

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи

СИЛАЕВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ХЕМОМЕТРИЧЕСКИХ АЛГОРИТМОВ**

1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Русанова Татьяна Юрьевна

Саратов 2023

Работа выполнена на кафедре аналитической химии и химической экологии
ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. Некоторые распространенные хемометрические алгоритмы	12
1.2. Применение хемометрических алгоритмов в анализе лекарственных препаратов ...	20
1.2.1 Анализ лекарственных препаратов с одним действующим веществом	20
1.2.2. Анализ лекарственных препаратов с двумя действующими веществами	25
1.2.3. Анализ трехкомпонентных лекарственных препаратов.....	32
1.2.4. Анализ лекарственных препаратов содержащих четыре и более действующих вещества.....	36
1.3 Применение производной спектрофотометрии, хемометрических алгоритмов в определении синтетических красителей и лекарственных веществ	39
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	50
2.1. Реактивы, посуда, оборудование	50
2.2 Объекты исследования	52
2.3 Методики приготовления растворов.....	59
ГЛАВА 3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И НАПИТКАХ.....	63
3.1 Анализ бинарных смесей синтетических пищевых красителей	64
3.1.1 Определение красителей E110 и E124 методом Фирордта и производной спектрофотометрии.....	65
3.1.2 Определение E110 и E124 в модельной смеси с использованием хемометрических алгоритмов на основе производных спектров поглощения нулевого и первого порядков	73
3.1.3 Спектрофотометрическое определение синтетических пищевых красителей E110 и E124 в пастилках «Стрепсилс»	81
3.1.4 Определение красителей E110 и E124 в напитке «Schweppes Spritz Aperitivo»	84
3.1.5. Применение хемометрических алгоритмов для спектрофотометрического определения синтетических красителей E124 и E129	85
3.1.6 Определение E110 и E122 при совместном присутствии в лекарственном препарате «Трависил» методом производной спектрофотометрии.....	87
3.1.7 Определение красителей E102 и E110 в напитках «YES!Fruit» и «Fresh Orange» с предварительной выделением на магнитных наночастицах	91
3.2 Анализ трехкомпонентных смесей синтетических пищевых красителей	95

ГЛАВА 4. СПЕКТРОФОТОМЕЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ МНОГОМЕРНОЙ КАЛИБРОВКИ.....	105
4.1 Спектрофотометрическое определение некоторых β -лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры.....	105
4.2 Спектрофотометрическое определение АФИ в глазных каплях с использованием ПЛС и РГК	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
Список литературы	122

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ДВ – действующее вещество;

ВВ – вспомогательное вещество;

ЛП – лекарственный препарат;

АФИ – активный фармацевтический ингредиент;

СПК – синтетический пищевой краситель;

MLR (МЛР) – Multiple Linear Regression (Множественная линейная регрессия);

CLS (МНК) – Classical Least Squares (Метод наименьших квадратов);

ILS (ОНК) – Inverse Least Squares (Метод обратных наименьших квадратов);

PCA (МГК) – Principal Components Analysis (Метод главных компонент);

PCR (РГК) – Principal Component Regression (Регрессия на главные компоненты);

PLS (ПЛС) – Partial Least Squares (Метод проекции на латентные структуры);

ANN (ИНС) – Artificial Neural Networks (Искусственные нейронные сети);

GA (ГА) – Genetic Algorithm (Генетический алгоритм);

GA-SRACLS (ГА-МНКРСО) – Genetic algorithm – spectral residual augmented classical least squares (Генетический алгоритм, совмещенный с методом наименьших квадратов и расширенными спектральными остатками);

CRACLS (МНКОК) – Concentration Residuals Augmented Classical Least Squares (Метод наименьших квадратов, дополненный остатками концентраций);

SCG (МСГ) – Scaled Conjugate Gradient (Масштабированный сопряженный градиент);

MILCA (АЗКВИ) – Mutual Information Least Dependent Component Analysis (Анализ наименее зависимых компонентов взаимной информации);

RMSEC – Root Mean Square Error of Calibration (среднеквадратичная ошибка обучающего набора данных);

RMSEP – Root-Mean Square Error of Prediction (среднеквадратичная ошибка проверочного набора)

ЛФ – лекарственная форма;

0D – спектры поглощения нулевой производной;

1D – спектры поглощения первой производной;

MCR-ALS (PMK-НМК) – Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (разрешения многомерной кривой с чередованием метода наименьших квадратов);

SRACLS (МНКРСО) – Spectral residual augmented classical least squares (Классический метод наименьших квадратов с расширенными спектральными остатками);

LS-SVM (МОВНК) – Least squares support vector machine (Метод опорных векторов наименьших квадратов);

RSEP – относительная стандартная ошибка предсказания (%)

LM (ЛМ) – Feed-forward backpropagation neural network (нейронная сеть с прямой связью и обратным распространением);

GDX (ГСИАРСО) – gradient descent with momentum and adaptive learning rate back propagation (градиентного спуска с импульсом и адаптивным обратным распространением скорости обучения);

LV (ЛП) – латентная переменная;

РС (ГК) – главная компонента;

E102 – Тартразин;

E110 – Желтый «солнечнозакатный»;

E122 – Азорубин;

E124 – Понсо 4R;

E129 – Красный очаровательный АС;

ДИФ – Дифенгидрамина гидрохлорид;

НАФ – Нафазолина нитрат;

Cef – цефазолина натриевая соль;

Ceft – цефтриаксона натриевая соль;

Stox – цефотаксима натриевая соль;

Cefur – цефуроксима натриевая соль;

Амох – амоксициллина тригидрат.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы обусловлена необходимостью контроля качества фармацевтических препаратов, пищевых продуктов (напитков) и выявления контрафактной продукции. Широко распространенным фармакопейным методом является спектрофотометрия, применение которой, как правило, ограничено однокомпонентным анализом. Поэтому развитие новых подходов к многокомпонентному анализу сложных смесей спектрофотометрическим методом является одной из актуальных задач современной аналитической химии. Одним из главных преимуществ является совмещение дифференцирования спектров и хемометрической обработки данных. В таком комплексном аспекте предлагаемый подход является новым. Будет проведена разработка методик и их апробация на коммерческих продуктах (лекарственные препараты, напитки). Применение математических преобразований спектральных данных (дифференцирование) и их обработка хемометрическими алгоритмами (метод регрессии на главные компоненты, метод проекций на латентные структуры) позволит увеличить разрешение спектральных данных, снизить шум, выделить целевые сигналы, оптимизировать многомерные калибровки для определения активных и вспомогательных компонентов лекарственных препаратов и др. объектов анализа.

Цель диссертационной работы – разработка способов спектрофотометрического анализа многокомпонентных смесей с использованием направленно выбранных хемометрических алгоритмов.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- декомпозиция спектров поглощения модельных смесей, содержащих синтетические пищевые красители (СПК) и активные фармацевтические ингредиенты (АФИ), с использованием хемометрических алгоритмов многомерной калибровки;

- подбор оптимальных условий и определение факторов, влияющих на параметры моделирования спектров поглощения СПК и АФИ и относительную погрешность количественного анализа;
- сравнительный анализ результатов декомпозиции спектров поглощения исследуемых смесей, содержащих синтетические пищевые красители и активные фармацевтические ингредиенты, различными хемометрическими алгоритмами;
- разработка способов определения СПК и АФИ в реальных объектах (лекарственные препараты и напитки) методами производной спектрофотометрии первого порядка при «нулевом пересечении» (1D), проекции на латентные структуры (ПЛС) и регрессии на главные компоненты (РГК).

Методы исследования. Для решения поставленных в работе задач применялся метод абсорбционной молекулярной спектроскопии в видимой и УФ-области спектра и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве способов обработки спектральных данных использовали дифференцирование, метод Фирордта, хемометрические алгоритмы (регрессия на главные компоненты, проекции на латентные структуры).

Научная новизна

Оптимизированы условия спектрофотометрического определения СПК и АФИ глазных капель с использованием методов математической обработки спектров и хемометрических алгоритмов. Показано, что на параметры моделирования влияет выбор метода хемометрики, степень перекрытия спектров поглощения, условия фотометрирования, соотношение концентраций компонентов в смеси. На примере системы E110 и E124 проведено сравнение методов Фирордта, первой производной «при нулевом пересечении», РГК и ПЛС; показано, что хемометрические алгоритмы характеризуются наименьшей погрешностью определения.

Практическая значимость работы направлена на разработку новых методик спектрофотометрического определения синтетических красителей и активных фармацевтических ингредиентов (антибиотиков и компонентов глазных капель) при совместном присутствии с метрологическими характеристиками, удовлетворяющими современному уровню контроля качества лекарственных препаратов и пищевой продукции.

На защиту автор выносит:

1. Оптимальные условия регистрации и дифференцирования спектров поглощения СПК и АФИ глазных капель, а также оптимизированные условия моделирования спектров методами РГК и ПЛС.

2. Результаты моделирования спектров поглощения нулевого и первого порядков методами РГК и ПЛС; факторы, влияющие на параметры моделирования и относительную погрешность определения.

