.ч.
4. Фосфорная кислота, х.ч.
5. Гидроксид натрия, х.ч.

Объекты исследования:

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

Ацетилсалициловая кислота в виде таблеток, производитель Мега Фарм, Россия

Кофеин в виде таблеток, производитель Татхимфармпрепараты, Россия

«Кофицил плюс» в виде таблеток, производитель Фармстандарт, Россия

2.2. Методики экспериментов

2.2.1. Снятие УФ спектров.

В данной работе для информации о длине волны пользовались спектрофотометром Unicо 2800. Принцип его работы основан на поочередном пропускании монохроматического потока излучения через контрольный и измеряемый образец. Сначала включили прибор и подготовили его к работе путем выполнения определенного алгоритма. Поместили кювету с раствором «нулевой» концентрации в держатели обоих каналов кюветного отделения. Выбрали нужный режим измерения оптической плотности - режим поглощения. Поместили кювету с раствором «нулевой» концентрации в держатели обоих каналов. Затем поместили кювету с изучаемым раствором в держатель образца кюветного отделения. При этом на экране появится измеренное значение. В качестве раствора " нулевой" концентрации использовали раствор дигидрофосфат калия. А в качестве изучаемого раствора использовали навеску аспирина (кофеина, парацетамола) растворенного в дигидрофосфате калия.

Варьировали рН раствора дигидрофосфата калия для изучения влияния рН.

Снятие спектра поглощения в ультрафиолетовой области спектра осуществляли в диапазоне длин волн 220-360 нм в кварцевой кювете с толщиной измеряемого слоя 10 мм.

2.2.2. ВЭЖХ

После снятия спектров приступили к хроматографическому анализу ионогенных соединений, который выполняли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220 в гидрофильном режиме. Анализы проводились в следующих условиях: скорость потока - 0,6 мл/мин, аналитические длины волн определены с помощью УФ спектрофотометра и представлены в таблице 4.

Таблица 4. Длины волн, соответствующие максимумам поглощения ионогенных соединений.

Ионогенные соединения	Длина волны
Аспирин	272 нм
Парацетамол	250 нм
Кофеин	273 нм

Для пробоподготовки лекарственного вещества брали точные навески с помощью аналитических весов и разбавляли раствором дигидрофосфата калия до нужной метки, встряхивали и потом обрабатывали ультразвуком 5 минут.

Затем для анализируемых соединений подбирали условия. Сначала прокалывали парацетамол на колонках ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (4.6 × 100мм), ZORBAX NH2 (4.6 × 150мм) и ZORBAX RX-SIL (4.6 × 150мм) в качестве элюента брали ацетонитрил марки MacronFineChemicals с дистиллированной водой в соотношении 2:8. Сравнивали симметричность пиков и времена удерживания, и выбрали оптимальную колонку. Далее определили pH дигидрофосфата калия. Для приготовления раствора с pH 3, 7, 11 использовали фосфорную кислоту и гидроксид натрия. Измеряли pH на иономере И-160М. После чего последовательно прокалывали парацетамол, в

качестве элюента служила смесь ацетонитрил: вода, в соотношении 2:8. Оценивали форму пиков и времена удерживания.

Повторили этот алгоритм подбора для таких лекарственных средств, как аспирин и кофеин.

После чего выбрали оптимальные условия и прокалывали лекарственные вещества на колонке ZORBAX RX-SIL (4.6 × 150мм), в качестве элюента использовали ацетонитрил: вода в соотношении 2:8, pH буферного раствора составил 11.0

Затем в подобранных условиях прокалывали фармацевтический препарат «Кофицил плюс», содержащий парацетамол, кофеин и аспирин и наблюдали разделение пиков компонентов.

2.2.3. Метод количественного определения.

Строили градуировочную кривую для количественного определения содержания ионогенных соединений в фармацевтическом препарате «Кофицил плюс». Определили концентрацию каждого из компонентов, которая подтвердила, что препарат соответствует нормам.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. УФ спектры исследуемых соединений, влияние pH

В задачи работы входило определение возможностей гидрофильной хроматографии в анализе фармацевтических препаратов, содержащих ионогенные вещества и подбор оптимальных условий для разделения фармацевтического препарата на компоненты.

Для исследованных в работе соединений были сняты УФ-спектры для нескольких значений pH (pH=3, pH=7 и pH=11) в растворе и представлены в таблице 5.

Таблица 5 - УФ спектры для ЛС.

Лекарственное вещество	Значение pH	Длина волны
Аспирин	3	245нм
Аспирин	7	223нм
Аспирин	11	272нм
Кофеин	3	273нм
Кофеин	7	276нм
Кофеин	11	273нм
Парацетамол	3	244нм
Парацетамол	7	245нм
Парацетамол	11	250нм

Согласно полученным данным были зарегистрированы различные максимумы для растворов с разными значениями pH. Это еще раз доказывает, что ионогенные вещества, такие как парацетомол, кофеин и ацетилсалициловая кислота, присутствуют в растворах в различной форме. Для растворов данных соединений с указанными выше значениями pH были определены величины хроматографического удерживания. Как следует из полученных хроматограмм, отличие в формах существования находят

отражение и в форме пика, и в величинах удерживания. Оптимальным был выбран пик соединения, соответствующего его форме в щелочной среде, но поскольку данное значение pH в элюенте не приемлемо для многих неподвижных фаз, данное значение среды создавали непосредственно в пробе сорбата.

3.2 Выбор неподвижной фазы

Для начала, на разных колонках мы проводили вкалывание отдельных компонентов (аспирин, кофеин, парацетамол), которые содержатся в препарате «Кофицил плюс». Сначала использовали колонку ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (4.6 × 100мм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил: вода в соотношении 2:8. Для парацетамола брали длину волны равную 250нм, для кофеина- 273нм, а для аспирина длина волны составила 272нм. На рисунках 1-3 приведены хроматограммы анализируемых компонентов.

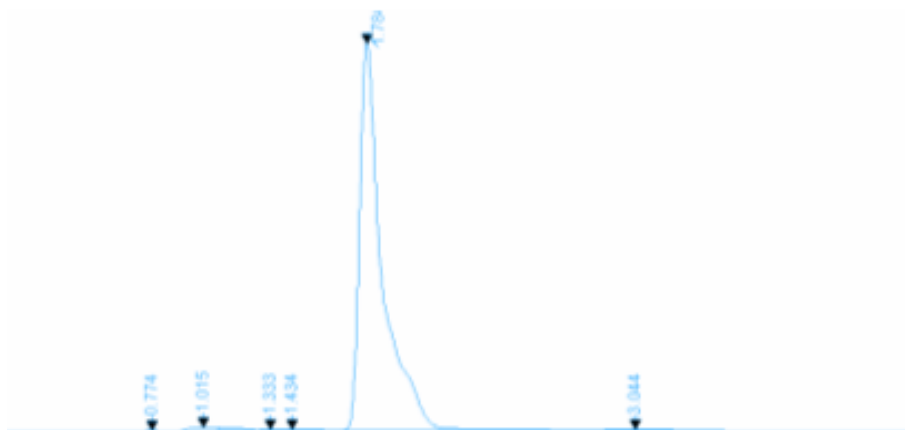


Рисунок 1 - Хроматограмма, полученная на колонке с октадецилсиликагелем (C18) (4.6×100мм). ЛВ-парацетамол. Элюент ацетонитрил: вода 2:8.

