

На правах рукописи

Кузьменко Алексей Николаевич

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ
В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ
МЕТОДОМ ИОНОЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

02.00.02 - Аналитическая химия

15.00.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Москва - 2004

Работа выполнена на кафедре общей химии стоматологического факультета Московской Медицинской Академии им. И.М. Сеченова и на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор Решетник В.Ю.

доктор химических наук, профессор Шпигун О.А.

Официальные оппоненты:

доктор фармацевтических наук, профессор Краснюк И.И.

доктор химических наук, профессор Яшин Я.И.

Ведущая организация:

ГУП "Центр по химии лекарственных средств - ВНИИХФИ"

Защита состоится 23 июня 2004 г. в 16 часов 10 минут в ауд. 344 на заседании диссертационного Совета Д.501.001.88. по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские Горы, МГУ, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан 21 мая 2004 года.

Ученый секретарь диссертационного Совета,

кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хроматографические методы исследования находят все большее применение в фармацевтической практике благодаря экспрессности, точности, высокой воспроизводимости, простоте пробоподготовки. Эти качества оказываются незаменимыми при контроле качества и стандартизации фармацевтических препаратов, находящихся в разных формах. Среди хроматографических методов ионоэкслюзионная хроматография (ИЭХ) оказывается наиболее эффективной при определении слабых органических кислот.

Учитывая, что именно такие кислоты (в виде солей) являются биологически активными в гемоконсервантах, инфузионных растворах, некоторых лекарствах, находящихся в твердой форме, для их определения был выбран метод ионоэкслюзионной хроматографии как один из наиболее современных. Необходимо отметить, что зачастую методы определения данных кислот, указанные в соответствующих фармстатьях или в Фармакопее, являются устаревшими. Причин тому несколько: их общая длительность, трудоемкость, сложная пробоподготовка, низкая воспроизводимость. Переход нашей фармацевтической промышленности на международные стандарты, возможная разработка новой Фармакопеи требуют и новых аналитических разработок, выполненных с использованием современной инструментальной базы.

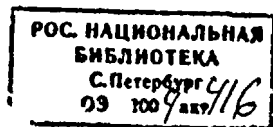
Исследования, выполняемые в отношении лекарственных растений, позволяют выяснить их химический состав, который весьма сложен и с трудом поддается точному анализу другими, кроме ионоэкслюзионной хроматографии, методами. Возможность стандартизации растительного сырья по профилю хроматограмм могла бы стать дополнительной возможностью установления подлинности растительного сырья. С медицинской точки зрения представляется интересным проведение корреляции между фармакологическим действием данного лекарственного растения и содержанием в нем биологически активных карбоновых кислот.

Цель работы. Разработка современных хроматографических методов контроля качества и стандартизации фармацевтических препаратов.

Научная новизна работы. Предложен новый подход к анализу фармацевтических препаратов на содержание больших количеств алифатических и ароматических кислот с использованием ИЭХ. Найдены условия точного и селективного определения ряда органических кислот.

При использовании кондуктометрического детектирования для ряда органических кислот, входящих в состав гемоконсервантов и инфузионных растворов, найдены аналитические характеристики их ИЭХ определения. Показана возможность определения макроколичеств лимонной кислоты при анализе цитратсодержащих гемоконсервантов без предварительного разбавления пробы при использовании петли-дозатора малого объема.

Методом ионоэкслюзионной хроматографии с УФ детектированием проведен количественный анализ лекарственных препаратов на основе ацетилсалициловой кислоты, найдены его аналитические характеристики.



Достигнута высокая селективность определения ацетилсалициловой кислоты в присутствии возможных кислот-загрязнителей.

Методом ионоэкслюзионной хроматографии определен качественный и количественный состав ряда лекарственных растений. Проведена корреляция между фармакологическим действием растений и содержанием в них карбоновых кислот.

Практическая значимость. Предложен современный инструментальный метод ионоэкслюзионной хроматографии для контроля качества фармацевтических препаратов, находящихся как в жидкой, так и в твердой формах.

Полученные результаты использованы для разработки методик количественного определения ацетат-, цитрат- и фумарат-ионов в инфузионных растворах и гемоконсервантах. Методики внедрены в процедуру государственного контроля качества, эффективности и безопасности средств инфузионной терапии, о чем имеются соответствующие акты внедрений, и рекомендованы в качестве альтернативных в фармакопейные статьи на препараты "Мафусол", "Ацесоль", "Рингера-ацетат", "Циглюфад", "Циглюкофосфат".

Найденные в работе условия ИЭХ определения каприлат-ионов взяты за основу при разработке методики их количественного определения в препарате крови "Раствор альбумина 10% для инфузий", которая внедрена в практику государственного контроля качества, эффективности и безопасности препаратов на основе альбумина.

Этот же метод, благодаря высокой точности, может быть рекомендован для качественного и количественного рутинного анализа химического состава лекарственных растений.

На защиту выносятся следующие положения:

- Хроматографические условия (сорбенты, элюенты) ИЭХ определения алифатических карбоновых кислот в гемоконсервантах и инфузионных растворах с применением кондуктометрического детектора.
- Аналитические характеристики ИЭХ определения ряда кислот, входящих в эту группу препаратов.
- Способ определения больших концентраций (до 30 г/л) лимонной кислоты методом ионоэкслюзионной хроматографии без разбавления пробы при использовании петли-дозатора малого объема.
- Способ ионоэкслюзионнохроматографического определения ацетилсалициловой кислоты в лекарственных препаратах с использованием УФ детектора. Обоснование выбора наиболее подходящих сорбента и элюента для определения этой и других ароматических кислот (бензойная, салициловая).
- Данные о влиянии органических модификаторов на определение ацетилсалициловой кислоты и на ее селективное отделение от возможных кислот-загрязнителей.

- Результаты изучения химического состава около 40 наиболее известных лекарственных растений на предмет содержания в них биологически активных карбоновых кислот.

- Аналитические характеристики ИЭХ определения одной из наиболее значимых в составе лекарственных растений карбоновых кислот - аскорбиновой.

- Способ ионоэкслюзионнохроматографического определения сильноудерживаемой каприловой кислоты в плазмозаменителе "Альбумин". Аналитические характеристики для каприловой кислоты.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований докладывались на IX Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2002), Всероссийском симпозиуме "Современные проблемы хроматографии" (Москва, 2002), X Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2003), Третьем международном симпозиуме "100 Years of Chromatography" (Москва, 2003), на научных коллоквиумах лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии химического факультета МГУ. По материалам диссертации опубликовано 8 работ в виде статей и тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, шести глав экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, приложения. Материал диссертации изложен на 149 страницах текста, содержит 31 рисунок и 39 таблиц, в списке цитируемой литературы 144 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Рассмотрены и систематизированы опубликованные данные по применению ионоэкслюзионной хроматографии для анализа различных соединений. Анализ литературы позволяет сделать вывод о целесообразности использования этого метода для определения слабых органических кислот в образцах с их высоким содержанием, в частности, в фармацевтических препаратах. Для ряда кислот (ацетилсалициловая, фумаровая, аскорбиновая) публикаций по их ИЭХ определению чрезвычайно мало. Этот дефицит информации восполнен в настоящей работе.

На основе литературных данных обоснованы и конкретизированы задачи диссертационной работы.

Экспериментальная часть

Для выполнения исследования использовались жидкостные хроматографы Цвет-3006 с кондуктометрическим детектором БИЭ-03 и Kontron-430A со спектрофотометрическим детектором. В качестве сорбентов были использованы катионообменники марок Aminex Q-15S и Aminex A5, размер колонок составлял 8x300 и 6x250 мм.