3. Сравнительный анализ различных подходов к хемометрической обработке спектральных данных.

4. Методики отдельного спектрофотометрического определения некоторых СПК в напитках и лекарственных препаратах, а также АФИ в глазных каплях.

Личный вклад автора. Автор принимал активное участие в постановке цели и задач исследования, анализе литературных данных по теме диссертации, выполнении и обработке экспериментальных исследований, обсуждении результатов работы и формулировке выводов, а также подготовке статей, тезисов докладов, выступал на научных конференциях. Диссертантом были лично выполнены эксперименты методами спектроскопии электронного поглощения. Основные экспериментальные исследования были выполнены в лабораториях Института химии ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

Степень достоверности результатов исследований подтверждается анализом литературных источников по теме диссертации, применением современных инструментальных методов исследования и анализа и

соответствием между результатами, полученными разными методами, статистической обработкой полученных данных, их апробацией на конференциях и публикацией основных положений диссертации в профильных журналах. Проверку правильности разрабатываемых методик осуществляли способами «введено-найдено» и сравнением с результатами другого метода (ВЭЖХ).

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на XXII Международной научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологии» (Тула, 2017); Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIII Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием (Саратов, 2018); XXIX Российской молодежной научной конференции с международным участием, посвященной 150-летию Периодической таблицы химических элементов «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2019); IV Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Химия: достижения и перспективы» (Ростов-на-Дону, 2019); II Всероссийской конференции с международным участием «Химия биологически активных веществ» (Саратов, 2019); III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2019); XIV Всероссийской интерактивной (с международным участием) конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2021); XXV Saratov Fall Meeting «International Symposium optics and Biophotonics» (Саратов, 2021), 13th Winter Symposium on Chemometrics (Москва, 2022), Восьмая междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 2023), IV Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии (Краснодар, 2023).

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках гранта РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90097.

Публикации. Опубликовано 13 статей из них 1 – в журналах, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science, 3 – в журналах, рекомендуемых ВАК, 9 статей в сборниках тезисов международных и Всероссийских конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 138 страницах, включая 39 рисунка и 36 таблиц. Работа состоит из введения, литературного обзора (глава I), экспериментальной части (глава II), обсуждения результатов (главы III, IV), выводов и списка цитируемой литературы, включающего 120 наименований.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Некоторые распространенные хемометрические алгоритмы

Хемометрические алгоритмы – это статистические и математические методы, применяемые для максимального сбора и извлечения полезной информации из аналитических данных [1]. Эти алгоритмы широко применяются для спектрофотометрических и других инструментальных методов для идентификации и количественного определения аналитов в сложных смесях, в том числе действующих (ДВ) и вспомогательных веществ (ВВ) в лекарственных препаратах (ЛП) [2]. Также они позволяют проводить анализ и отображение сложной химической информации, полученной в результате эксперимента, реализовать многомерную калибровку, распознавание образов, классификацию и дискриминационный анализ; моделировать процессы реакции.

За последние десятилетия произошел скачок в развитии как аппаратного оснащения, так и программного обеспечения аналитических приборов, в том числе оптических. Разработано программное обеспечение, позволяющее легко и быстро производить сложные математические вычисления результатов экспериментов, включая хемометрические алгоритмы [3, 4].

Спектрофотометрия является быстрым и недорогим аналитическим методом, подходящим для контроля качества лекарственных препаратов [5]. Определение концентрации аналита по поглощению при характерной длине волны максимума поглощения (одномерное) является распространенным, простым и общепринятым методом в спектрофотометрии. При определении двух и более компонентных систем метод прямой спектрофотометрии труднореализуем из-за перекрытия полос поглощений компонентов системы. Применение методов производной спектрофотометрии, метода Фирордта являются распространенными, но они обладают недостатками (высокие трудо- и время-затратны, требуют соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бера). Чувствительность одномерных методов к шуму также способствует

сложностям определения аналитов в многокомпонентных системах. С развитием методов множественной линейной регрессии, появилась возможность применения спектрофотометрии для анализа многокомпонентных лекарственных препаратов.

Сочетание спектрофотометрии и хемометрических алгоритмов позволяет проводить количественное определение содержания активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) как в однокомпонентных, так и многокомпонентных лекарственных препаратах, оценивать высвобождение АФИ в результате проведения теста «Растворение», а также оценивать стабильность действующих и вспомогательных веществ при хранении ЛП [4,5].

Анализ литературных данных о применении спектрофотометрии в сочетании с различными хемометрическими алгоритмами, применяемыми в анализе ЛП, приведен ниже.

Множественная линейная регрессия [multiple linear regression] (МЛР, MLR) – один из старейших методов, редко используемый в последнее время в связи с ростом вычислительной мощности современных компьютеров.

Алгоритм МЛР позволяет установить связь между поглощением при определенных длинах волн и концентрацией веществ, отсекая неинформативные длины волн. Корреляционная связь описывается уравнением:

$$Y_j = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n + f$$

где b_i – вектор регрессионных коэффициентов;

x_i – поглощение анализируемой длины волны;

f – величина ошибки.

Подбирают такие значения коэффициентов b , чтобы минимизировать f [6].

Метод наименьших квадратов [Classical Least Squares] (МНК, CLS) может использоваться только для систем с известным качественным

составом, при наличии примесей модель дает ложные результаты о концентрациях компонентов [3].

МНК включает применение множественной линейной регрессии (МЛР) к закону Бугера-Ламберта-Бера: $A=KC$, где A – матрица оптических плотностей; C – матрица концентрации; K – матрица калибровочных коэффициентов. Данный метод можно применять только к системам, в которых известны все компоненты образца. Если существует возможность наличия в объекте неизвестных веществ, которых не было в калибровочных смесях, модель не сможет точно предсказать концентрации компонентов.

Метод обратных наименьших квадратов [Inverse Least Squares] (ОНК, ILS) или калибровка p -матрицы. ОНК называется так, потому что первоначально она включала применение МЛР к обратному выражению закона спектроскопии Бугера-Ламберта-Бера: $C=PA$, где матрица A представляет матрицу оптических плотностей; C – матрица концентраций; P – матрица калибровочных коэффициентов. Поскольку достаточно знать концентрации только интересующих компонентов в обучающем наборе, метод ОНК лучше подходит для сложных анализов. Недостатки метода ОНК заключаются в том, что выбор длин волн может быть сложным и трудоемким, количество длин волн, используемых в модели, ограничено количеством калибровочных образцов, а для точной калибровки требуется большое количество образцов[3].

Метод Главных Компонент [Principal Components Analysis] (МГК, PCA) – метод реализующий существенное понижение размерности данных путем представления исходной матрицы X в виде произведения матрицы счетов T и матрицы нагрузок P , размерность которых меньше таковой для матрицы X .

$$X=TP^t+E$$

где E – это матрица остатков.

Матрица счетов представляет собой координаты образцов в новом пространстве главных компонент, а матрица нагрузок отражает влияние переменных на модель.

Регрессия на главные компоненты [Principal Component Regression] (РГК, PCR) – двухэтапный метод, который вначале реализует декомпозицию спектральных данных X методом главных компонент (МГК), а затем использует метод МЛР для уже преобразованной матрицы X . РГК является широко используемой регрессионной моделью для данных, имеющих большую степень ковариации в независимых переменных. РГК решает эту проблему путем устранения главных компонент с более низким весом, что, в свою очередь, снижает шум, присутствующий в системе. Таким образом, РГК направлен на поиск переменных, которые охватывают большую часть дисперсии в исходных данных. Количество скрытых переменных должно быть меньше, чем количество объектов [3].

Метод проекции на латентные структуры [Partial Least Squares] (ПЛС, PLS) в отличие от РГК, который при декомпозиции матрицы спектров X не учитывает ее связи с матрицей откликов (концентраций) Y , подразумевает одновременную декомпозицию матриц X и Y

$$X=TP^t+E \quad Y=UQ^t+F \quad T=XW+G$$

Проекция строится согласованно – так, чтобы максимизировать корреляцию между соответствующими векторами X -счетов t_a и Y -счетов u_a . Поэтому PLS декомпозиция гораздо лучше описывает сложные связи, используя при этом меньшее число главных компонент[3].

Искусственные нейронные сети [Artificial Neural Networks] (ИНС, ANN). При высоком уровне шума калибровка становится нелинейной. Для решения данной проблемы разработан хемометрический алгоритм ИНС, который способен дублировать функции человеческого мозга. Он состоит из ряда простых процессоров, связанных изменяемыми весовыми соединениями. ИНС использует более гибкие методы моделирования по сравнению с МЛР (линейные, нелинейные функции) которые объединены в

блок обработки, что позволяет создавать сложные взаимосвязи между пространством дескрипторов высокой размерности и заданными данными, что, в свою очередь, приводит к лучшему прогнозированию. Метод ИНС обладает некоторыми недостатками: сложная инфраструктура модели; необходимость большого количества калибровочных образцов; использование МГК и дисперсионного анализа для упрощения размерности модели [3].