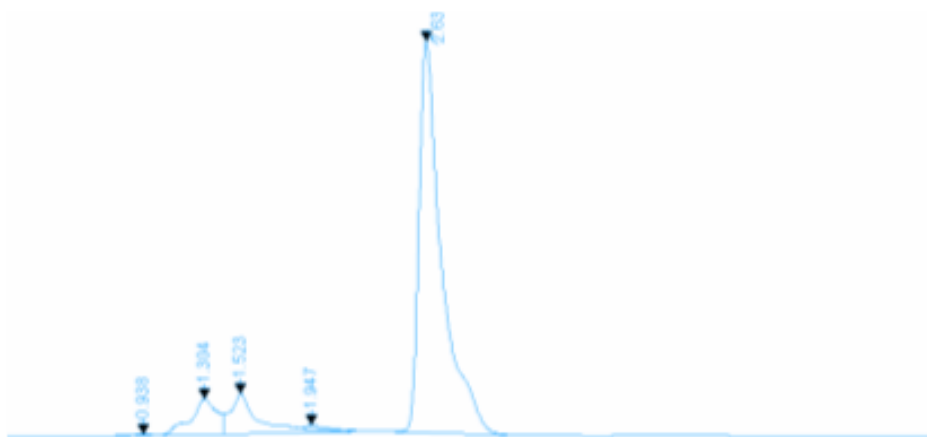


Рисунок 2 - Хроматограмма, полученная на колонке с октадецилсиликагелем (C18) (4.6×100мм). ЛВ- кофеин. Элюент ацетонитрил: вода 2:8.

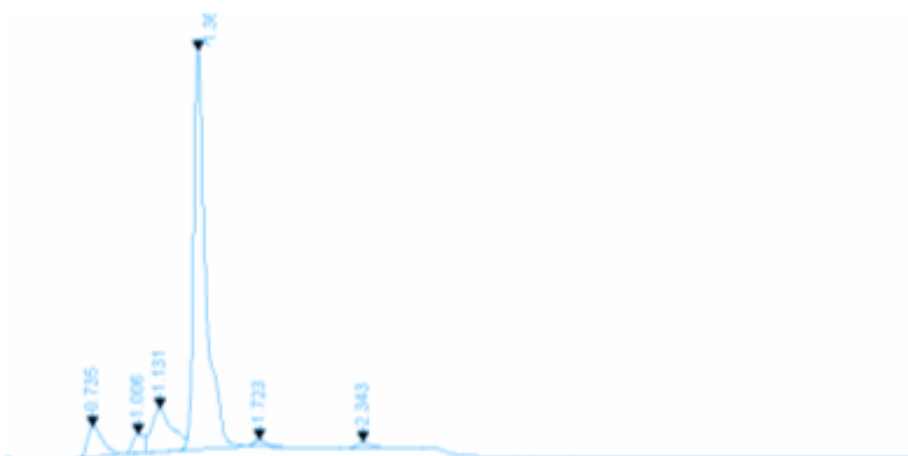


Рисунок 3 - Хроматограмма, полученная на колонке колонке с октадецилсиликагелем (C18) (4.6×100мм). ЛВ- аспирин. Элюент ацетонитрил: вода 2:8.

В таблице 6 приведены времена удерживания для кофеина, парацетомола и ацетилсалициловой кислоты на колонке C18. Как видно, исследуемые соединения обладают близкими временами удерживания и не смогут быть разделены при их совместном присутствии в смеси.

Таблица 6 - Времена удерживания ионогенных соединений на колонке C18.

Лекарственное средство	Длина волны	Время удерживания, мин
Аспирин	272 нм	1,360
Кофеин	273 нм	2,635
Парацетамол	250 нм	1,784

Затем тоже самое проводили на колонке с неподвижной фазой ZORBAX NH₂ (4.6 × 150мм). Элюентом также служила смесь ацетонитрил: вода 2:8. На рисунках 4-6 видим также схожие времена удерживания. Кроме того, форма и вид пиков не являются оптимальными для проведения количественного анализа.

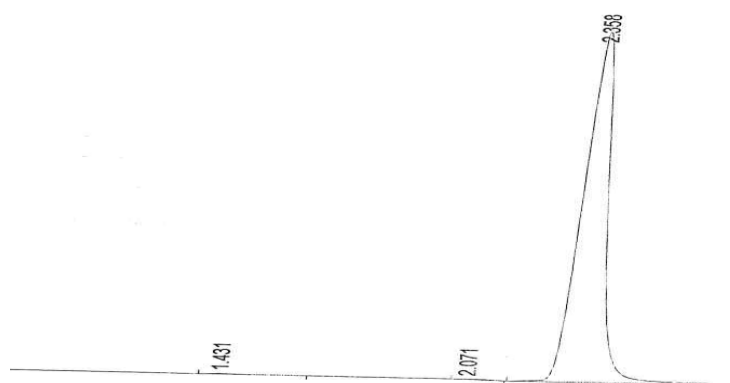


Рисунок 4 - Хроматограмма, полученная на колонке с привитыми аминогруппами (4.6×150мм). ЛВ- парацетамол.

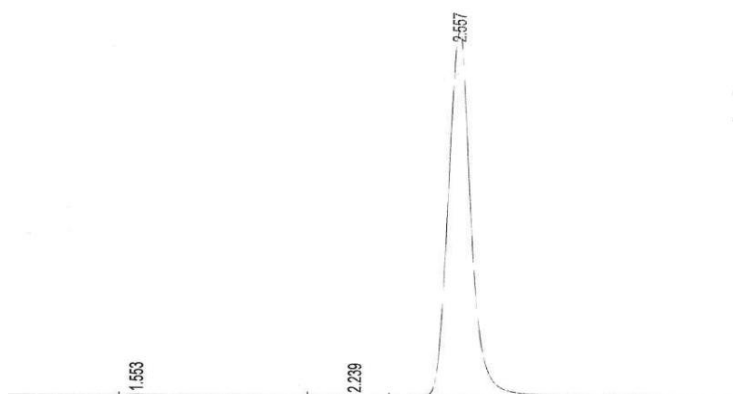


Рисунок 5 - Хроматограмма, полученная на колонке с привитыми аминогруппами (4.6×150мм). ЛВ- кофеин.