Растворы карбоновых кислот готовили растворением соответствующего реактива в деионизованной воде и хранили в темном месте при температуре 2-4 °С. Растворы элюентов готовили непосредственно перед экспериментом.

Для построения градуировочных графиков и контроля правильности методов использовали Государственные стандартные образцы.

Воспроизводимость определения времен удерживания карбоновых кислот не превышала 0,03 ($p=5$, $P=0,95$).

Ионоэкслюзионное определение карбоновых кислот

Выбор сорбента

Из литературных данных известно, что для заполнения колонок в ИЭХ используются катионообменники высокой емкости с малой степенью сшивки (2-5%), иногда вместо макропористых используются гели и гелеподобные сорбенты, но в любом случае в качестве матрицы сорбента используется стиролдивинилбензолный каркас. Сорбентов, отвечающих этим требованиям, сравнительно немного. Нами были исследованы следующие: из макропористых - AG 50Wx2; AG 50Wx4; AG 50Wx8; Aminex H* 50Wx2 и 50Wx4; Dowex 50Wx2; 50Wx3; 50Wx4; 50Wx5, из гелевых - Aminex Q-15S; Aminex SB Blend Q 60, а также специальный сорбент смешанного типа Aminex A5.

Гелевые сорбенты Aminex Q-15S и Aminex SB Blend Q 60 одинаково селективно разделяют как моно-, так и дикарбоновые кислоты. При этом время анализа не превышает 45 мин. Однако у сорбента Aminex Q-15S есть преимущество: селективность разделения низших моно- и высших дикарбоновых кислот у него намного выше. Кроме того, поскольку планировалось использовать этот сорбент в сочетании с кондуктометрическим детектированием, было учтено, что сродство к органическим кислотам, использующимся в качестве элюента, у данного сорбента наибольшее.

Поскольку в нашу задачу входило не только определение алифатических кислот, но и ароматических, было необходимо найти сорбент, который бы обладал значительно меньшим сродством к ароматическому ядру исследуемых кислот, чем Aminex Q-15S, но в то же время проявлял удовлетворительную селективность для разделения ароматических кислот. После проведения предварительного тестирования установили, что всем перечисленным качествам отвечает сорбент Aminex A5. Данный сорбент при разделении фенолкарбоновых кислот оказался более предпочтительным по сравнению с сорбентом Aminex Q-15S, т.к. в области средне- и сильноудерживаемых компонентов значительно (в 1,5 и более раз) уменьшает время удерживания. При этом селективность разделения легкоудерживаемых компонентов не ухудшается. Кроме того, за счет улучшения формы пиков (более узкие и высокие) улучшается предел обнаружения. Рис.1 а,б позволяют проследить эту разницу для двух сорбентов при разделении нескольких ароматических кислот. В частности, время удерживания для бензойной кислоты уменьшается с 76,5 до 45,0 мин, а для салициловой кислоты - с 88,3 до 60,2 мин (скорость потока 0,8 мл/мин, элюент - 20 мМ серная кислота).

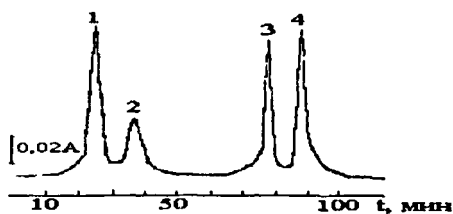


Рис. 1а. Хроматограмма модельной смеси кислот. 1-гиппуровая; 2-галловая; 3-бензойная; 4-салициловая. Детектор - УФ. $\lambda = 210$ нм. Элюент: серная кислота 20 нМ. Скорость потока: 0.8 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (6 x 250 мм).

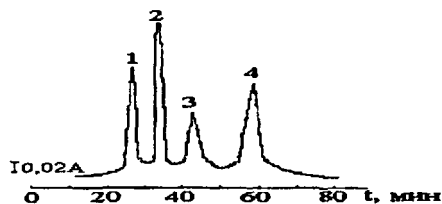


Рис. 16. Хроматограмма модельной смеси кислот. 1 - гиппуровая; 2 - галловая; 3 - бензойная; 4 - салициловая. Условия как для рис. 1а. Колонка: Aminex A5 (6 x 250 мм).

Выбор размера колонки

Мы остановили свой выбор на сорбенте Aminex Q-15S и проверили селективность разделения на колонках нескольких размеров.

Были посчитаны величины разрешения (R) для двух ближайших пиков кислот моно-, дикарбонового ряда и оксикислот для различных длин колонки (при постоянном диаметре) и для различных диаметров колонки (при постоянной длине).

Зависимость разрешения от длин и диаметров колонок для трех пар кислот представлена на рис. 2.

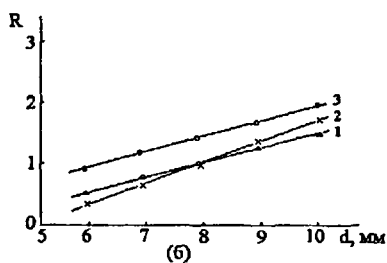
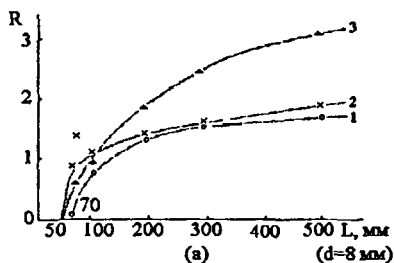


Рис. 2. Зависимость разрешения (R) от длины колонок (L) - рис. а; от диаметров колонок (d) - рис. б. Детектор - кондуктометрический. Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 1,0 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (d=8мм). Длина колонки для рис. б - 200 мм. Пары кислот: 1) винная - молочная (оксикислоты); 2)глутаровая - адиллиновая (дикарбоновые); 3) валериановая - капроновая (монокрбоновые).

Из рис. 2а видно, что максимальное разрешение для всех трех пар кислот достигается при длине колонки равной 300 мм. Для окси- и дикарбоновых кислот при увеличении длины колонки до 400 мм и 500 мм значения R увеличиваются незначительно (наблюдается "насыщение"), а для

сильноудерживаемых монокарбоновых кислот (валериановая, капроновая) при переходе от длины 300 мм к длине 400 и 500 мм наблюдается незначительное увеличение селективности разделения кислот, но при этом резко возрастает время анализа. Поэтому в качестве оптимальной выбрана длина колонки, равная 300 мм при диаметре 8 мм.

Как видно из рис. 26, с увеличением диаметра колонки при одной и той же длине происходит линейное возрастание величины R , то есть селективность разделения кислот возрастает, но в значительно меньшей степени, чем при увеличении длины колонки. Очевидно, что на эффективность и селективность разделения органических кислот в большей степени влияет длина колонки, чем ее диаметр. При диаметрах 6, 7, 8, 9 и 10 мм ($L = 200$ мм) получали примерно одинаковое по селективности и эффективности разделение карбоновых кислот при незначительном увеличении времени удерживания. Таким образом, диаметр колонки не является определяющим параметром при разделении кислот, в то время как при увеличении длины колонки от 50 до 300-400 мм селективность и эффективность значительно повышаются.

Исходя из полученных данных, в качестве оптимальной для ИЭХ была выбрана колонка размером 8 x 300 мм.