Генетический алгоритм [Genetic Algorithm] (ГА, GA) разработан как часть исследования адаптивных процессов. Данный метод имитирует вероятностный эволюционный процесс, генерируя случайную совокупность строк, каждая из которых представляет одно возможное решение исследуемой проблемы (вектором порядковых номеров или любым подходящим линейным представлением параметров). Генетический алгоритм является универсальным методом интеллектуального поиска переменных, которые могут существовать в задаче калибровки и использоваться совместно с другими методами [7].

Генетический алгоритм, совмещенный с методом наименьших квадратов и расширенными спектральными остатками [Genetic algorithm – spectral residual augmented classical least squares] (ГА-МНКРСО, GA-SRACLS) является сочетанием вышеописанного классического метода наименьших квадратов с расширенными спектральными остатками и генетического алгоритма. ГА может выбирать переменные, которые обеспечивают хорошие решения с точки зрения как предсказательной способности, так и интерпретируемости. Следовательно, более надежные и простые модели были получены при соединении ГА с SRACLS [8].

Масштабированный сопряженный градиент [Scaled Conjugate Gradient] (MCG, SCG) – один из самых известных контролируемых градиентов второго порядка. Информация второго порядка оценивается путем определения градиентов первого порядка с помощью масштабированного сопряженного градиента. Для получения наименьшей

среднеквадратичной ошибки для обоих компонентов используется 3 разных слоя с количеством нейронов от 2 до 10 [9].

Анализ наименее зависимых компонентов взаимной информации [Mutual Information Least Dependent Component Analysis] (АЗКВИ, MILCA)

Суть алгоритма заключается в поиске наименее зависимых спектров компонент в смесях, что делает его незаменимым для декомпозиции суперпозиций сильно перекрывающихся спектров, которые невозможно разделить на полностью независимые составляющие [10]. Для подобного преобразования и нахождения “остаточных” зависимостей предложено использовать функцию взаимной информации, расчет которой основан на статистике k-ближайших соседей [11]. Это дает возможность полностью автоматизировать процесс декомпозиции и разделять спектры без поиска так называемых “чистых” переменных (длина волны, при которой поглощает только один компонент в смеси), что является главным условием для успешного применения других известных алгоритмов.

Хемометрические алгоритмы применяются для количественного определения одно- и многокомпонентных лекарственных препаратов.

Программное обеспечение для применения хемометрических алгоритмов реализовано с помощью таких программ как MATLAB, The Unscrambler, Origin, MathCad, Microsoft Excel Pirouette разных версий и с различными надстройками, прописанных в них (PLS toolbox, Chemometric toolbox).

Параметрами, характеризующими качество модели и правильность определения в анализируемом образце являются: RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration) – среднеквадратичная ошибка обучающего набора данных; RMSEP (Root-Mean Square Error of Prediction) – среднеквадратичная ошибка проверочного набора. Данные параметры характеризуют погрешность модели и должны рассматриваться совместно. [1].

Пробоподготовка препаратов для проведения спектрофотометрического анализа разных лекарственных форм (ЛФ) с применением хемометрических алгоритмов широко представлена в литературных данных. Выделяются несколько ее основных общих аспектов: объединенная проба (определение точной массы (объема) и совместное измельчение образца (взятие аликвоты из объединенной пробы)), растворение, ультразвуковое воздействие на раствор, фильтрация и разбавление полученного раствора.

Анализ литературы показал, что, как правило, для твердых ЛФ берут несколько таблеток (от 5 до 25 штук), определяют их общую массу, истирают до однородности в порошок, отвешивают массу эквивалентную одному или нескольким определяемым ДВ (массу 1 таблетки); переносят навески в мерную колбу, добавляют растворитель в зависимости от природы ДВ (вода, метанол, соляная кислота и др.) и производят УЗ-воздействие и/или встряхивание некоторое время до растворения веществ. После растворения в зависимости от степени мутности раствора проводят этап фильтрации и доведения до номинального объема мерной колбы тем же растворителем. Некоторые авторы производили повторную экстракцию путем промывания оставшегося осадка на фильтре. Завершающей стадией являлось разведение полученного раствора и его спектрофотометрирование [12–14]. Некоторые работы описывают определение ДВ в капсулах [15]. Процедура пробоподготовки отличается от таблеток только этапом вскрытия капсулы и перенесением ее содержимого. Общая схема пробоподготовки твердых ЛФ представлена на рис.1.

Пробоподготовка жидких лекарственных форм заключается в объединенной пробе ЛП в ампулах [15], разведении аликвоты эквивалентной содержанию ДВ. Анализ суспензий [16] и сиропов [17] включает стадии разбавления ЛФ, УЗ-растворение, фильтрации и последующей регистрации спектров поглощения. Пробоподготовка к анализу глазных капель

ограничивается разведением до оптимальных значений оптической плотности раствора [18].

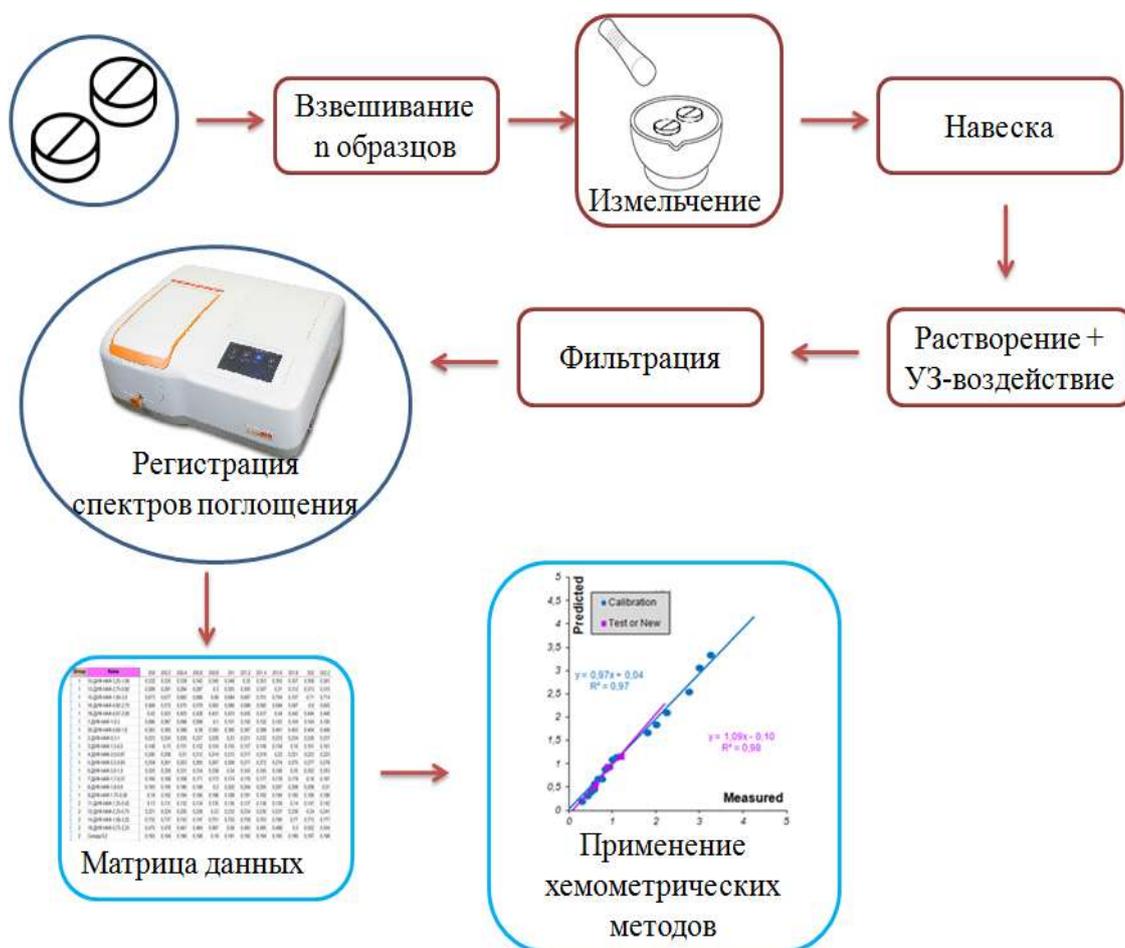


Рис. 1. Схема пробоподготовки таблеток.

ЛФ для наружного применения (гель [19] и крем [20]) включает стадии отбора навески для анализа, экстрагирования ДВ из основы с использованием УЗ, фильтрации и последующего разбавления полученного раствора для проведения спектрофотометрического определения.

Модельные растворы готовятся для обучения (обучающий набор) и проверки (проверочный набор) работоспособности модели выбранного хемометрического алгоритма. Выбор количества модельных растворов основан на диапазоне линейности сигнала от концентрации определяемых веществ, ширине диапазона концентраций, содержании ДВ в препарате.