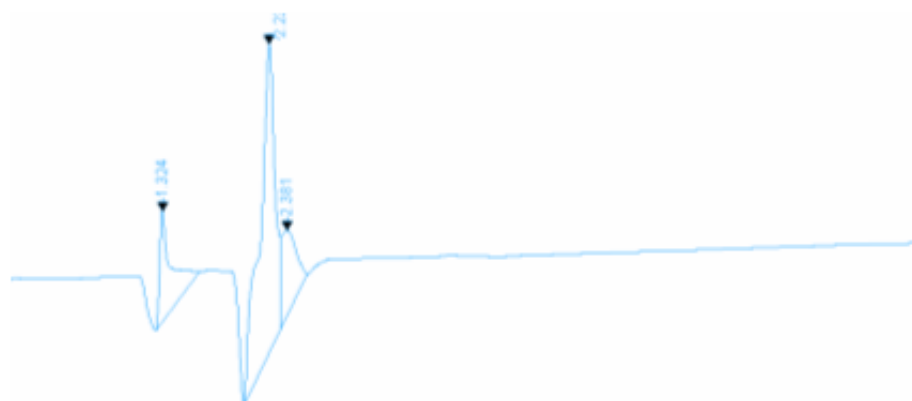


Рисунок 6 - Хроматограмма, полученная на колонке с привитыми аминогруппами (4.6×150мм). ЛВ- аспирин.

В таблице 7 приведены времена удерживания для кофеина, парацетамола и ацетилсалициловой кислоты на колонке NH_2 .

Таблица 7 - Времена удерживания ионогенных соединений на колонке NH_2

Лекарственное средство	Длина волны	Время удерживания
Аспирин	272нм	2,230
Кофеин	273нм	2,557
Парацетамол	250нм	2,358

Наиболее оптимальной неподвижной фазой являлась ZORBAX RX-SIL (4.6×150 мм). Именно эта колонка показала хорошее разделение пиков наших веществ и большую эффективность, мы можем наблюдать это на рисунках 7-9. А в качестве элюента оптимальным являлся ацетонитрил: буферный раствор дигидрофосфата калия с рН 11.

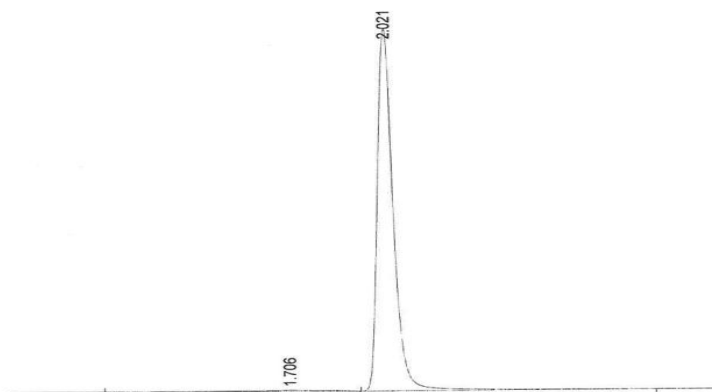


Рисунок 7 - Хроматограмма, полученная на колонке с силикагелем (4.6×150 мм). ЛВ- парацетамол.

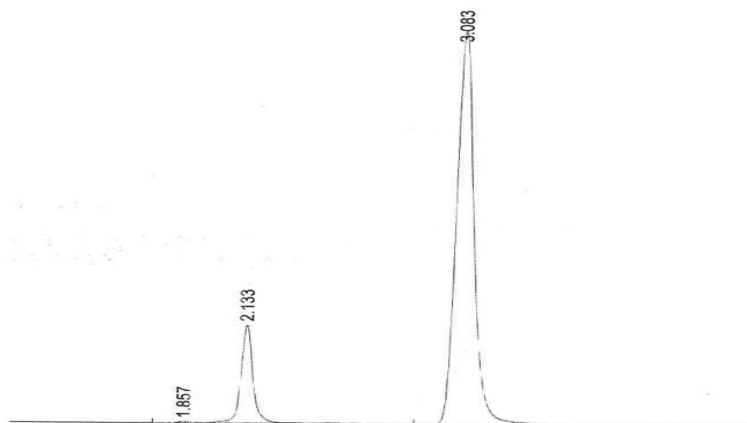


Рисунок 8 - Хроматограмма, полученная на колонке на колонке с силикагелем (4.6×150 мм). ЛВ- кофеин

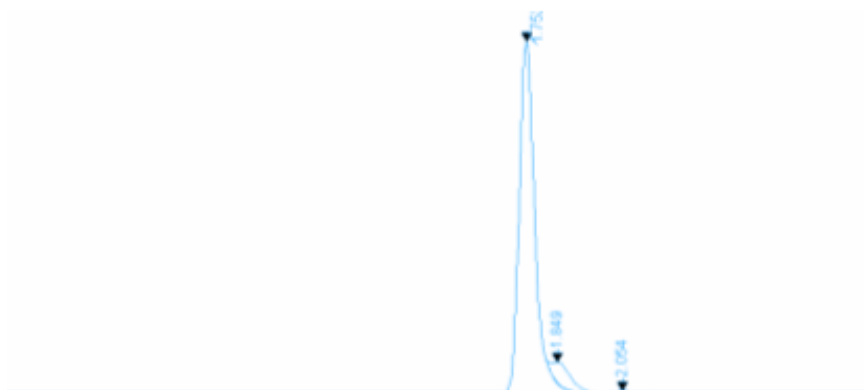


Рисунок 9 - Хроматограмма, полученная на колонке на колонке с силикагелем (4.6×150мм). ЛВ- ацетилсалициловая кислота.

В таблице 8 приведены времена удерживания для кофеина, парацетамола и ацетилсалициловой кислоты на колонке RX-SIL.

Таблица 8 - Времена удерживания ионогенных соединений на колонке RX-SIL.

Лекарственное средство	Длина волны	Время удерживания
Аспирин	272нм	1,753
Кофеин	273нм	3,083
Парацетамол	250нм	2,021

3.3. Анализ некоторых фармацевтических форм, содержащих ионогенные вещества

Для проверки разделения приготовили искусственную смесь парацетамол+ аспирин+ кофеин. И посмотрели возможность разделения смеси на колонке с силикагелем с ПФ- ацетонитрил: вода 2: 8. Результат представили на рисунках 10-12.