Для определения ароматических кислот мы остановились на сорбенте Aminex A5. Постепенно уменьшая диаметр и длину колонки, мы добились селективного разделения ароматических кислот (ацетилсалициловая, бензойная, салициловая) за сравнительно короткое время. При этом монокарбоновые кислоты селективно разделяются и не мешают определению ближайшей к ним ацетилсалициловой кислоты. Эти результаты получены при размере колонки 6 x 250 мм.

Выбор элюента

Поскольку нами были исследованы два детектора - кондуктометрический для прибора "Цвет-3006" и УФ — детектор для прибора "Kontron 430A", то выбор элюента был индивидуален для каждого вида детектора.

Для кондуктометрического детектора группой кислот, использованных в качестве элюентов, были ароматические кислоты, такие как бензойная, фталевая, салициловая. Из этих кислот наиболее подходящее сродство к сорбенту показала бензойная кислота. Кроме того, пики алифатических кислот, имеющих большое время удерживания (валериановая, капроновая, каприловая), при использовании фталевой и салициловой кислот в качестве элюентов имели несимметричную форму. Таким образом, мы остановились на бензойной кислоте в качестве элюента.

Для выбранной нами в качестве элюента для УФ-детектора серной кислоты был проверен интервал концентраций 0,5 - 100 мМ. Как показали эксперименты, селективность определения растет с увеличением концентрации кислоты до 25 мМ, дальнейшее увеличение концентрации не дает какого-либо видимого улучшения селективности. В интервале концентраций от 20 до 25 мМ наблюдается некоторое ухудшение эффективности за счет размывания заднего фронта. Таким образом, оптимальной концентрацией при использовании серной кислоты в качестве элюента является концентрация 20 мМ.

Гемоконсерванты и инфузионные растворы

В состав исследованных нами лекарственных растворов входят лимонная, уксусная, фумаровая кислоты. Малеиновая кислота изучалась как нежелательная для присутствия в препарате "Мафусол".

Работа проводилась на ионном жидкостном хроматографе "Цвет 3006". В качестве элюента была выбрана бензойная кислота с концентрацией 5 мМ и рН = 4,12. Скорость подачи элюента менялась от 0,7 до 1,2 мл/мин. В качестве сорбента была выбран катионообменник Aminex Q-15S.

Обычно для снижения времени удерживания в условиях ИЭХ используют добавки различных спиртов и ацетонитрила.

Зависимость времени удерживания карбоновых кислот, находящихся в гемоконсервантах, инфузионных растворах, а также в лекарственных растениях от концентрации органических растворителей представлена в табл. 1.

Как и ожидалось, времена удерживания изученных слабоудерживаемых и среднеудерживаемых кислот изменяются не столь сильно, как это могло наблюдаться для сильноудерживаемых кислот (для алифатических, начиная с капроновой).

Таблица 1. Изменение времени удерживания (мин) органических кислот в зависимости от концентрации органического модификатора (элюент: 5 мМ раствор бензойной кислоты, колонка: 8 x 300 мм, Aminex Q-15S, скорость подачи элюента $F = 0,7$ мл/мин)

Кислота	без модификатора	ацетонитрил		изопропанол	
		5%	10%	5%	10%
Лимонная	7,3	7,1	6,7	7,2	6,9
Уксусная	15,5	14,7	14,2	14,8	14,7
Фумаровая	13,1	12,2	11,7	12,9	12,5
Малеиновая	6,9	6,7	6,5	6,8	6,6
Аскорбиновая	10,0	9,3	8,8	9,4	9,1
Янтарная	14,7	14,1	13,8	13,9	13,8
Яблочная	8,2	8,0	7,6	8,1	7,8
Щавелевая	5,0	4,8	4,6	4,9	4,8

Пределы обнаружения органических кислот, находящихся в инфузионных растворах и гемоконсервантах, представлены в табл. 2. Хроматограмма модельной смеси карбоновых кислот представлена на рис. 3.

Таблица 2. Пределы обнаружения органических кислот.

Кислота	Предел обнаружения, мг/л
Лимонная	7,0
Уксусная	26,0
Фумаровая	3,0
Малеиновая	0,3

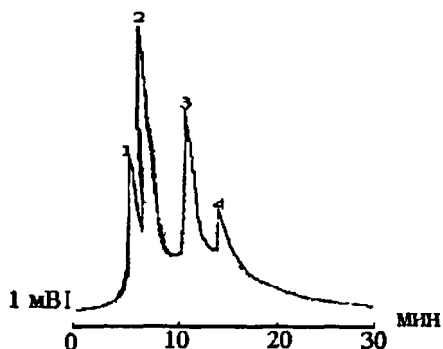


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси карбоновых кислот: 1 - maleиновая; 2 - лимонная; 3 - фумаровая; 4- уксусная. Детектор-кондуктометрический. Элюент: 5мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0.7 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (8x300 мм).

На сорбенте Aminex Q-15S было исследовано взаимное влияние не только кислот, входящих в состав гемоконсервантов и инфузионных растворов, но и кислот, обнаруженных нами в составе лекарственных растений. Полученные данные приведены в табл. 3.

Таблица 3. Кратность избыточных количеств кислот, не мешающих определению карбоновых кислот (элюент: 5 мМ раствор бензойной кислоты, колонка: 8 x 300 мм, Aminex Q-15S)

Кислота	Лим.	Укс.	Фум.	Мал.	Аск.	Янт.	Ябл.
Лимонная	-	1200	>300	40	1500	1000	>300
Уксусная	400	-	150	250	100	80	450
Фумаровая	>300	>400	-	200	800	50	500
Малеиновая	40	800	>200	-	500	1500	100
Аскорбиновая	200	100	400	300	-	250	300
Янтарная	400	500	50	800	450	-	500
Яблочная	150	800	1000	100	800	100	-

Как видно из данных таблицы, недостаточно хорошо разделяются при данных условиях янтарная и фумаровая кислоты, играющие важную роль в фармакологии лекарственных растений. Для их лучшего разделения использовали УФ-детектирование и H₂SO₄ в качестве элюента. Это помогало и отделению оксалат-иона от неорганических кислот, что также важно при изучении состава лекарственных растений.

Цитратсодержащие гемоконсерванты

В качестве объектов исследования было выбрано несколько цитратсодержащих гемоконсервантов, выпускаемых отечественной промышленностью. Состав гемоконсервантов следующий: "Циглюфад": глюкоза безводная 30 г; кислота лимонная 1,365 г; гидроцитрат натрия двузамещенный 14 г; натрий фосфорнокислый 12-водный 7,5 г; аденин 0,34 г; вода до 1 л. "Глюгигир": гидроцитрат натрия двузамещенный 20 г; глюкоза безводная 30 г; вода до 1 л. ЦФА: лимонная кислота 3,27 г, цитрат натрия 31,94 г; натрий фосфорно-кислый однозамещенный 2-водный 2,51 г; глюкоза моногидрат 31,90 г; аденин 0,275 г; вода до 1 л. ЦФГ: лимонная кислота 3,27 г; цитрат натрия 31,94 г; натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный - 2,51 г; глюкоза моногидрат 25,5 г; вода до 1 л.

Из приведенного состава исследованных препаратов видно, что все растворы, кроме "Глюгигира" содержат фосфат-ион, который, однако, не мешает определению цитрат-иона, т.к. не удерживается в колонке. Для препарата "Циглюфад" фосфат-иону соответствует первый пик на хроматограмме (рис. 4). Для "Глюгигира" этот пик отсутствует, т.к. данный препарат в своем составе не содержит фосфата.