В работе [8] для определения содержания амоксициллина и флуклоксациллина в капсулах Flumox (EIPICO Pharmaceuticals Company) выбор количества модельных растворов основан на линейности и соотношении веществ в ЛП. Используются растворы с 5 различными концентрациями ДВ каждого компонента ЛП (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация амоксициллина и флуклоксациллина (мкг/мл) в модельных растворах

№ смеси	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Обучающий набор													
амоксициллин	16	16	18	18	18	18	22	22	22	24	24	24	24
флуклоксациллин	24	22	24	22	16	20	24	16	22	18	20	24	16
Проверочный набор													
№ смеси	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
амоксициллин	16	16	16	18	20	20	20	20	20	22	22	24	
флуклоксациллин	16	20	18	18	20	16	18	24	22	20	18	22	

Тринадцать смесей использовались в качестве обучающего набора, остальные двенадцать смесей использовались в качестве проверочного набора для проверки предсказуемости разработанных многомерных моделей. Выбор модельных растворов, содержащих 80-120% ДВ, позволил улучшить качество проверочного набора и повысить правильность определения ДВ в анализируемом препарате.

1.2. Применение хемометрических алгоритмов в анализе лекарственных препаратов

1.2.1 Анализ лекарственных препаратов с одним действующим веществом

Применение хемометрических алгоритмов для анализа однокомпонентных ЛП позволяет проводить количественное определение АФИ (ДВ) в препарате.

В работе [20] описано определение цефексима в ЛП Suprax (производитель Egyptian Company for Pharmaceutical and Chemical Industries) и эрдостеина в Mucotec (Global Napi Pharmaceuticals) методами ПЛС и МНК. Открываемость методом ПЛС действующих веществ в препаратах незначительно выше, чем методом МНК: Так открываемость цефексима

методом МНК составляет 99.7 ± 1.4 , методом ПЛС – 100.2 ± 1.0 . Для эрдостеина эта величина составила 99.7 ± 0.9 и 99.9 ± 0.9 соответственно. В таблетках Ventair (DELTA PHARMA S.A.E, Tenth of Ramadan City, Egypt.) определяли зафирлукаст методом ПЛС, который показал высокий процент открываемости [21].

Хемометрический алгоритм ПЛС был применен для определения ДВ иматиниба в таблетках Glivec (Novartis Pharma AG), гемифлоксацина в таблетках Quinabiotic (Medizen Pharmaceutical Ind), напроксена в таблетках Naprofen (Nile Co. for Pharmaceuticals and Chemical Industries) и налбуфина в растворе для инъекций Nalufin (Amoun Pharmaceutical Co). Определение проводили, обрабатывая спектры поглощения нулевой производной (0D) и первой производной (1D). Значения среднеквадратичных остатков проверочного набора, приведенные в статье [22], показали лучшие результаты при расчете методом ПЛС 1D. Среднеквадратичные остатки обучающего набора не показали такой четкой зависимости. Обратную зависимость можно наблюдать при анализе реальных образцов.

Сравнение алгоритмов ПЛС и ГА-ПЛС приведено в [23] на примере определения цианокобаламина в модельных растворах. Значение RMSEP для ГА-ПЛС составило 0.18, а для ПЛС 1.27, что говорит о лучшей работе генетического алгоритма в сравнении со стандартным методом. Также генетический алгоритм показал лучшую открываемость по сравнению с ПЛС (119 ± 6 и 101 ± 3 соответственно для ПЛС и ГА-ПЛС).

Подробные сведения по работам посвященным спектрофотометрическому анализу однокомпонентных лекарственных препаратов с использованием хемометрики приведены в табл.2. Описанные методы позволяют проводить количественное определение ДВ в препаратах различных лекарственных форм.

Табл. 2. Применение хемометрических алгоритмов в анализе однокомпонентных лекарственных препаратах

Компонент	Объект (Производитель)	Метод	RMSEC/RMSEP	Открываемость(%)	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Пимозид	Таблетки Orape forte (Janssen Cilag)	МНК	-/0.0030	100.2 ± 0.2	14
		РГК	-/0.0028	100.3 ± 0.2	
		ПЛС	-/0.0072	100.3 ± 0.3	
Тазаротен	Гель Акнитаз	РГК	-/-	99.8 ± 0.5	19
		ПЛС	-/-	99.8 ± 0.6	
Зафирлукаст	Таблетки Ventair (DELTA PHARMA S.A.E, Tenth of Ramadan City, Egypt.)	ПЛС	-/-	100.0 ± 0.8	21
Вилдаглиптин Саксаглиптин Ситаглиптин	Таблетки Januvia (Merck &Co) , Onglyza (Bristol-Myers Squibb Company), Galvus (Novartis Euro Pharm company)	ПЛС-1	0.33/0.10	99.9 ± 0.5	22
			0.37/0.16	99.4 ± 0.7	
			0.39/0.23	100.0 ± 1.1	
		ГА-ПЛС-1	0.19/0.54	100.6 ± 0.7	
0.20/0.45	99.6 ± 0.7				
ИНС	0.33/0.48	100.7 ± 0.4			
	1.21/0.10	99.6 ± 0.8			
ГА-ИНС	0.58/0.22	98.8 ± 0.8			
	0.40/0.64	99.6 ± 0.8			
Клопидогрель Аторвастатин Аспирин	Таблетки Плавикс (Sanofi Winthrop Industry, France), Lipitor (Pfi zer Egypt), Aspirin Protect (Bayer, Germany)	ПЛС	1.65/0.19	100.2 ± 0.5	23
			0.58/0.18	99.9 ± 0.5	
0.47/1.03	99.8 ± 0.3				
ГА-ПЛС	0.59/0.45	101.4 ± 1.1			
	0.09/0.21	101.5 ± 1.3			
Оксибутинин	Таблетки Урипан (Egyptian Co. for chemicals and	РГК	0.28/0.45	98.7 ± 1.7	24
			0.51/0.34	101.1 ± 1.2	
			0.12/0.12	100.3 ± 2.1	
			0.07/0.39	98.7 ± 1.6	

	pharmaceuticals)	ПЛС	-/0.15	99.7 ± 1.6	
1	2	3	4	5	6
Имипрамин	Таблетки Imipramine (ACDIMA, Egypt)	РМН-НМК	-/0.062	98.2 ± 0.8	25
Карбамазепин	Таблетки Carbapex (Multi-Apex Pharma, Egypt)		-/0.078	99.6 ± 0.4	
Хлорпромазин	Таблетки Neurazine (Misr Company for Pharmaceuticals, Egypt)		-/0.002	99.06 ± 0.96	
Галоперидол	Раствор для инъекций Haloperidol (Sunny Pharmaceuticals, Egypt)		-/0.07	98.8 ± 1.4	
Фенитоин	Капсулы Phentyin (El-Nile Co., Egypt)		-/0.006	99.5 ± 0.2	
Бисакодил	Bisa (Amriya Pharmaceutical Industries)	ПЛС	0.14/5.73	100.01 ± 0.7	26
		МНКРСО	0.33/1.99	100.01 ± 2.1	
		МОВНК	0.12/0.55	99.76 ± 0.7	

В статье [25] определение ДВ производилось методом *разрешения многомерной кривой с чередованием метода наименьших квадратов [Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares] (PMK-НМК, MCR-ALS)*. Целью PMK-НМК является билинейное разложение матрицы данных “D” на “истинные”, чистые профили отклика, связанные с изменением каждого вклада в направлениях строк и столбцов, представленных матрицами “C” и “ST”, которые ответственны за наблюдаемую дисперсию данных. Строки матрицы “D” представляют собой спектры, измеренные во время эксперимента, профили столбцов матрицы “C” и профили строк “ST” обычно связаны соответственно с профилями концентрации и чистых спектров разрешенных компонентов. Верхний индекс “T” означает транспонирование матрицы “S”. “E” — это матрица ошибок, не объясняемых моделью, и в идеале она должна быть близка к экспериментальной ошибке [27].

Классический метод наименьших квадратов с расширенными спектральными остатками [spectral residual augmented classical least squares] (МНКРСО, SRACLS) основан на дополнении эмпирически полученных спектральных формах прогнозируемой матрицы чистых компонентов “K”, например, векторами нагрузки при анализе главных компонент (МГК) на спектральные остатки. Расчеты проводятся с использованием одного вектора концентрации для одного компонента со спектральной матрицей градуировочных образцов, как в ПЛС-1. Другой компонент рассматривается как мешающий. Затем спектральные остатки разлагаются с помощью МГК, что приводит к оценкам и нагрузкам, где строки “K” могут быть дополнены одной или несколькими строками нагрузок, чтобы улучшить способность прогнозирования на этапе прогнозирования МНК, где первые несколько векторов нагрузок должны охватывать большую часть несмоделированной информации в спектральных остатках [8].

Сочетание методов ПЛС и методов основанных на использовании опорных векторов (МНКРСО и МОВНК) применено для для определения бисокадила в препарате “Bisa”[26].

Метод опорных векторов наименьших квадратов [Least squares support vector machine], (МОВНК, LS-SVM) является усовершенствованием стандартного метода опорных векторов, в настоящее время является широко используемым методом машинного обучения, который преобразует ограничения неравенства в ограничения равенства, значительно упрощает процесс вычислений и определение, а также упрощает работу машиной опорных векторов с составом [28].