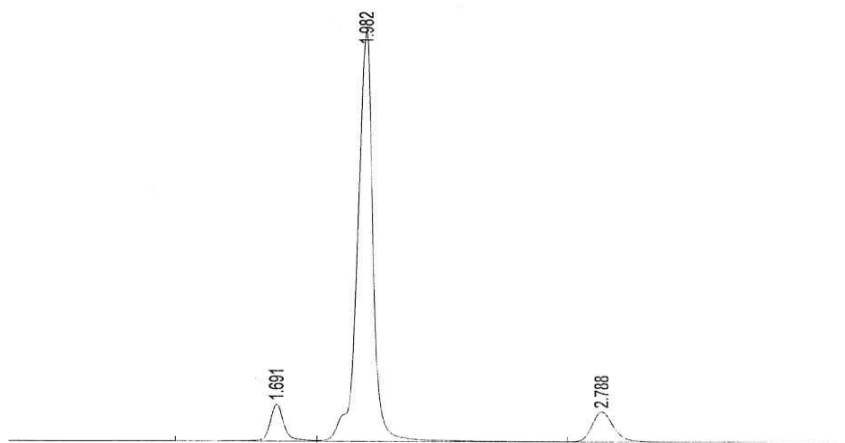


Рисунок 10 - Разделение смеси парацетамол+ аспирин+ кофеин. При длине волны 250 нм.

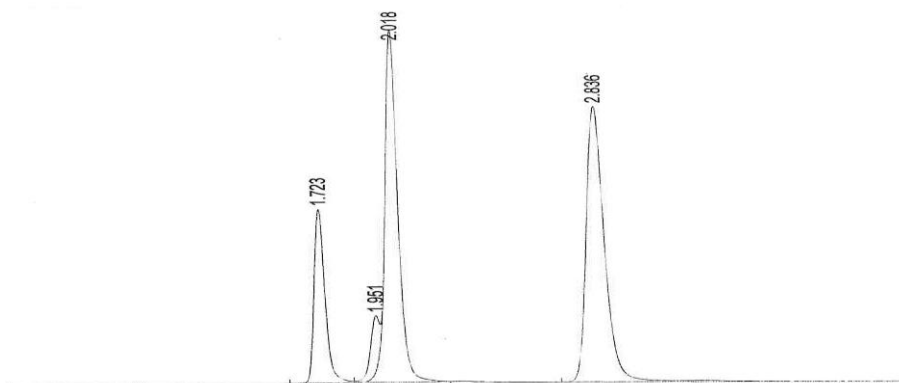


Рисунок 11 - Разделение смеси парацетамол + аспирин + кофеин. При длине волны 272.

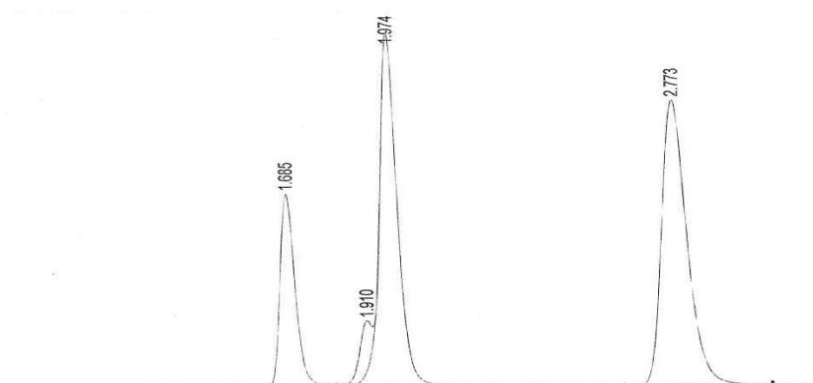


Рисунок 12 - Разделение смеси парацетамол+ аспирин+ кофеин. При длине волны 273 нм.

В таблице 9 приведены времена удерживания для смеси кофеина+ парацетамола+ ацетилсалициловой кислоты на колонке RX-SIL.

Таблица 9 - Времена удерживания ионогенных соединений в смеси на колонке RX-SIL

Лекарственное средство	Длина волны	Время удерживания, мин
Аспирин	250 нм	1,69
Кофеин	250 нм	2,79
Парацетамол	250 нм	1,98
Аспирин	272 нм	1,72
Кофеин	272 нм	2,84
Парацетамол	272 нм	2,02
Аспирин	273 нм	1,69
Кофеин	273 нм	2,77
Парацетамол	273 нм	1,97

Как мы видим, на примере искусственной смеси, данные компоненты могут быть успешно разделены. Далее проводили разделение ФП «Кофицил плюс», содержащего в своем составе вышеуказанные компоненты (рис. 13).

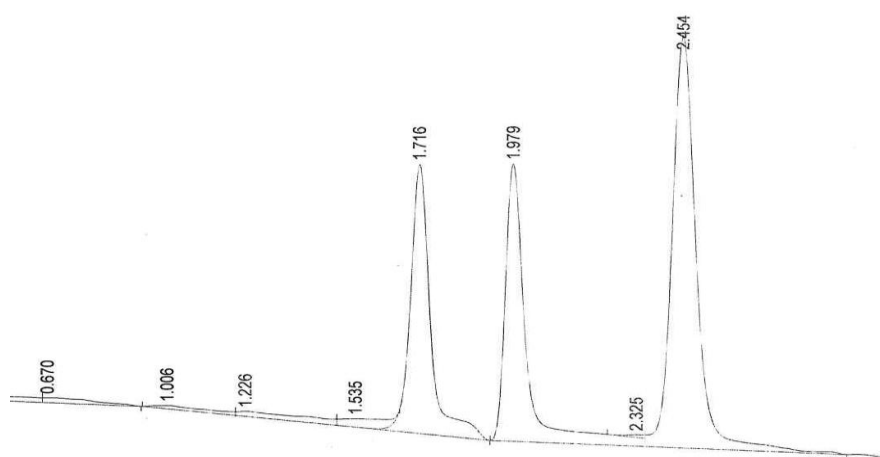


Рисунок 13 - Разделение ФП- «Кофицил плюс». НФ- силикагель, (4.6×150мм). Длина волны 272 нм. Элюент- ацетонитрил: вода в соотношении 2: 8.

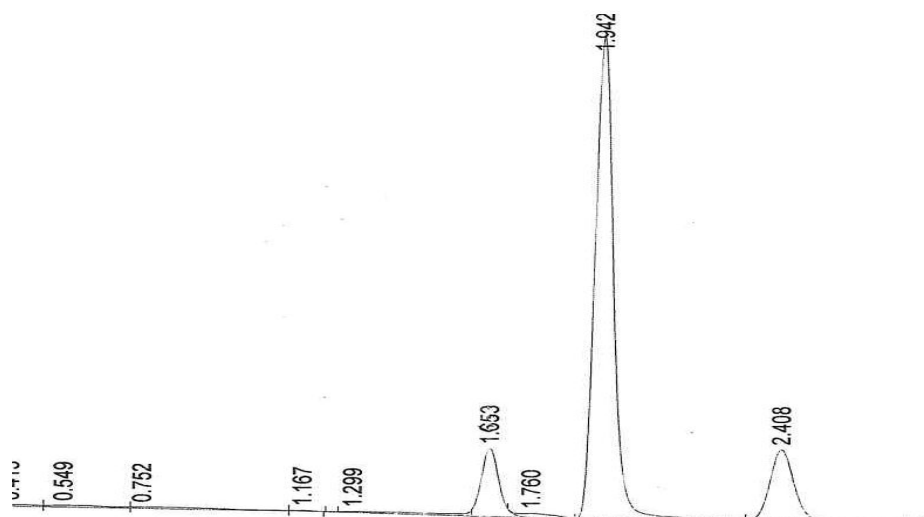


Рисунок 14 - ФП- «Кофицил плюс». НФ- силикагель, (4.6×150мм).
Длина волны 250 нм. Элюент- ацетонитрил: вода в соотношении 2: 8.