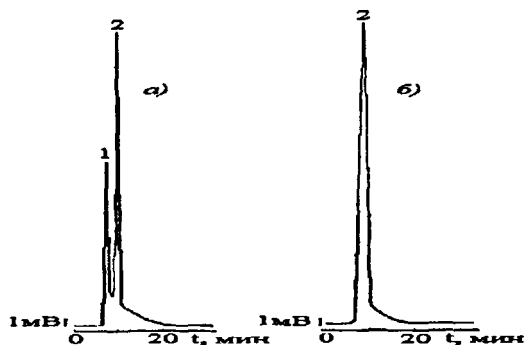


Рис. 4. а) Типичная хроматограмма раствора «Циглюфад»; б) Типичная хроматограмма раствора «Глюгигир». 1 - фосфорная кислота; 2 - лимонная кислота. Детектор - кондуктометрический. Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0,7 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (8х300 мм).

Линейность градуировочного графика для лимонной кислоты соблюдалась в очень широком диапазоне концентраций: 10 4- 5000 мг/л. Исходя из полученного диапазона линейности, пробы растворов "Глюгигир" и "Циглюфад" готовили десятикратным разбавлением препарата в деионизованной воде. В этом случае определяемая концентрация цитрат-ионов находится в области линейности градуировочного графика. Известно, однако, что уменьшение объема вводимой пробы может позволить работать с концентрированными растворами без изменения чувствительности прибора. Исходя из того, что изучаемые нами гемоконсерванты содержат большое количество лимонной кислоты (как в чистом виде, так и в виде солей), были проведены исследования по уменьшению объема петли крана-дозатора для прямого ввода пробы без разбавления. Показано, что петли объемом 20 мкл позволяют работать с концентрированными растворами (до 30 г/л в пересчете

на безводную лимонную кислоту) без изменения чувствительности прибора (рис. 5). Используя 8-ходовой кран-дозатор, можно одновременно работать с двумя петлями разных объемов для определения как макро-, так и микрокомпонентов.

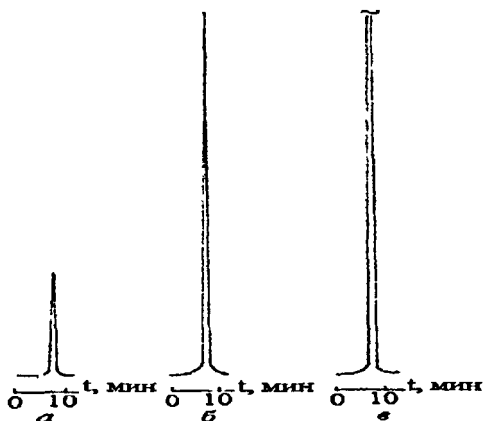


Рис. 5. Хроматограмма раствора "Глюгидр", полученная с использованием петли крана-дозатора объемом 20 мкл (а); 50 мкл (б); 100 мкл (в). Детектор - кондуктометрический. Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0.7 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (8x300 мм).

Было проведено сравнение воспроизводимости результатов анализа при использовании крана-дозатора малого (20 мкл) и стандартного (100 мкл) объемов на примере препарата "Глюгидр".

При использовании крана-дозатора объемом 100 мкл образец раствора разбавлялся в отношении **1:10** и подвергался хроматографированию 7 раз в идентичных условиях. Относительное стандартное отклонение (S_r) составило 0,007.

При использовании крана-дозатора объемом 20 мкл неразбавленный образец раствора хроматографировался аналогичным образом. Относительное стандартное отклонение (S_r) составило 0,008.

При сравнении результатов анализов, полученных с использованием крана-дозатора объемом **100** мкл и 20 мкл видно, что во втором случае воспроизводимость практически не уступает воспроизводимости, наблюдающейся при применении крана-дозатора объемом **100** мкл и соответствующем разбавлении раствора.

Инфузионный раствор "Мафусол"

Из органических кислот, в состав данного препарата входит фумаровая, представленная в виде натриевой соли. Состав инфузионного раствора "Мафусол" следующий: хлорид натрия 6,0 г, хлорид калия 0,3 г, хлорид магния безводный 0,12 г; фумарат натрия 14,0 г; вода до 1 л.

Нами установлено, что в диапазоне концентраций 20 - 250 мг/л для фумаровой кислоты соблюдается линейность градуировочного графика,

поэтому пробы для анализа готовили стократным разбавлением препарата в деионизованной воде. Стандартный раствор готовили растворением фумаровой кислоты (ч.д.а.) в деионизованной воде.

Типичная хроматограмма, полученная при анализе образцов раствора "Мафусол", представлена на рис. 6.

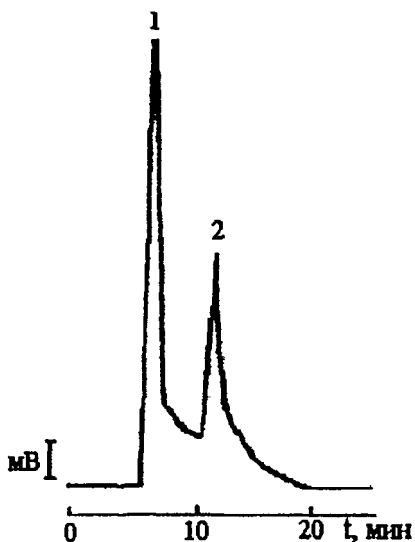


Рис. 6. Типичная хроматограмма раствора «Мафусол».

1 - хлорид-ион; 2 - фумарат-ион. Детектор - кондуктометрический. Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0,7 мл/мин. Колонка: AminexQ-15S (8x300 мм).

Первый пик на хроматограмме отражает наличие хлорид-ионов, его появление соответствует времени прохождения несорбируемых компонентов пробы. Наличие хлорид-ионов не мешает качественному и количественному определению фумарат - ионов. Время удерживания фумаровой кислоты составляет 13,1 мин при скорости подачи элюента 0,7 мл/мин. S_r определения фумарата натрия составило 0,015.

Известно, что пространственным изомером фумаровой кислоты является токсичная малеиновая кислота, присутствие которой в фармацевтических препаратах даже в малых количествах недопустимо. Нами проведено исследование возможности разделения этих двух органических кислот на используемом в данной работе сорбенте. Хроматограмма показывает (рис. 7), что времена удерживания этих кислот значительно различаются и составляют, соответственно, 6,9 и 13,1 мин для малеиновой и фумаровой кислот.

Предел обнаружения малеиновой кислоты для данного прибора составляет 0,3 мг/л, что существенно ниже ее допустимой концентрации, равной 1 мг/л. Таким образом, метод ИЭХ дополнительно позволяет надежно контролировать чистоту препарата от возможного загрязнения токсичным изомером фумаровой кислоты.

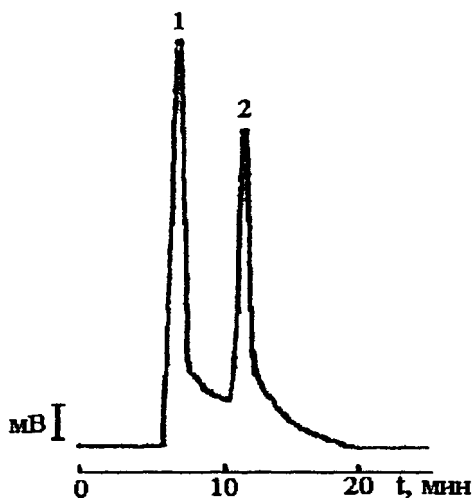


Рис. 7. Хроматограмма модельной смеси малеиновой и фумаровой кислот.

1 - малеиновая кислота; 2 - фумаровая кислота.
 Детектор - кондуктометрический.
 Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0.7 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (8x300 мм).