1.2.2. Анализ лекарственных препаратов с двумя действующими веществами

Анализ двухкомпонентных ЛП достаточно широко представлен в литературе. Основным хемометрическим алгоритмом, применяемым для определения концентрации действующих веществ в представленной группе является ПЛС.

Определение содержания веществ в комбинации фенилэфрина и хлорфенирамина в сиропе Sine Up (Pharco Co., Egypt) проведено в [29] методами МНК и ПЛС. Апробированные методы показали высокий процент открываемости и минимальное значение стандартного отклонения. При определении чистых веществ предложенными методами метод МНК показывает лучшие результаты, однако при определении в лабораторно приготовленных смесях и в сиропе лучше показывает себя метод ПЛС. В работе [30] проведено сравнение алгоритмов ГА-ПЛС и ГА-МЛР на примере смеси анксиолитика клобазама и представителя фармакологической группы снотворных средств флуразепама при добавлении их в плазму крови. Так открываемость в лабораторных смесях флумазепама методом ГА-ПЛС составила 93.7%, ошибка определения была выше, чем при определении методом ГА-МЛР, поэтому метод ГА-ПЛС был исключен из дальнейшего

рассмотрения, в связи с высоким процентом ошибки. Определение в объекте проводили только методом ГА-МЛР.

В работе [31] алгоритм ПЛС применен для анализа назальных капель Anrianol (Zdravlje Actavis, Serbia) содержащих фенилеприн и тримазолин. В модельных растворах тримезалин имеет высокую погрешность определения по сравнению с фенилприном.

Проведено сравнение трех хемометрических алгоритмов МНК, РГК и ПЛС на примере комбинации диуретиков триамтерена и ксипамида в таблетках Eritens (Egyptian Int. Pharmaceutical Industries Co.) различных серий. Модельные смеси и анализ образцов различных партий показали приблизительно одинаковые результаты правильности, что говорит о возможности применения данных алгоритмов в аналитической практике [32].

Содержание парацетомола и трамодола в перспективном комбинированном препарате [33] определено методами ПЛС и ГА-ПЛС. Открываемость и ошибка определения алгоритмом ПЛС составила 99.5 ± 0.9 и 99.0 ± 2.6 , алгоритмом ГА-ПЛС 99.3 ± 0.9 и 99.4 ± 1.7 для парацетомола и трамодола соответственно. Исходя из правильности определения в модельных смесях, можно предположить о возможности применения метода ГА-ПЛС для анализа ЛП, в большей степени, так как погрешность определения ниже именно в этом методе.

Применение производной спектрофотометрии в сочетании с хемометрическими алгоритмами (ПЛС и РГК) также нашло свое место и в анализе двухкомпонентных ЛП. Так в [34] описан способ определения парацетамола и аскорбиновой кислоты в таблетках Efferalgan (Bristol-Myers Squibb Company, Париж, Франция) и порошке Contac (GlaxoSmithKline, Германия, Буль / Баден). Анализ данных работы показывает меньшие значения относительной стандартной ошибки предсказания (RSEP(%)) в модельных растворах для матрицы нулевой производной методом РГК, но для алгоритма ПЛС наименьшее значение погрешности наблюдалось в наборе данных полученных с использованием первой производной. При

обработке спектров нулевой и первой производной алгоритмами РГК и ПЛС лучшая открываемость парацетамола наблюдалась для не дифференцированных данных, в тоже время открываемость аскорбиновой кислоты составила 66.8% при использовании нулевой производной и от 103 до 112% – для первой производной.

В работе [35] количественное определение циннаризина и ницерголина в препарате Cinibral (Sigma Pharmaceutical Industries, Egypt) проводилось методами МНК и ОНК. Спектры поглощения представлены на рис. 2. Среднеквадратичная ошибка предсказания проверочного набора для циннаризина лучше методом МНК, а ницерголина – ОНК. Открываемость данных веществ лучше методом МНК.

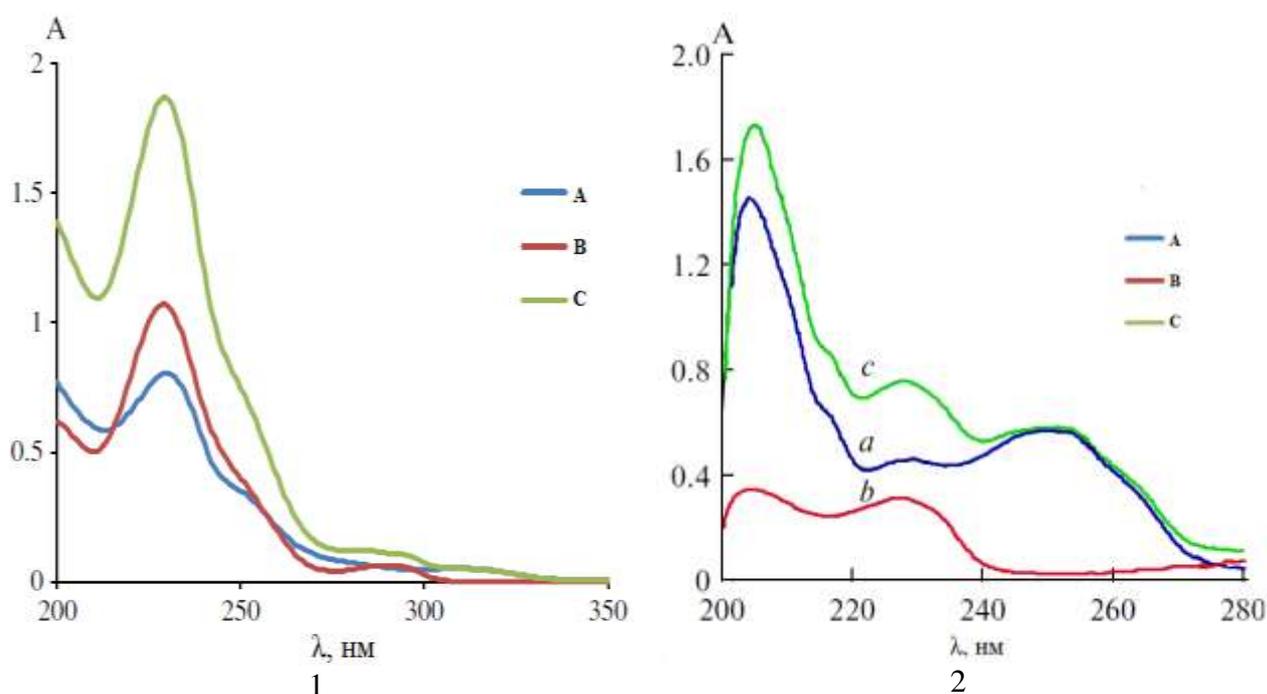


Рис. 2 Спектры поглощения Флуразепама (А), Клозепам (В) и их смеси (С) [30] (1) и циннаризина (А) и ницерголина (В) и их смеси (С) [35] (2).

Для определения ДВ в антигистаминном средстве [36] применялись *нейронная сеть с прямой связью и обратным распространением [Feed-forward backpropagation neural network] (ЛМ, LM)* одним из типов обучения которого является решение нелинейной задачи минимизации функции [37].

Алгоритм LM представляет собой комбинацию преимуществ методов градиентного спуска и метода Гаусса-Ньютона для получения наилучшего решения с целью минимизации задачи [38]. Многие исследователи эффективно использовали алгоритм LM [39-41]. Так же в данной работе использован метод *градиентного спуска с импульсом и адаптивным обратным распространением скорости обучения [gradient descent with momentum and adaptive learning rate back propagation] (ГСИАРСО, GDX)*. Этот подход использует общий алгоритм обратного распространения для вычисления производных функции стоимости производительности в соответствии с изменяющимися весами и смещениями сети. Этот метод использует градиентный спуск с импульсом для настройки каждой переменной. Для каждого этапа модификации, если производительность снижается, скорость обучения увеличивается. Это, вероятно, самый простой и распространенный способ обучения сети [42].

Подробные сведения о применении хемометрических алгоритмов в спектрофотометрическом анализе двухкомпонентных препаратов приведены в табл. 3. Как видно из таблицы, описанные методы позволяют проводить определение ДВ в двухкомпонентных препаратах различных лекарственных форм.