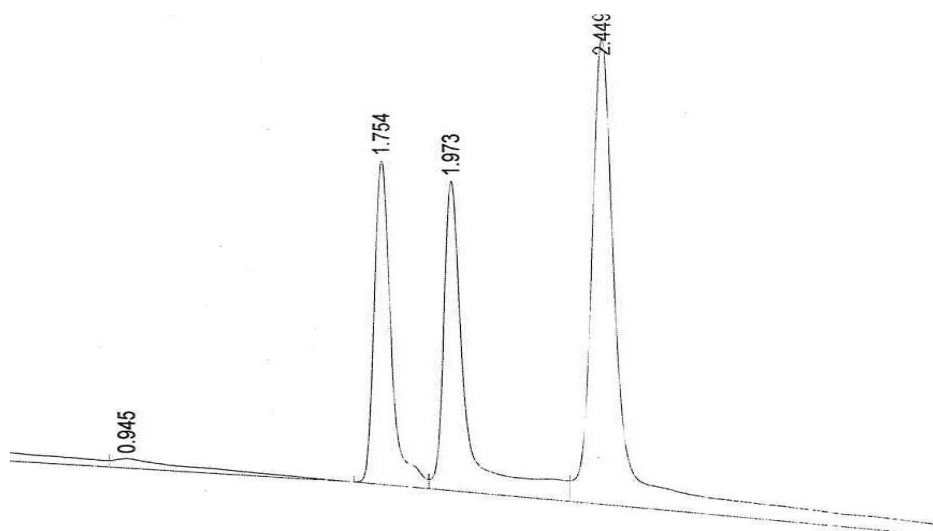


Рисунок 15 - ФП- «Кофицил плюс». НФ- силикагель (4.6×150мм).
Длина волны 273 нм. Элюент- ацетонитрил: вода в соотношении 2: 8.

Приведены времена удерживания для препарата «Кофицил плюс» на колонке RX-SIL в таблице 10.

Таблица 10 - Времена удерживания ионогенных соединений в составе ФП «Кофицил плюс».

Лекарственное средство	Длина волны детектора	Время удерживания, мин
Аспирин	250 нм	1,65
Кофеин	250 нм	2,41
Парацетамол	250 нм	1,94
Аспирин	272 нм	1,72
Кофеин	272 нм	2,45
Парацетамол	272 нм	1,98
Аспирин	273 нм	1,75
Кофеин	273 нм	2,45
Парацетамол	273 нм	1,97

3.4. Количественное определение парацетамола, ацетилсалициловой кислоты и кофеина.

Для количественного определения компонентов препаратов, содержащих рассмотренные действующие вещества, нами были получены градуировочные зависимости площади пиков от концентрации кофеина, парацетамола, ацетилсалициловой кислоты. Данные градуировки представлены на рисунках 16-18.

В рамках оценки достоверности и правильности результатов (отсутствие систематической погрешности) методом «введено-найдено» проверена применимость метода абсолютной градуировки. Результаты эксперимента приведены в таблице 12.