Инфузионный раствор "Рингера - ацетат"

Данный препарат имеет следующий состав: хлорид натрия 5,91 г; хлорид калия 0,30 г; хлорид кальция безводный 0,22 г; хлорид магния безводный 0,095 г; ацетат натрия безводный 2,82 г; вода до 1 л.

Типичная хроматограмма, полученная при анализе раствора "Рингера - ацетат", представлена на рис. 8.

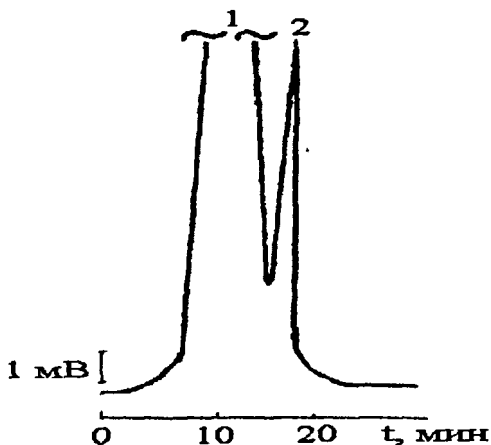


Рис. 8. Типичная хроматограмма раствора «Рингера-ацетат».

1 - хлорид-ион; 2 - ацетат-ион. Детектор - кондуктометрический.
 Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0.7 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (8x300 мм).

Время удерживания ацетат - ионов составляет 15,5 мин. Как и в случае других инфузионных растворов и гемоконсервантов, первый пик соответствует неорганическим анионам. Наличие хлорид - ионов не мешает определению ацетат - ионов.

Линейность градуировочного графика для уксусной кислоты соблюдалась в очень широком диапазоне концентраций: 30 - 3200 мг/л. При анализе данного раствора разбавление не потребовалось, т.к. определяемая концентрация ацетат - ионов находится в области линейности градуировочного графика.

Плазмозаменитель "Альбумин"

Раствор альбумина 10% готовится из человеческой крови, свободной от вирусов СПИДа и гепатита, путем ее фракционирования. В 100 мл 10% раствора содержится 10 г белка. Растворы альбумина - плазмозаменители. Альбумин - природный белок, являющийся составной частью белковой фракции крови человека. Молекулярная масса альбумина - 69000 дальтон. В нормальной плазме человеческой крови примерно 60% составляет альбумин. В состав белковой молекулы альбумина входят все 20 аминокислот. Альбумин в организме выполняет ряд функций. Основная из них - поддержание коллоидно-онкотического давления крови.

Раствор альбумина 10% является эффективным средством коррекции гипоальбуминемии различного генеза, восстановления коллоидно-онкотического давления, нарушенной центральной и периферической гемодинамики, водно - электролитического равновесия, способствует лучшему усвоению лекарственных средств, обладает дезинтоксикационными свойствами.

Состав раствора "Альбумин 10%" следующий: альбумина 100 г; натрия каприловокислого 3,0 г; натрия хлорида 9,0 г, воды до 1 л.

С хроматографической точки зрения нас интересовало определение каприлата натрия, который выступает в данном препарате в качестве стабилизатора, предохраняя белок от свертывания. Каприлат натрия является токсичным веществом, поэтому его надежное определение весьма важно для контроля качества данного препарата на предмет превышения концентрации каприлата выше допустимых значений.

Каприловая кислота имеет длинный алкильный радикал (C8) и является сильноудерживаемой. Гидрофобные взаимодействия весьма затрудняют ее прохождение по хроматографической колонке. Литературных данных по определению этой кислоты методом ИЭХ не обнаружено.

Поскольку для определения сильноудерживаемых ароматических кислот мы использовали сорбент Aminex A5 и элюент H_2SO_4 , для каприловой кислоты мы выбрали такие же хроматографические условия. Анализ проводился на приборе "Kontron-430A" (Италия) с УФ - детектором ($\lambda = 210$ нм). Концентрация серной кислоты составляла 20 мМ.

Время удерживания 45,3 мин, наблюдаемое при скорости потока 1,2 мл/мин, приемлемо и именно при этой скорости подачи элюента мы проводили свои исследования.

Для оценки воспроизводимости результатов анализа раствор "Альбумин 10%" серии 11 02 2000 ("Имбио", Нижний Новгород) был подвергнут 7-кратному хроматографированию. Относительное стандартное отклонение определения каприлата натрия составило 0,065.

Несмотря на то, что время удерживания 45,3 мин для столь сильноудерживаемой кислоты, как каприловая, не является чрезмерно большим, воспроизводимость измерений была не слишком высока для практических нужд (рекомендации для службы контроля качества промышленных образцов). Обычно эту проблему удается решить добавлением в элюент органических модификаторов, т.к. уменьшение времени удерживания и улучшение формы пика повышают воспроизводимость. В нашем случае добавление в элюент 10% ацетонитрила уменьшило время удерживания до 37,6 мин. Данные по воспроизводимости определения каприлата натрия представлены в табл. 4. Как и ожидалось, наблюдалось уменьшение воспроизводимости с 0,065 до 0,046 по сравнению с измерениями, сделанными для элюента без добавки органического растворителя.

Таблица - 4. Воспроизводимость результатов определения каприлата натрия методом ИЭХ в образцах раствора "Альбумин 10%" при использовании элюента с добавлением органического модификатора (элюент 20 мм серная кислота + 10% ацетонитрила, колонка 6x250 Aminex A5, УФ-детектор, $\lambda = 210$ нм)

Найденная концентрация каприлата натрия, г/л	Метрологические характеристики
2,9	$\bar{X} = 3,0$
3,1	$S^2 = 0,019$
2,8	$S = 0,138$
3,1	$S_x = 0,046$
3,0	$\bar{X} \pm \frac{t(P; f) \cdot S}{\sqrt{n}} = 3,0 \pm 0,1$
3,1	
2,8	

где: $t(0,95; 6) = 2,447$; $\sqrt{n} = \sqrt{7} = 2,646$.

Предел обнаружения каприловой кислоты составил 80 мг/л, что значительно превышает пределы обнаружения, найденные для также сильноудерживаемых ацетилсалициловой, бензойной и салициловой кислот.

Типичная хроматограмма, полученная при анализе раствора "Альбумин 10%" представлена на рис. 9. Первый пик соответствует прохождению хлорид-иона, второй - каприлат-иона.

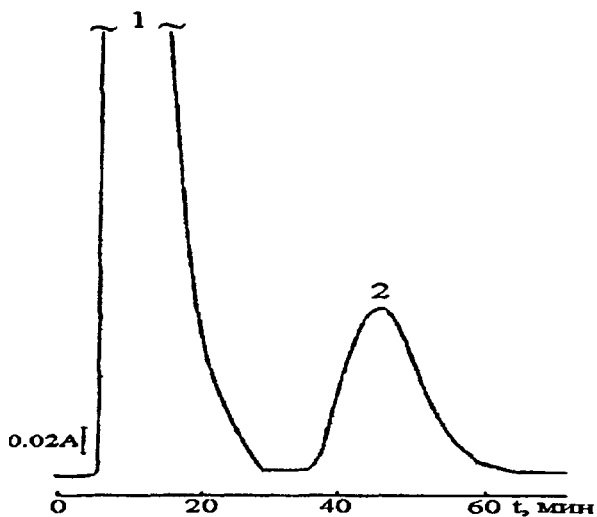


Рис. 9. Типичная хроматограмма раствора «Альбумин 10%». 1 - хлорид-ион; 2 - каприлат-ион. Детектор - УФ, длина волны - 210 нм. Элюент: серная кислота 20 мМ. Скорость подачи элюента - 1.2 мл/мин. Колонка: Aminex A5 (6x250 мм).