Табл. 3 Применение хемометрических алгоритмов в анализе двухкомпонентных лекарственных препаратах

Компонент	Объект	Метод	1-ый компонент		2-ый компонент		Ссылка
			RMSEC/RMSEP	Открываемость(%)	RMSEC/RMSEP	Открываемость(%)	
1	2	3	4	5	6	7	8
1.Амоксициллин 2.Флуклоксациллин	Капсулы Flumox (EIPICO Pharmaceuticals Company)	ПЛС-1	0.28/0.28	101.5 ± 1.3	0.24/0.387	100.2 ± 1.1	8
		ГА-ПЛС-1	0.24/0.25	101.2 ± 1.4	0.09/0.37	98.9 ± 1.4	
		МНКРСО	0.29/0.29	101.5 ± 1.3	0.16/0.31	99.3 ± 1.2	
		ГА-МНКРСО	0.24/0.25	101.2 ± 1.4	0.09/0.37	99.7 ± 0.8	
		МНКРСО	0.28/0.29	101.5 ± 1.3	0.26/0.37	99.9 ± 1.1	
		ГА-МНКРСО	0.24/0.25	101.2 ± 1.4	0.10/0.37	99.8 ± 0.8	
		ИНС	0.13/0.23	100.9 ± 1.1	0.23/0.28	99.9 ± 1.8	
ГА-ИНС	0.27/0.21	99.4 ± 1.3	0.30/0.31	99.7 ± 1.2			
1.Авобензон 2.Октиноксат	Крем Love Nature	ПЛС	-/0.007	101.1 ± 0.5	-/0.01	101.0 ± 0.5	20
		РГК	-/0.007	101.1 ± 0.5	-/0.01	101.0 ± 0.5	
1.Фенилэфрин 2.Хлорфенирамин	Антигистаминное средство (Pursina Company)	ЛМ	0.55/0.37	102.2 ± 0.2	0.94/0.24	103.3 ± 0.11	36
		ГСИАРСО	0.35/0.82	106.6 ± 0.3	0.59/0.55	107.9 ± 0.12	
1.Нафазолин 2.Антазолин	Глазные капли Anaprivin (Sina Darou)	ЛМ	0.009/0.007	99.89 ± 0.01	0.0006/0.002	100.7 ± 0.06	43
		МСГ	0.0008/0.004	100.00 ± 0.06	0.0005/0.001	99.83 ± 0.01	
		ГСИАРО	0.02/0.06	100.1 ± 0.1	0.0002/0.0009	97.39 ± 0.01	
		ПЛС	-/-	100.00 ± 0.06	-/-	100.01 ± 0.06	
		РГК	-/-	100.82 ± 0.06	-/-	104.92 ± 0.07	
1.Моэксиприл 2.Гидрохлоротиазид	Таблетки Primox® plus	РГК	0.02/0.13	99.9 ± 0.6	0.07/0.33	100.7 ± 0.3	44
		ПЛС	0.02/0.21	100.3 ± 0.3	0.07/0.23	99.4 ± 0.3	
1.Целекоксиб 2.Диацереин	Капсулы Ostegard	МНК	0.22/0.28	99.7 ± 1.4	0.19/0.19	100.9 ± 1.12	45
		ОНК	0.29/0.29	99.9 ± 0.9	0.19/0.19	100.6 ± 1.6	
		РГК	0.28/0.28	99.82 ± 0.95	0.19/0.19	101.01 ± 1.44	
		ПЛС	0.28/0.27	99.95 ± 0.8	0.18/0.18	100.6 ± 1.7	
1.Гидрохлоротиазид 2.Беназеприл	Таблетки Cibadrex (Novartis Pharma)	ПЛС	0.14/0.30	100.3 ± 0.9	0.12/0.24	100.95 ± 1.24	46
		МОВНК	0.11/0.27	100.5 ± 1.1	0.11/0.18	99.7 ± 1.3	

1	2	3	4	5	6	7	8
1.Беназеприл 2.Амлодипин	Капсулы Loadless	РГК	0.07/0.12	99.3 ± 0.3	0.14/0.33	100.8 ± 0.3	47
		ПЛС	0.09/0.21	100.4 ± 0.3	0.15/0.24	100.3 ± 0.5	
1.Периндоприл 2.Амлодипин	Таблетки Coveram (Servier, France)	МНКРСО	-/0.52	100.00 ± 0.6	-/0.21	100.00 ± 0.5	48
		ПЛС	-/1.48	99.97 ± 1.51	-/0.26	100.01 ± 0.75	
1.Амлодипин 2.Аторвастатин	Таблетки Caduet (Pfizer Ltd., Cairo, Egypt)	ПЛС	0.22/0.23	-	0.28/0.12	-	49
		ГА-ПЛС	0.13/0.28	100.4 ± 0.9	0.17/0.14	100.3 ± 0.9	
		ИНС	0.11/0.15	100.6 ± 1.2	0.15/0.09	100.4 ± 0.9	
		ГА-ИНС	0.11/0.16	99.8 ± 1.01	0.14/0.13	100.2 ± 0.9	
1.Циннаризин 2.Дименгидринат	Таблетки Amocerebral plus	МНКРС	0.11/0.09	99.7 ± 0.9	0.010/0.010	100.9 ± 0.9	50
		ГА-МНКРС	0.03/0.02	98.78 ± 1.03	0.003/0.004	98.7 ± 1.1	
		МНКРСО	0.12/0.09	99.8 ± 0.8	0.02/0.02	100.9 ± 1.2	
		ГА-МНКРСО	0.03/0.02	99.9 ± 1.4	0.003/0.003	98.8 ± 1.01	
		ПЛС	0.15/0.14	99.4 ± 1.1	0.02/0.02	100.93 ± 1.02	
		ГА-ПЛС	0.03/0.05	98.1 ± 0.9	0.004/0.003	99.4 ± 1.1	
1.Пиоглитазон 2.Глимепирид	Таблетки Amaglust (Next Pharma Pharmaceutical Company)	МНКРСО	-/-	104.9 ± 0.9	-/-	105.6 ± 1.4	51
		РГК	-/-	104.94 ± 0.98	-/-	105.7 ± 1.2	
		ПЛС	-/-	105.23 ± 0.98	-/-	105.9 ± 1.3	
1.Хлорамфеникол 2.Дексаметазон	Глазные капли Spersadex comp (Novartis Pharma)	ПЛС	-/0.19	98.4 ± 0.2	0.27	98.01 ± 1.6	52
1.Этодолак 2.Тиоколхикозид	Таблетки Etotio (Mustafa Nevzat Pharmacy, Turkey)	ПЛС	2.4/5.3	99.2 ± 3.4	0.25/0.61	98.9 ± 3.6	53
		РГК	2.9/2.9	99.4 ± 2.6	0.26/0.31	99.3 ± 4.1	
		ОМН	2.7/2.5	98.3 ± 1.1	0.74/0.61	98.7 ± 3.1	
1.Парацетамол 2.Кофеин	Таблетки Nara Extra (Beximco Pharma)	ПЛС	0.93/1.1	85.9 ± 0.9	0.85/0.96	81.2 ± 2.0	54
		ИНС	0.53/0.97	84.6 ± 1.9	0.47/0.32	91.9 ± 3.2	
1.Амлодипин 2.Валсартан	Таблетки Valzomix (Abidi factory)	ГСИАРСО	0.12/0.05	98.07 ± 0.08	0.29/0.06	99.9 ± 0.06	55
		ЛМ	0.28/0.05	98.95 ± 0.03	0.28/0.058	99.9 ± 0.01	

1	2	3	4	5	6	7	8	
1.Триметоприм 2.Сульфаметоксазол	Cotrimoxazole (Tehran Pharmaceutical)	МОВНК	0.47	100.04 ± 0.09	0.15	99.9 ± 0.1	56	
1.Трандолаприл 2.Верапамил	Таблетки Tarka	ПЛС	0.6/0.3	100.9 ± 0.3	0.35/0.08	101.6 ± 0.6	57	
		РГК	0.76/0.49	100.8 ± 0.3	0.36/0.09	102.2 ± 0.4		
1.Эмтрицитабин 2.Тенофовир	Таблетки Emtri Taf (Bakhtar Bioshimi Pharmaceutical)	ИНС	0.32/0.6	98.6 ± 0.8	1.4/1.4	96.5 ± 0.2	58	
		ПЛС	-/0.16	98.2 ± 1.1	-/0.3	94.8 ± 0.5		
		РГК	-/0.17	97.7 ± 1.3	-/0.34	93.8 ± 0.6		
1.Феназопиридин 2.Триметоприм	Таблетки Carmurit-T (Memphis Co.)	ПЛС	0.02/1.4	98.6 ± 0.3	0.14/0.2	100.4 ± 0.2	59	
		РГК	0.13/1.4	98.7 ± 0.4	0.9/0.2	100.4 ± 0.2		
1.Норфлоксацин 2.Тинидазол	Таблетки Tinidol Plus (НИКМА Pharmaceuticals)	МНК	0.07/0.3	-	0.08/0.65	-	60	
		ПЛС	0.05/0.06	101.3 ± 0.4	0.05/0.05	100.7 ± 0.7		
		МОВНК	0.05/0.05	97.97 ± 0.1	0.03/0.04	97.9 ± 0.2		
1.Небиволол 2.Валсартан	Синтетической смеси	МНК	-/-	100.7 ± 1.6	-/-	100.9 ± 0.6	61	
		РГК	-/-	100.7 ± 1.5	-/-	100.9 ± 0.6		
		ПЛС	-/-	100.7 ± 1.5	-/-	100.9 ± 0.6		
1.Клотримазол 2. Дексаметазон	Крем Mucuten-D (Alexandria company)	ПЛС РГК	-/-	100.2 ± 0.8	-/-	100.1 ± 0.5	62	
1.Имипрамин 2.Хлордiazепоксид	Торговая марка А (Amdipharm)	МНК, РГК, ПЛС	-/-	98.0 ± 0.4	-/-	98.6 ± 0.9	63	
			-/-	98.9 ± 0.1	-/-	98.9 ± 0.1		
			-/-	99.9 ± 0.8	-/-	98.8 ± 0.8		
			-/-	100.0 ± 1.3	-/-	97.3 ± 2.4		
			-/-	99.4 ± 1.1	-/-	96.1 ± 2.8		
1.Нортриптилин 2.Флуфеназин	Бренд В (Glaxo- Smithkline)	МНК, РГК, ПЛС	-/-	100.1 ± 1.5	-/-	95.4 ± 3.3	64	
			МНК	0.6078/0.1745	100.3 ± 1.1	0.68/0.32		99.8 ± 1.00
			ПЛС	0.5873/0.2069	100.4 ± 1.1	0.56/0.24		99.9 ± 0.6
1. Флутиказон 2.Азеластин	Назальный спрей Azelast plus® (Hikma Pharmaceuticals)	РГК	0.5892/0.2079	100.4 ± 1.1	0.56/0.21	99.9 ± 0.6		