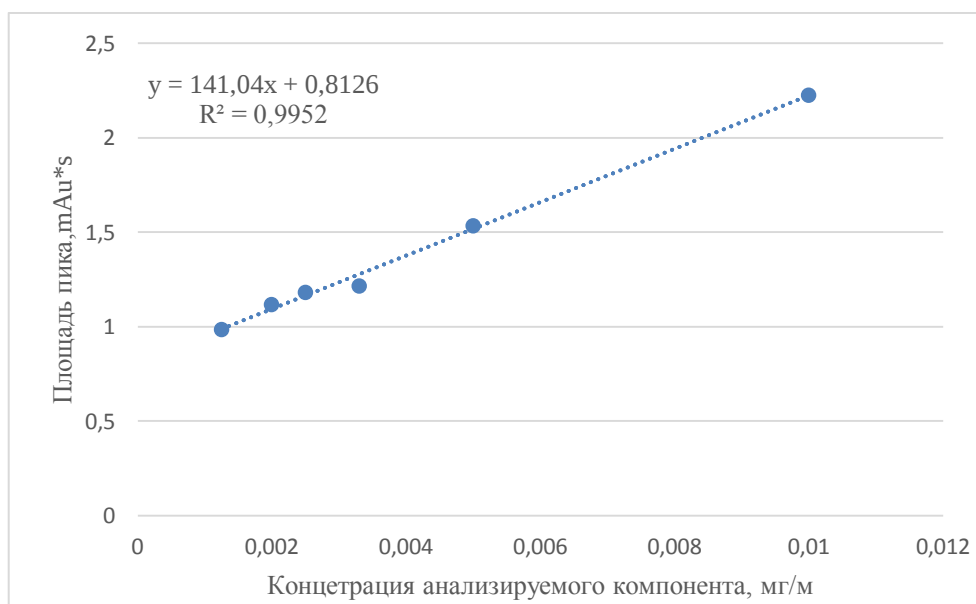


Рисунок 16 - Градуировочная зависимость площади пика от концентрации кофеина

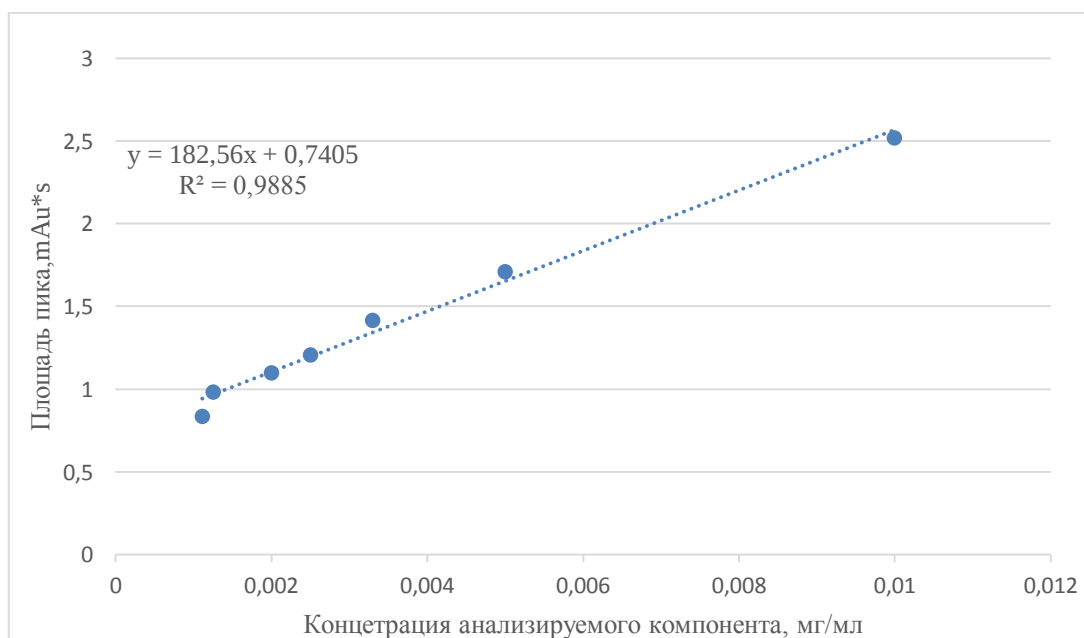


Рисунок 17 - Градуировочная зависимость площади пика от концентрации парацетамола.

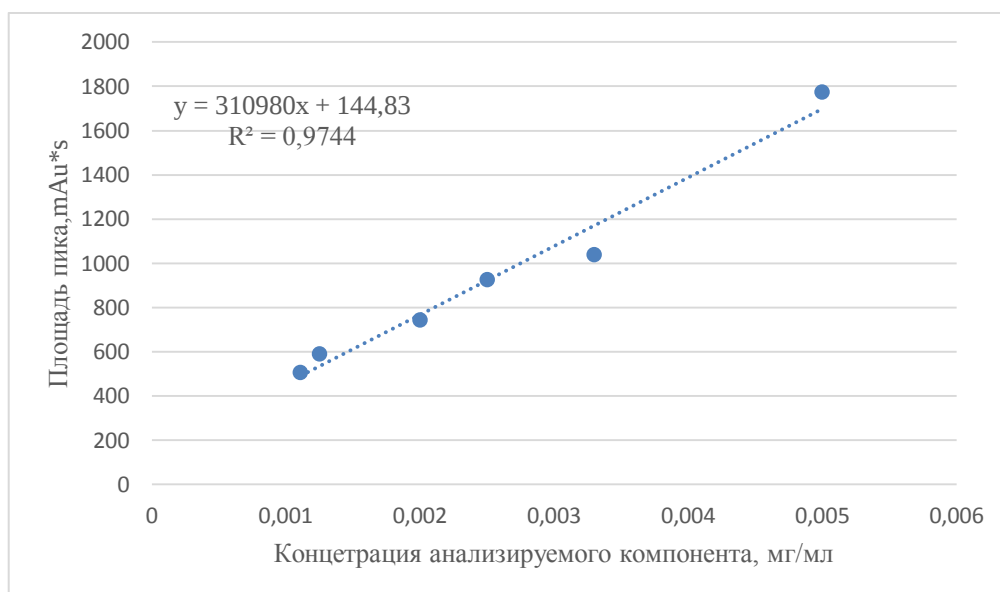


Рисунок 18 - Градуировочная зависимость площади пика от концентрации ацетилсалициловой кислоты

Таблица 11 – Метод «введено – найдено»

Лекарственный компонент	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	$S_r - \frac{S}{x}$
Кофеин	0.0040	0.0039 ± 0.0002	0.06
Парацетамол	0.0040	0.0038 ± 0.0002	0.05
Ацетилсалициловая кислота	0.0040	0.0039 ± 0.0002	0.06

Показано, что метод обладает хорошей достоверностью, правильностью и воспроизводимостью. Используя эту зависимость, были рассчитаны концентрации кофеина, ацетилсалициловой кислоты и парацетамола в исследуемом препарате «Кофицил плюс» и представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты определения содержания «Кофицил плюс».

Лекарственный компонент	Процентное содержание, %
Кофеин	8.30±0.04
Парацетамол	16.44±0.18
Ацетилсалициловая кислота	49.97±0.07

Препарат «Кофицил плюс» соответствует нормам (в одной таблетке препарата содержится: кофеина – 8.33% - 0.05 г, парацетамола - 16,67% - 0.10 г, ацетилсалициловой кислоты – 50% - 0.30 г)

Исследование возможностей гидрофильной хроматографии, которое проводится в последнее время, все больше подтверждает ее перспективность в анализе фармацевтических препаратов. Это касается, как анализа микро-, так и анализа макрокомпонентов. Данный вид хроматографии дешевле и проще в исследовании, чем градиентный режим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировав литературные данные, показали возможности гидрофильного режима высокоэффективной жидкостной хроматографии в разделении ионогенных веществ. Рассмотрены различные методы анализа фармацевтических препаратов, в составе которых содержатся ионогенные соединения.

Были установлены оптимальные условия для анализа лекарственных средств, содержащих ионогенные соединения, методом гидрофильной ВЭЖХ. На примере фармацевтического препарата «Кофицил плюс» показано разделение парацетамола, кофеина и ацетилсалициловой кислоты. Из чего следует вывод, что гидрофильный режим хроматографии подходит для разделения ФП, содержащих ионогенные вещества. Он может быть рекомендован как метод, альтернативный более сложным и дорогостоящим методам градиентного элюирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ребиндер П.А. Поверхностно-активные вещества. М.: Знание, 1961. 47 с.
2. Зиятдинова Г. К., Зиганшина Э. Р., Будников Г. К. Использование поверхностно-активных веществ в вольт-амперометрическом анализе //Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67. – №. 11. – С. 968-968.
3. Авилова И. А., Потребва Е. Ю., Кучерявых О. А. Особенности получения и производства пектина с применением нанотехнологий //Известия юго-западного государственного университета. Серия: физика и химия. – 2014. – №. 1. – С. 74.
4. Краснюк И.И. Фармацевтическая технология: Технология лекарственных форм: Учебник для студ. сред. проф. учеб, заведений / И. И. Краснюк, Г. В. Михайлова, Е.Т. Чижова; Под ред. И. И. Краснюка и Г. В. Михайловой. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 464 с
5. British Pharmacopeia CD 1998 v.2.0, London: System Simulation, 1998.
6. The United States Pharmacopeia, Rockville, 1995, 23 ed.
7. Dinc, E. and Ustunda, O., Chromatographia, 2005, vol. 61, nos. 5–6, p. 237.
8. Bald, E. and Sypniewski, S., Fresenius J. Anal. Chem, 1997, vol. 358, no. 4, p. 554.
9. Hewlett-Packard Peak, 1999, no. 1, p. 16.
10. Голубицкий, Г. Б. Количественный анализ таблеток «Пенталгин ICN» методами градиентной и изократической высокоэффективной жидкостной 31 хроматографии / Г. Б. Голубицкий, Е. В. Будко, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 10. – С. 1080–1086.