Препараты на основе ацетилсалициловой кислоты

Ацетилсалициловая- кислота является новым объектом для ИЭХ, публикации по ее определению отсутствуют.

Родственными ей кислотами являются бензойная и салициловая, они могут быть потенциальными загрязнителями препаратов на основе ацетилсалициловой кислоты, поэтому проводилось комплексное изучение всех трех кислот методом ИЭХ.

Хроматограмма модельной смеси данных кислот приведена на рис 10.

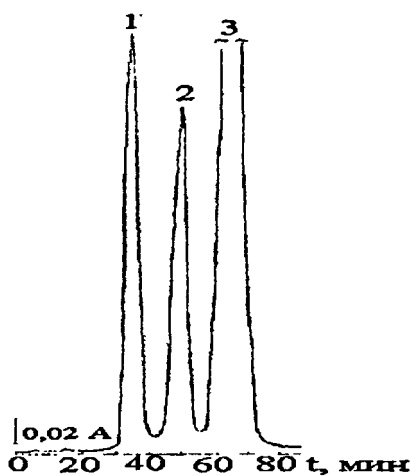


Рис. 10. Хроматограмма модельной смеси кислот.

1 - ацетилсалициловая; 2 - бензойная; 3 - салициловая. Детектор - УФ, длина волны - 210 нм. Элюент: серная кислота 20 мМ. Скорость потока - 0.8 мл/мин. Колонка: Aminex A5 (6x250 мм).

Бензойная и салициловая кислоты традиционно считаются сильноудерживаемыми, что объясняется значительным взаимодействием между бензольным кольцом этих кислот и стиролдивинилбензольной матрицей сорбента. Неизбежным следствием этого является увеличение времени анализа, которое обычно снижают за счет добавления в элюент органических модификаторов. Влияние таких добавок изучалось и в нашей работе.

Для исследования данных кислот нами был выбран сорбент Aminex A5 с элюентом 20 мМ H_2SO_4 и УФ-детектированием. Однако, чтобы продемонстрировать возможность определения ацетилсалициловой кислоты с применением кондуктометрического детектора, были проведены измерения на приборе "Цвет 3006".

Предел обнаружения ацетилсалициловой кислоты при работе на хроматографе "Цвет 3006" составил 50 мг/л, время удерживания при скорости подачи элюента (5 мМ бензойная кислота) 0,7 мл/мин составило 60,2 мин.

При работе на приборе "Kontron-430A" с серной кислотой в качестве элюента и УФ -детектором удалось достигнуть значительно более низкого предела обнаружения для ацетилсалициловой кислоты - 5,0 мг/л.

Актуальной задачей представляется уменьшение времени удерживания ацетилсалициловой кислоты. Помимо добавления органических модификаторов, общеизвестным способом снижения времени анализа является увеличение скорости подачи элюента.

В качестве органических добавок были выбраны ацетонитрил и изопропанол в концентрациях 5 и 10%. Зависимость времени удерживания ацетилсалициловой кислоты от скорости подачи элюента и наличия органической добавки представлена в табл. 5.

Таблица 5. Зависимость времени удерживания (мин) ацетилсалициловой кислоты от скорости подачи элюента и концентрации органических модификаторов (детектор -УФ, $\lambda = 210$ нм, элюент 20 мМ H_2SO_4 , колонка 6 x 250 мм, Aminex A5)

Скорость подачи элюента	Без модификатора	С модификатором			
		изопропанол		ацетонитрил	
		5%	10%	5%	10%
0,8	36,0	24,8	20,0	22,2	18,1
1,0	32,5	22,3	16,9	16,3	15,9
1,2	29,2	18,2	14,4	13,9	13,3

Из представленных данных видно, что ацетонитрил является более эффективной органической добавкой, чем изопропанол. Такая же закономерность наблюдалась для бензойной и салициловой кислот.

Интервал линейности градуировочных графиков (сорбент Aminex A5, элюент 20 мМ H_2SO_4 , $\lambda = 210$ нм) для изученных кислот следующий:

Ацетилсалициловая	30 - 300 мг/л
Салициловая	20 - 350 мг/л
Бензойная	30 - 250 мг/л

Пределы обнаружения для бензойной и салициловой кислот, являющихся потенциальными загрязнителями, составили 10 мг/л и 8 мг/л соответственно. Это достаточно низкие пределы обнаружения, позволяющие надежно гарантировать чистоту препаратов на основе ацетилсалициловой кислоты от нежелательных примесей.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при добавлении в элюент 10% ацетонитрила и увеличении скорости потока время удерживания ацетилсалициловой кислоты сокращается до вполне приемлемого времени - 13,3 мин. Учитывая это, а также минимальную пробоподготовку для анализируемых лекарственных препаратов, можно признать, что метод ИЭХ является оптимальным для определения этой кислоты в различных лекарственных формах.

Среди исследованных лекарств, содержащих ацетилсалициловую кислоту, были "Цитрамон", "Аскофен", "Новоцефальгин", "Асфен", а также не содержащий мешающих примесей "Аспирин". Состав этих лекарственных средств следующий: "Цитрамон": кислота ацетилсалициловая 0,25 г, фенацетин 0,18 г; кофеина моногидрат 0,03 г, какао 0,015 г, кислота лимонная 0,02 г; "Аскофен": кислота ацетилсалициловая 0,2 г, фенацетин 0,2 г; кофеин 0,04 г, "Новоцефальгин": кислота ацетилсалициловая 0,3 г, фенацетин 0,2 г, кофеин 0,03г; "Асфен": кислота ацетилсалициловая 0,25 г, фенацетин 0,15 г. "Аспирин": кислота ацетилсалициловая 0,25 г.

Лекарственные растения

Лекарственные растения содержат биологически активные вещества (эфирные масла, смолы, витамины, карбоновые кислоты, алкалоиды, гликозиды и т.д.), сырье их разрешено применять в медицинской практике. Из 20000 высших растений флоры нашей страны в медицине разрешено применять около 300 видов. Ассортимент наиболее массовых ежегодных заготовок составляет 140 наименований.

Наиболее часто растительное лекарственное сырье применяется в виде настоев и отваров, которые представляют собой водные вытяжки из лекарственного сырья.

Публикаций по исследованию лекарственных растений методом ИЭХ чрезвычайно мало. Работ, исследующих какое-либо значительное число видов лекарственных растений, не найдено вовсе. По-видимому, это частично связано с тем, что не совсем ясна роль отдельных карбоновых кислот в лекарственных свойствах некоторых растений, поэтому кроме чисто аналитических задач нами была поставлена задача проследить корреляции между содержанием каких-либо карбоновых кислот и фармакологическими свойствами отдельных лекарственных растений или групп таких растений. Исходя из этого, выборка лекарственных растений должна быть достаточно большой, и число исследованных нами растений было около сорока. Среди них были наиболее известные, часто употребляемые лекарственные растения (зверобой, пустырник, эвкалипт, шалфей и др.), но были и более редкие растения.