1.2.3. Анализ трехкомпонентных лекарственных препаратов

Лекарственные препараты, состоящие из 3 действующих веществ, представлены в литературе не так широко как двухкомпонентные. Работа [65] описывает определение аскорбиновой, никотиновой кислот и пиридоксина в поливитаминных комплексах “СанаСол” (“Крюгер ГмБХ унд Ко. КГ”, Германия), “Компливит” (ОАО “Фармстандарт_Уфа Вита”, Россия), “Пиковит Форте” (“КРКА”, Словения) и “Элевит пронаталь” (“Ф. Хоффман_ля Рош”, Швейцария) алгоритмом МПСА.

В таблетках Invozide (Ranbaxy Laboratories Limited, India), содержащих парацетамол, гидрохлоротиазид, эналаприл [66], определение содержания проводили алгоритмами трехлинейной регрессионной калибровки (TLRC), мультилинейной регрессионной калибровки (MLRC), МНК. Среднеквадратичная ошибка прогноза для парацетамола была наименьшей при применении алгоритма TLRC. Алгоритм МНК подходит для определения как гидрохлоротиазида и эналаприла. Алгоритм TLRC показал в этом случае высокие значения среднеквадратичных ошибок. Общий вид спектров поглощения трехкомпонентной системы представлен на рис.3.

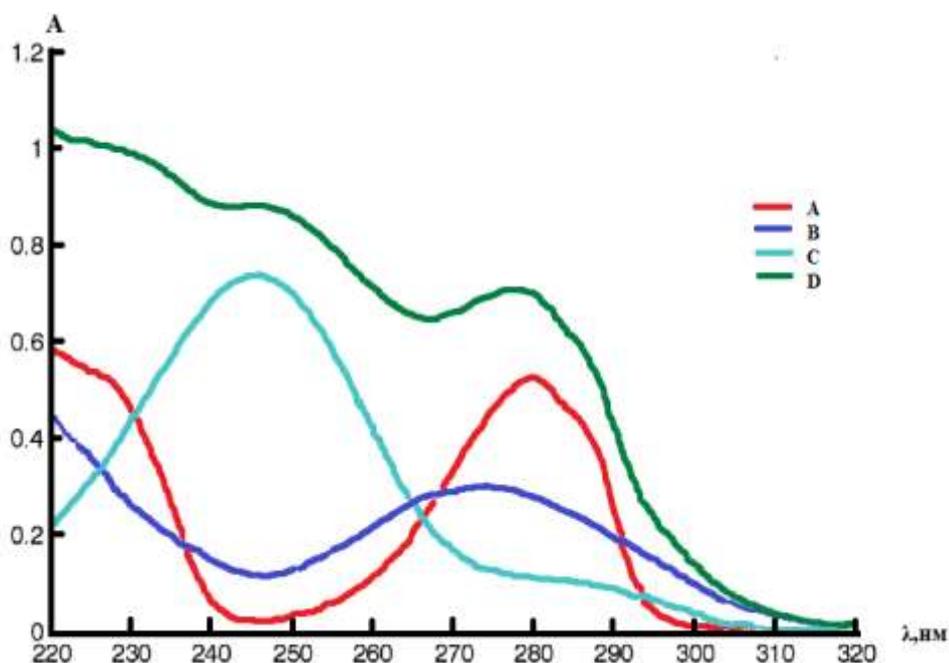


Рис. 3 Спектры поглощения Хлорзоксазона (А), Ацеклофенака (В), Парацетамола(С) и их смеси (D) [71].

1	2	3	4	5	6
Таблетки Nifenac-MR (Intas, Pharmaceuticals)	ПЛС	1.Хлорзоксазон 2.Ацеклофенак 3.Парацетамол	-/0.22 -/0.15 -/0.15	101.4 ± 0.6 101.5 ± 1.8 100.3 ± 1.1	71
Таблетки Sinlerg (Eva Pharma)	РГК	1.Хлорфенирамин 2.Псевдоэфедрин 3.Ибупрофен	-/0.08 -/0.6 -/2.8	100.1 ± 0.8 99.9 ± 0.8 99.5 ± 1.1	72
Таблетки Exforge (Novartis)	ПЛС	1.Амлодипин 2.Валсартан 3.Гидрохлоротиазид	-/0.06 -/0.41 -/2.03	99.8 ± 1.1 100.1 ± 0.9 100.2 ± 1.5	73
	ПЛС-1		-/0.1 -/0.3 -/0.1	99.9 ± 0.8 100.1 ± 0.9 99.7 ± 0.9	
	ГА-ПЛС		-/0.1 -/0.2 -/0.1	100.1 ± 0.4 100.1 ± 0.6 100.0 ± 0.8	
	ИНС		-/0.07 -/0.23 -/0.08	99.7 ± 1.0 100.1 ± 0.6 100.8 ± 0.6	
	ГА-ИНС		-/0.06 -/0.17 -/0.07	99.9 ± 0.7 100.1 ± 0.7 100.2 ± 0.6	
	МГК-ИНС		-/0.14 -/0.41 -/0.16	100.2 ± 1.1 99.6 ± 0.9 100.0 ± 0.6	
Глазные капли Orchadexoline (Orchidia Pharmaceutical Industries)	ПЛС	1.Хлорамфеникол 2.Дексаметазон 3.Тетризолина	-/0.17 -/0.07 -/0.04	99.9 ± 0.6 100.9 ± 1.8 100.2 ± 1.1	74

1	2	3	4	5	6
Таблетки Exforge (Novartis)	РГК	1.Амлодипин 2.Валсартан 3.Гидрохлоротиазид	0.22/0.13 0.39/0.35 0.09/0.13	100.5 ± 0.9 99.9 ± 0.9 100.3 ± 1.1	75
	ПЛС		0.22/0.12 0.39/0.34 0.09/0.13	100.8 ± 1.2 99.5 ± 0.9 100.3 ± 1.0	
Таблетки Trilorace (Akums Drugs & Pharmaceuticals)	МНК	1.Лозартан 2.Амлодипин 3.Гидрохлоротиазид	-/0.13 -/0.09 -/0.11	-	76
	МЛР		0.17/0.21 0.09/0.12 0.23/0.18	-	
	РГК		0.17/0.13 0.12/0.09 0.18/0.11	-	
	ПЛС		-/ 0.13 -/0.9 -/0.13	-	
Таблетки Triumeq (GlaxoSmithKline, England)	ПЛС	1. долутегравир 2. ламивудин 3. абакавир	0.04/0.06 0.13/0.19 0.19/0.28	103.0 ± 2.1 98.6 ± 1.9 99.3 ± 2.03	77
	ГА-ПЛС		0.04/0.06 0.09/0.22 0.15/0.28	100.9 ± 2.2 98.5 ± 2.4 99.2 ± 2.0	

1.2.4. Анализ лекарственных препаратов содержащих четыре и более действующих вещества

Работа [78] посвящена определению Тиамин, Пиридоксин, Цианокобаламин, Диклофенак натрия в капсулах Arthineur (EGYPHAR) и Milga (Eva Pharma for Pharmaceutical & Medical Appliances) алгоритмом РМК-НМК. Среднеквадратичные ошибки предсказания проверочного набора для определяемых веществ показали значение не выше 0.23, что говорит о высокой математической селективности данного метода.

Сравнение производных спектров поглощения нулевого и первого порядка проведено в работе [79] на примере таблеток Coregus, Daklanork, Gratosovir, Nexavar состоящих из рибавирина, даклатасвира, софосбувиа, сорафениба с использованием алгоритмов ПЛС-2 и РГК. Определение алгоритмом ПЛС-2 дает лучше результаты при 0D, а алгоритм РГК – 1D.