11. Голубицкий, Г. Б. Удерживание компонентов таблеток «Пенталгин Н» в ВЭЖХ на сорбенте с привитыми нитрильными группами / Г. Б. Голубицкий, Е. В. Будко, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 12. – С. 1267–1272.
12. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина и аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «Аскофен П» / Г. Б. Голубицкий, Е. В. Будко, Е. М. Басова и др. // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, № 6. – С. 636–640.
13. Cheng, Y.-F., Walter, T.H., Lu, Z., Iraneta, P., Alden, B.A., Gendreau, C., Neue, U.D., Grassi, J.M., Carmody, J.L., O’Gara, J.E., and Fisk, R.P., LCGC North America, 2000, vol. 18, no. 11, p. 1162.
14. Vergeichik, E.N. and Onegova, N.S., Farmatsiya, 2001, no. 3, p. 24.
15. Анализ многокомпонентного препарата от простуды «Максиколд» методом ВЭЖХ с градиентом pH подвижной фазы / Г. Б. Голубицкий, А. В. Иванов, Е. М. Басова, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, № 9. – С. 969–972.
16. Голубицкий Г. Б. Хроматографический анализ многокомпонентных полифункциональных лекарственных препаратов: дис.... д-ра хим. наук [Электрон. ресурс] //Режим доступа: <http://www.dissercat.com/content/khromatograficheskii-analiz-mnogokomponentnykh-polifunktsionalnykhlekarstvennykh-preparatov#ixzz2dwTekuCd> (Дата обращения 15.09. 2013). – 2011.
17. Бурлака І. С., Кисличенко В. С., Бурлака І. С. Пігменти трави щучника дернистого і трави куничника звичайного. – 2012.
18. Голубицкий Г. Б. и др. Взаимодействие между компонентами в смесях парацетамола, кофеина и ацетилсалициловой кислоты //Научные ведомости

Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – Т. 24. – №. 25 (168).

19. Берштейн И. Я., Каминский Ю. Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. — Л., 1986. — 200 с

20. Dhake A. S., Sonaje D. B., Kasture Veen a S., Nikam P. T., Talekar R. S. Simultaneous determination of mefenamic acid and paracetamol from combined dosage forms by spectrophotometry / Indian J. Pharm. Sci. 2001. Vol. 63. N 1. P. 55 57.

21. Митькина Л. И., Зайцева И. И. Спектрофотометрическое определение дезоксирибонуклеиновой кислоты и нипагина при их совместном присутствии в препарате «Дезоксинат раствор 0,25 %» / Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. № 6. С. 43 – 44

22. Огнечникова Н. Д., Орлова Т. В., Нестерова А. В., Кузьмин Б. В. Анализ качества суппозиторий жаропонижающего действия, содержащих парацетамол, кофеин, димедрол и аскорбиновую кислоту / 69-я Итоговая научная сессия КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрально-Черноземного научного центра РАМН: сб. науч. тр. — Курск: Изд-во КГМУ, 2004. Ч. 2. С. 298 - 299.

23. Власова И. В., Шилова А. В., Рыжова С. В., Одинец Е. Н. Спектрофотометрическое определение папаверина гидрохлорида и дибазола в лекарственном препарате «Папазол», таблетки / Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. — Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2005. Вып. 60. С. 193- 194.

24. Власова И. В., Шилова А. В., Фокина Ю. С. Спектрофотометрическое определение активных компонентов в составе лекарственных препаратов с

использованием метода Фирордта. Сообщение 1. Анализ препаратов «Анальгин-хи нин» и «Панадол экстра» / Хим.-фарм. журн. 2008. № 10. С. 49-53.

25. Власова И. В., Кулакова С. А., Поморцева А. В. Спектро фотометрическое определение кофеина, парацетамола и ацетилсалициловой кислоты при совместном присутствии / Заводская лаборатория. 2005. Т. 71. № 9. С. 18 - 20.

26. Huggins Z., Msimanga, Jillian Wiese. Determination of acetaminophen in analgesics by the standard addition method: a quantitative analytical chemistry laboratory (abstract) / The Chemical Educator. 2005. Vol. 10. N 6. P. 430 436.

27. Vyas A. J., Aggarwal N. A., Nagori B. P., Patel J. K., Jobanputra C. R., Viramgama D. S. Simultaneous estimation of nabumetone and paracetamol by Vierordt's method in combined tablet dosage form / Int. J. Chem. Tech. Res. 2010. Vol. 2. N 1. P. 543 – 547

28. Likhar Amruda D., Gupta K. R., Wadodkar S. G. Spectrophotometric methods for the simultaneous estimation of paracetamol and etoricoxib in tablet dosage forms / Int. J. Pharmacy Pharm. Sci. 2010. Vol. 2. Is. 1. P 156- 161.

29. Sagar B. Wankhede, Nitin R. Dixit, Sohan S. Chitlange. Validated spectrophotometric methods for quantitative determination of Atorvastatin calcium and Metoprolol succinate in Capsules / Der Pharma Chemica. 2010. Vol. 2. N 1. P. 134- 140.

30. Беликов В. Г. Анализ лекарственных веществ фотометрическими методами. Опыт работы отечественных специалистов / Российский химический журнал. 2002. Т. XLVI. № 4. С. 52 - 56.

31. Wang Nui-Qin, Huang Zhen-Zhong, Zhu Yong-Mei, Huang Wu-Gen. Определение анальгина в таблетках спектрофотометрическим методом / Chin. J. Spectrosc. Lab. 2002. Vol. 19. N 6. P. 777 - 780.

32. Гуськов В. Ф., Шамина Я. А., Талдыкина А. А. Использование спектрофотометрии в количественном анализе лекарственных средств заводского изготовления / Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. — Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2004. Вып. 59. С. 159
33. Илларионова Е. А., Сыроватский И. П. Использование внешнего стандарта в анализе некоторых азотсодержащих лекарственных средств / Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. — Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2005. Вып. 60. С. 167 – 170
34. Израилева Г. Г., Овчаренко Л. П. Количественное определение изониазида и рифампицина в модельных смесях методом спектрофотометрии / Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. — Пятигорск: Пятигорская государственная фармацевтическая академия, 2005. Вып. 60. С. 217 - 218.
35. Огнечникова Н. Д., Орлова Т. В., Нестерова А. В., Кузьмин Б. В. Анализ качества суппозиторий жаропонижающего действия, содержащих парацетамол, кофеин, димедрол и аскорбиновую кислоту / 69-я Итоговая научная сессия КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрально-Черноземного научного центра РАМН: сб. науч. тр. — Курск: Изд-во КГМУ, 2004. Ч. 2. С. 298 - 299.
36. Qiao Lan-Xia, Gao Zhi-guo, Xing Qing, Qiu-rui. Количественное определение аспирина в таблетках с помощью спектрофотометрии / J. Hebei Norm. Univ. 2001. Vol. 25. N2. P. 219 ^ 220.
37. Ткаченко М. Л., Жнякина Л. Е., Космынин А. С. Физико-химические исследования твердых смесей кофеина и парацетамола / Хим.-фарм. журн. 2003. Т. 37. № 8. С. 34.