Работу проводили на приборе "Цвет 3006" с кондуктометрическим детектором на сорбенте AminexQ-15S с 5 мМ раствором бензойной кислоты в

качестве элюента, кроме тех случаев, когда требовалось лучшее разделение кислот, имеющих близкие времена удерживания (такие, как щавелевая и неорганические кислоты - янтарная и фумаровая). В таких случаях настои и отвары растений исследовались на приборе "Kontron" на сорбенте Aminex A5 при использовании УФ- детектора ($\lambda = 210$ нм). В частности, на сорбенте Aminex Q-15S невозможно было получить разделение щавелевой кислоты и неорганических кислот, тогда как и та, и другие в значительных количествах присутствуют практически во всех лекарственных растениях. Эта задача решалась при параллельном измерении на приборе "Kontron", т.к. времена удерживания неорганических кислот и щавелевой кислоты составляли, соответственно, 2,3 и 7,5 мин ($F = 0,8$ мл/мин). Неорганические ионы не удерживаются на колонке.

Мы ограничили свою задачу определением только алифатических кислот. Это связано с тем, что составив "банк" характерных профилей хроматограмм многих лекарственных растений, можно, помимо количественного определения веществ, заявленных в "Фармакопее", попытаться идентифицировать подлинность сырья, ориентируясь не только на внешние признаки, но и владея инструментальными методами анализа.

Качественный и количественный состав десяти наиболее известных лекарственных растений представлен в табл. 6. При этом содержание карбоновых кислот было пересчитано, как это принято в фармакогнозии, в % массы от массы сухого сырья. Как видно из таблицы, в составе абсолютно всех лекарственных трав обнаружена щавелевая кислота, содержание которой меняется от 2,2 до 5,7%.

Практически во всех лекарственных растениях обнаружена лимонная кислота, ее содержание меняется от 0,5 до 3,2%.

Также одной из характерных кислот является яблочная, содержание которой меняется от 0,4 до 5,2%.

Помимо указанных в таблице кислот, в нескольких растениях была обнаружена уксусная кислота: в валериане - 1,2%, в бузине - 0,9%, в листьях сенны - 1,2%, в солодке - 0,8%, в почках березы - 1,0%.

Валериановая кислоты была найдена в валериане лекарственной (1,3%), в бузине (1,0%), в крушине (0,6%).

Что касается корреляций между фармакологическим действием лекарственных растений и содержанием в них карбоновых кислот, удалось выявить следующие закономерности: растения, обладающие противовоспалительным действием обычно содержат аскорбиновую кислоту (шалфей лекарственный, зверобой продырявленный, ромашка аптечная, эвкалипт прутовидный, чистотел большой, душица обыкновенная, почки березы, толокнянка, мята перечная), причем часто в сочетании с янтарной (шалфей, зверобой, мята, чистотел, эвкалипт). Известно, что янтарная кислота входит в цикл Кребса. Лимонная кислота также входит в цикл Кребса и стоит в самом начале цепочки биохимических превращений. Можно предположить, что наличие в лекарственных растениях важнейших карбоновых кислот, входящих в цикл Кребса, стимулирует, в первую очередь, обменные процессы.

Таблица 6. Содержание карбоновых кислот (в % от массы сухого сырья)
в различных лекарственных растениях ($S_r \leq 0,04$; $P=0,95$; $n=5$)

Лекарственное растение, фармакологическое действие	Содержание карбоновых кислот						
	Лимон- ная	Щаве- левая	Яблоч- ная	Вин- ная	Аскорб- иновая	Янтар- ная	Фузма- ровая
1	2	3	4	5	6	7	8
Пустырник сердечный (<i>Leonurus cardiaca</i>) – седативное	0,7	3,5	0,9	-	-	-	-
Шалфей лекарствен- ный (<i>Salvia officinalis</i>) – противовоспали- тельное	1,2	4,0	1,1	-	7,7	5,8	-
Зверобой продыряв- ленный (<i>Hypericum perforatum</i>) – вяжущее и проти- вовоспалительное	1,1	3,2	0,8	-	4,1	5,2	-
Ромашка аптечная (<i>Chamomilla recutita</i>) – противовоспали- тельное	2,3	4,7	2,2	-	1,2	-	1,8
Малина (<i>Rubus idaeus</i>) – потогонное и жаропонижающее	2,4	4,2	0,9	1,9	5,7	-	-
Боярышник сглажен- ный (<i>Crataegus laevigata</i>) – кардиотоническое	0,8	3,9	1,2	-	2,0	-	-
Валериана лекарственная (<i>Valeriana officinalis</i>) – седативное	0,4	3,5	0,4	-	2,3	-	0,9
Эвкалипт прутовид- ный (<i>Eucalyptus viminalis</i>) – противо- воспалительное	1,2	4,0	0,9	-	6,8	3,7	-
Чистотел большой (<i>Chelidonium majus</i>) – противовоспалительно е и желчегонное	1,5	5,0	1,8	-	8,5	6,0	-
Подорожник большой (<i>Plantago major</i>) – отхаркивающее, проти- вовоспалительное	2,2	4,2	-	-	-	-	-

Аскорбиновая кислота является чрезвычайно редкой при ИЭХ исследованиях. Чтобы восполнить этот дефицит информации, мы определили некоторые из аналитических характеристик ИЭХ определения этой кислоты, учитывая ее распространенность и специфическое действие в лекарственных растениях. Время удерживания ее при скорости потока 0,8 мл/мин составило 11,2 мин ("Цвет 3006"). Предел обнаружения составил 40 мг/л. Линейность градуировочного графика соблюдалась в диапазоне 50 - 1200 мг/л.

Как было сказано ранее, для фумаровой и янтарной, щавелевой и неорганических кислот, мы проводили исследования на приборе "Kontron-430A" с УФ-детектором. Типичная хроматограмма отвара валерианы лекарственной, полученная на этом приборе, представлена на рис. 11.

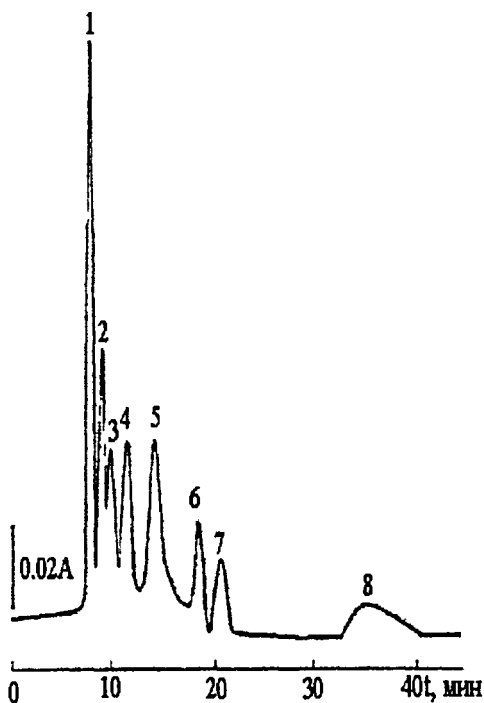


Рис. 11. Типичная хроматограмма отвара валерианы лекарственной.

1 - неорганические кислоты; 2 - щавелевая; 3 — лимонная; 4 - яблочная; 5 - аскорбиновая; 6 - фумаровая; 7 - уксусная; 8 - валериановая.

Детектор - УФ, длина волны — 210 нм. Элюент: серная кислота 20 мМ. Скорость потока — 0,8 мл/мин. Колонка: Aminex A5 (6x250 мм).

Как видно из хроматограммы, указанные кислоты подвергаются хорошему разделению.

Типичная хроматограмма отвара зверобоя продырявленного, полученная на приборе с кондуктометрическим детектором, представлена на рис. 12.

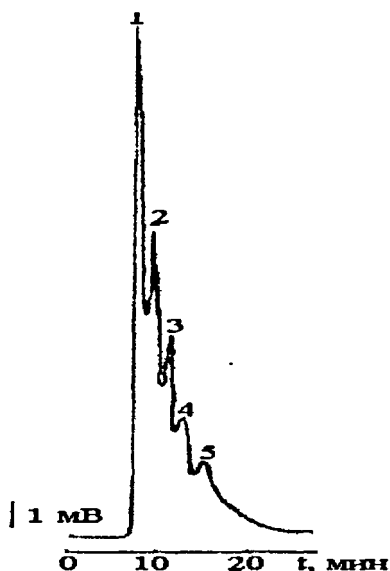


Рис. 12. Типичная хроматограмма отвара зверобоя

продырявленного.

1 - неорганические и щавелевая кислоты; 2 - лимонная; 3 - яблочная; 4 - аскорбиновая; 5-янтарная. Детектор - кондуктометрический. Элюент: 5 мМ бензойная кислота. Скорость потока - 0.7 мл/мин. Колонка: Aminex Q-15S (8x300 мм).

Необходимо заметить, что многие лекарственные травы не стандартизованы по своему химическому составу ввиду недостаточной изученности этого вопроса в ряде случаев. Поэтому метод ИЭХ мог бы стать перспективным методом стандартизации лекарственных растений по карбоновым кислотам, особенно в тех случаях, когда растения содержат в своем составе специфические кислоты, такие как аскорбиновая, янтарная, фумаровая, валериановая.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность использования метода ионоэкслюзионной хроматографии (ИЭХ) для определения биологически активных карбоновых кислот в широком спектре фармацевтических препаратов, находящихся как в жидкой, так и в твердой лекарственных формах.
2. Из 11 исследованных ИЭХ сорбентов выбраны два наиболее подходящих для эффективного и селективного разделения смесей моно-, дикарбоновых и оксикислот, а также ароматических карбоновых кислот, встречающихся в фармацевтических препаратах. Для алифатических карбоновых кислот наиболее удачным признан Aminex Q-15S (8% сшивки, размер частиц 22 ± 3 мкм, емкость 1,7 мэкв/мл, гелевого типа) при использовании кондуктометрического детектирования. Для ароматических карбоновых кислот рекомендован сорбент Aminex A5 (8% сшивки, размер частиц 13 ± 2 мкм, емкость 1,7 мэкв/мл) при использовании УФ-детектора.

3. Для каждого из указанных сорбентов выбран наиболее подходящий для аналитических целей элюент. Для сорбента Aminex Q - 15S рекомендована бензойная кислота, как имеющая наибольшее сродство к смоле. Для сорбента Aminex A5 из трех изученных минеральных кислот (серная, фосфорная, соляная) сделан выбор в пользу серной кислоты, как дающей наилучшее разделение и не обладающей нежелательными эффектами (комплексобразование, коррозионная активность).
4. Методом ИЭХ проведен количественный анализ лекарственных препаратов на основе ацетилсалициловой кислоты. Найдены аналитические характеристики метода при использовании УФ-детектора. Показана возможность селективного определения ацетилсалициловой кислоты в присутствии бензойной и салициловой кислот.
5. Проведено сравнительное изучение влияния органических модификаторов (ацетонитрил, изопропанол), добавленных в элюент, на удерживание этих трех кислот. Показано, что для ацетилсалициловой кислоты, которая является наиболее гидрофобной, добавление органических модификаторов снижает время удерживания в наибольшей степени.
6. Найдены аналитические характеристики метода ИЭХ с кондуктометрическим детектированием для определения кислот, входящих в состав гемоконсервантов и инфузионных растворов.
7. Показана возможность ИЭХ определения больших количеств лимонной кислоты (до 30 г/л) в цитратсодержащих гемоконсервантах при введении пробы без разбавления и использовании крана-дозатора малого объема (20 мкл). Воспроизводимость результатов определения при этом остается хорошей.
8. Методом ИЭХ с кондуктометрическим и УФ-детектированием идентифицированы и количественно определены в водных настоях и отварах лекарственных растений биологически активные карбоновые кислоты, в том числе: одноосновные (уксусная, валериановая), двухосновные (шавелевая, янтарная), оксикислоты (яблочная, лимонная, винная), дикарбоновые кислоты этиленового ряда (фумаровая), а также аскорбиновая кислота. Проведена корреляция между фармакологическим действием лекарственных растений и содержанием в них карбоновых кислот. Установлено, что растения, обладающие противовоспалительным действием, обычно содержат аскорбиновую кислоту, причем часто в сочетании с янтарной.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях

1. Кузьменко А.Н., Панов В.П., Иванов А.А., Шпигун О.А., Евграфов А.А., Решетняк В.Ю., Попков В.А. Определение цитрат- и ацетат-ионов в гемоконсервантах и инфузионных растворах методом ион-эксклюзионной хроматографии.//Хим.-фарм. журнал. 2002.Т.36. №7. С. 44-47.
2. Кузьменко А.Н., Евграфов А.А., Решетняк В.Ю., Иванов А.А., Панов В.П. Определение ацетат-иона в инфузионных растворах методом ион-эксклюзионной хроматографии. /ЛХ Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Москва, 8-12 апреля 2002. Тез. Докл.:Москва, 2002. С. 644.
3. Кузьменко А.Н., Евграфов А.А., Решетняк В.Ю., Иванов А.А., Панов В.П. Использование метода ион-эксклюзионной хроматографии для определения цитрат-иона в растворах гемоконсервантовУЛХ Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Москва, 8-12 апреля 2002. Тез. Докл.:Москва, 2002. С. 644.
4. Кузьменко А.Н., Решетняк В.Ю., Евграфов А.А., Иванов А.А., Бендрышев А.А., Шпигун О.А. Использование метода ион-эксклюзионной хроматографии для анализа фармацевтических препаратов. //Всероссийский симпозиум "Современные проблемы хроматографии". Москва, 18-22 марта 2002. Тез. Докл.: Москва, 2002, С. 129.
5. Кузьменко А.Н., Панов В.П., Иванов А.А., Шпигун О.А., Попков В.А., Решетняк В.Ю., Евграфов А.А. Определение фумарат-ионов в инфузионном растворе "Мафусол" методом ион-эксклюзионной хроматографииУ/Хим.-фарм. журнал. 2002. Т.36. №10. С.51-52.
6. Kuzmenko A.N., Ivanov A.A., Shpigun O.A., Popkov V.A., Reshetnyak V.Yu., Evgrafov A.A. "Application of ion-exclusion chromatography for the analysis and quality control of pharmaceutical formulations"V/3rd International Symposium on Separations in Bio Sciences. Moscow, Russia, 13-18 May 2003. Abstracts. P. 170
7. Кузьменко А.Н., Иванов А.А., Евграфов А.А., Решетняк В.Ю., Попков В.А., Федосеев Е.Е. Исследование химического состава лекарственных растений методом ион-эксклюзионной хроматографии.//X Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Москва, 7-11 апреля 2003. Тез. докл.: Москва, С. 726.
8. Кузьменко А.Н., Панов В.П., Иванов А.А., Шпигун О.А., Попков В.А., Решетняк В.Ю., Евграфов А.А., Определение каприлат-ионов в препарате крови "Раствор альбумина 10% для инфузий" методом ион-эксклюзионной хроматографии. //Хим.-фарм. журнал. 2004. Т.38. № 5. С.45-47.

Отпечатано в копицентре
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.
www.stprint.ru e-mail: zakaz@stprint.ru тел 939-3338
Заказ № 133 тираж 100 экз. Подписано в печать 17.05.2004 г.

№ 10390