38. Nogowska M., Muszalska J., Zajac M. Simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and caffeine in pharmaceutical preparations / *Chim. anal.* 1999. Vol. 44. N 6. P. 1041 - 1048.
39. Kelani Khadiga M., Aziz Azza M., Hegazy Maha A., Fattah Laila A. UV-spectrophotometric stability indicating methods for the quantitative determination of cimetidine, famotidine and ranitidine hydrochloride in the presence of their oxidative derivatives / *Anal. Lett.* 2002. Vol. 35. N 6. P. 1055 - 1073.
40. Васюк С. О., Алтунш М. Л., Петренко В. В. Спектрофотометричне визначення парацетамолу в лікарських формах / *Мед. хімі.* 2004. Т. 6. № 1. С. 77 - 80.
41. Tehseen Aman, Fouzia Naureen, Kazi Asrar Ahmad. Ammonium molybdate as a spectrophotometric reagent for the determination of indomethacin in pure and pharmaceutical preparations / *Anal. Lett.* 2002. Vol. 35. N 6. P. 1007 - 1020.
42. Мирзаева Х. А., Ахмедов М. С., Рамазанов А. Н., Ахмедов С. А. Экстракционно-фотометрическое определение димедрола и папаверина в лекарственных формах / *ЖАХ.* 2004. Т. 59. № 3. С. 245 - 249.
43. Арстамян Ж. М., Мкртчян М. А. Экстракционно-фотометрическое определение анальгина с кристаллическим фиолетовым в лекарственных препаратах / *Химический журнал Армении.* 2006. Т. 59. № 1. С. 64 - 67.
44. Acar N., Onur F. Spectrophotometric simultaneous analysis of analgin - adamon mixture in injection preparations / *Anal. Lett.* 1996. Vol. 29. N 5. P. 763 - 773.
45. Aggarwal S. G., Patel K. S. Flow injection analysis of Zn and Co in beverages, biological, environmental and pharmaceutical samples / *Fresenius' J. Anal. Chem.* 1998. Vol. 362. N 7-8. P. 571 -576.

46. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методов количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / Фармаком. 2002. № 3. С. 42-50.
47. Гризодуб А. И., {волинская Н. Н., Архипова Н. Н., Леонтьев Д. А., Денисенко Н. В., Доценко Т. Н. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / Фармаком. 2004. №2. С. 1-16.
48. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методов контроля качества лекарственных средств / Фармаком. 2006. № 1/2. С. 35-44.
49. Osipov, A.S., Arkharchev, Yu.P., and Ulogov, V.O., Vopr. Biol. Med. Farm. Khim., 2003, no. 1, p. 37.
50. Bobrov, A.V., Van'kova, N.A., and Sul'din, A.V., Khim.- Farm. Zh., 2000, vol. 34, no. 9, p. 44.
51. Dolan, J.W., LCGC North America, 2001, vol. 19, no. 11, p. 1132.
52. Flanagan, R.J., Harvey, E.J., and Spencer, E.P., Forens. Sci. Int., 2001, vol. 121, nos. 1-2, p. 97.
53. Ding, X. and Mou, S., J. Chromatogr., A, 2000, vol. 897, nos. 1-2, p. 205.
54. Liu, H., Wang, H., and Sunderland, B.V., J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, vol. 37, no. 2, p. 395.
55. Styskin, E.L., Itsikson, L.B., and Braude, E.V., Prakticheskaya vysokoeffektivnaya zhidkostnaya khromatografiya (Practical High-Performance Liquid Chromatography), Moscow: Khimiya, 1986
56. The United States Pharmacopeia, Rockville, 1995, 23 ed.

57. Staroverov, V.M., Deineka, V.I., Grigor'ev, A.M., Prokhoda, E.F., Pokrovskii, M.V., and Ivanov, V.V., *Khim.- Farm. Zh.*, 2004, vol. 38, no. 3, p. 54
58. Baturina, O.A., Extended Abstract of Cand. Sci. (Pharm.) Dissertation, Moscow: Mosk. med. akad. im. I.M. Sechenova, 1998.
59. Golubitskii G. B. et al. Quantitative analysis of the Maksikold multicomponent anticatarrhal preparation by pH-gradient high-performance liquid chromatography // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2007. – Т. 62. – №. 9. – С. 875-877.
60. Сапрыкин Л. В. Динамическое модифицирование в практике ВЭЖХ // *Химический анализ*. – 2005. – №. 1. – С. 20-36.
61. Сапрыкин Л. В., Сапрыкина Л. В. Некоторые аспекты практического применения динамического модифицирования в ВЭЖХ на силикагелевых сорбентах // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2006. – Т. 6. – №. 2. – С. 284-301.
62. Сычев К., Стыскин И. Анализ полифенольных соединений кофе и чая в условиях гидрофильного режима вЭЖХ // *Аналитика*. – 2012. – Т. 5. – №. 4. – С. 56-61.
63. Wang X., Li W, Rasmussen H. T. // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1083. P. 58.
64. Bajad S. U., Lu W., Kimball E. H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J. D. // *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1125. P. 76.
65. Schilichtherle-Cerny H., Affloter M., Cerny C. // *Anal. Chem*. 2003. Vol. 75. P. 2349.
66. Aversano C., Hess P., Quilliam M. A. // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1081. P. 190.
67. Xue Y. J., Liu J., Unger S. // *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2006. Vol. 41. P. 979.

68. Naidong W. //J. Chromatogr. B. 2003. Vol. 796. P. 209.69. 14. Kulikov A. U., Verushkin A. G., Lo L. P. //Chromatographia. 2005. Vol. 61. No. 9/10. P. 455.
70. Quiming, N. S., Denola N. L., Saito Y., Catabay A. P., Jinno K. // Chromatographia. 2008. No. 39 (7/8). P. 50
71. Отто М. Современные методы аналитической химии. – Техносфера, 2003. элюотропный ряд
72. Рудаков О. Б., Рудакова Л. В. Обобщенные критерии элюирующей способности растворителей в высокоэффективной жидкостной хроматографии //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12. – №. 2. – С. 231-239.