Смесь Атенолола, Рамиприла, Гидрохлортиазида, Симвастатина и Аспирина (спектр поглощения индивидуальных веществ и их смеси приведен на рис. 4) в пятикомпонентном лекарственном препарате Polycap (Cadila pharmaceuticals, Ahmedabad, India) [80] проанализирована с помощью алгоритмов ПЛС и ГА-ПЛС. Значения среднеквадратичных ошибок обучающего и проверочного наборов для Атенолола, Рамиприла, Гидрохлортиазида, Симвастатина были минимальны при использовании ГА-ПЛС, только для Аспирина – ПЛС.

Работа [81] рассматривает количественное одновременное определение 5 компонентов в таблетках Cosimpriel (производства Servier France), Определяли действующие вещества в ЛП: бисопролол (БИС), периндоприл (ПЕР) и продукты их разложения (кислотный БИС(к), щелочной БИС(щ), а также выделенный периндоприл (ПЕР(в)). Авторы использовали ПЛС-1, РМК-НМК, ИНС и их генетические алгоритмы (ГА). Минимальные значения RMSEC выявлены для БИС, БИК(щ) и ПЕР(в) методом ГА-ИНС, ПЕР и БИС(к) имели минимальные значения алгоритмом РМК-НМК; но для параметра RMSEP данная тенденция не прослеживается. Минимальные

значения БИС находили при использовании метода РМК-НМК, ГА-ПЛС предпочтительнее использовать при определении ПЕР, БИС(к) и БИС (щ), а для определения ПЕР(в) – ПЛС. Открываемость предложенными методами показала значения от 99,3 до 100,9%.

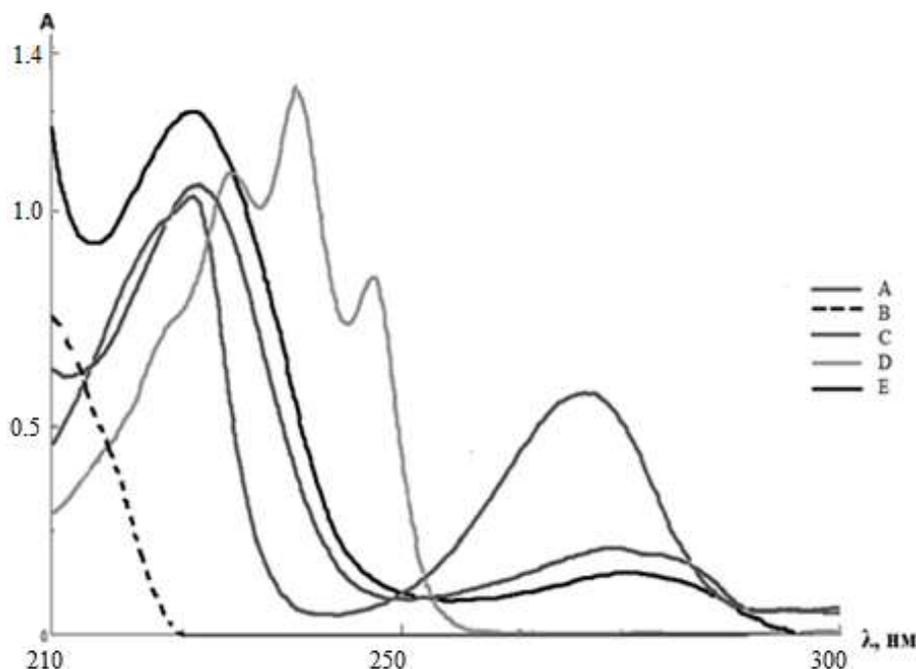


Рис. 4 Спектры поглощения Атенолола (А), Рамиприла (В), Гидрохлортиазида (С), Симвастатина (D) и Аспирина (E) [80].

Работа [81] рассматривает количественное одновременное определение 5 компонентов в таблетках Cosimprel (производства Servier France), Определяли действующие вещества в ЛП: бисопролол (БИС), периндоприл (ПЕР) и продукты их разложения (кислотный БИС(к), щелочной БИС(щ), а также выделенный периндоприл (ПЕР(в)). Авторы использовали ПЛС-1, РМК-НМК, ИНС и их генетические алгоритмы (ГА). Минимальные значения RMSEC выявлены для БИС, БИК(щ) и ПЕР(в) методом ГА-ИНС, ПЕР и БИС(к) имели минимальные значения алгоритмом РМК-НМК; но для параметра RMSEP данная тенденция не прослеживается. Минимальные значения БИС находили при использовании метода РМК-НМК, ГА-ПЛС предпочтительнее использовать при определении ПЕР, БИС(к) и БИС (щ), а

для определения ПЕР(в) – ПЛС. Открываемость предложенными методами показала значения от 99,3 до 100,9%.

Подробные сведения о применении хемометрических алгоритмов в спектрофотометрическом анализе четырехкомпонентных препаратов приведены в табл. 5. Как видно из таблицы, описанные методы позволяют проводить определение ДВ в многокомпонентных препаратах различных лекарственных форм.

Таблица 5. Применение хемометрических алгоритмов в анализе четырехкомпонентных лекарственных препаратах

Объект	Метод	Компонент	RMSEC/ RMSEP	Открываемость (%)	Ссылка
Комбинации фиксированных доз 4 препаратов.	ПЛС-2	1.Этамбутол	-/0.23	273.3 ± 1.7	82
		2.Изониазид	-/0.14	72.3 ± 3.5	
		3.Рифампицин	-/0.11	152.0 ± 1.5	
		4.Пиразинамид	-/0.57	408.8 ± 2.7	
Таблетки Triaminic (Novartis)	ИНС	1.Кофеин 2.Мепирамин 3.Фенилпропаноламин 4.Фенирамин	0.36/0.15	102.9 ± 2.1	83
			0.48/0.31	103.3 ± 2.6	
			0.35/0.29	97.52 ± 2.9	
			0.38/0.32	96.5 ± 3.3	
	МГК-ИНС		0.25/0.094	99.7 ± 1.3	
			0.39/0.13	101.8 ± 1.7	
			0.39/0.22	103.3 ± 1.5	
			0.21/0.14	96.1 ± 1.6	
	ПЛС-2		0.22/0.15	98.1 ± 2.12	
			0.24/0.076	104.9 ± 1.6	
			0.36/0.28	110.1 ± 3.9	
			0.26/0.25	95.5 ± 4.1	
Сироп Cyginol (Amoun Pharmaceutical Co)	ПЛС	1.Карбиноксамин 2.Фолкодин 3.Эфедрин 4.Желтый «солнечный закат»	-/1.11	99.7 ± 1.5	84
			-/1.67	99.6 ± 1.8	
			-/4.9	100.2 ± 1.9	
			-/0.14	100.3 ± 1.2	
	МНКРСО		-/0.87	100.7 ± 0.9	
			-/0.84	100.4 ± 1.0	
			-/3.08	100.1 ± 1.4	
			-/0.12	100.5 ± 0.89	
	СВТ-ПЛС		-/1.45	100.8 ± 1.7	
			-/1.44	101.2 ± 1.6	
			-/4.11	99.2 ± 1.1	
			-/0.17	100.7 ± 1.6	

Таким образом, хемометрика, являющаяся междисциплинарной наукой и использующая многомерные данные, широко используется для

количественного определения действующих веществ в одно- и многокомпонентных лекарственных препаратах, моделирования данных по стабильности ЛП при хранении, а также многих фармако-технологических тестах с целью достижения максимальной точности, воспроизводимости и правильности в различных матрицах. Хемометрические алгоритмы обладают огромным потенциалом в современной аналитической химии и контроле качества, обеспечивая получение точных результатов простым и быстрым способом.

Как показано выше, зачастую сочетание нескольких методов при анализе ЛП обеспечивает более высокую правильность определения каждого из компонентов смеси.

1.3 Применение производной спектрофотометрии, хемометрических алгоритмов в определении синтетических красителей и лекарственных веществ

Метод спектрофотометрии в определении пищевых красителей и лекарственных веществ в смесях реализуют в различных вариантах. При анализе используют прямую спектрофотометрию, позволяющую определять индивидуальные вещества или проводить количественный анализ сложных матриц после соответствующей трудоемкой пробоподготовки, или применяют различные модификации метода дифференциальной спектрофотометрии – производную спектрофотометрию.

В производной спектрофотометрии производят определение математической производной от оптической плотности A по длине волны λ и строят график спектральной кривой в координатах, где длину волны откладывают по оси абсцисс, а по оси ординат – производную $dA/d\lambda$ [85].

Получение производных спектров поглощения может проводиться расчетным методом, например, используя заранее прописанную математическую оболочку, или непосредственно с использованием программного обеспечения спектрофотометра.

При выполнении основного закона светопоглощения и условия аддитивности оптических плотностей n -производная оптической плотности прямо пропорциональна концентрации компонента. На практике чаще используют производные первого и второго порядка [85], графические преобразования спектров поглощения проводят как с помощью определенных алгоритмов [86], так и с помощью программного обеспечения спектрофотометра [87].

Применение производной первого и более высокого порядка позволяет увидеть скрытые полосы поглощения и перегибы, не проявляющиеся при использовании производной нулевого порядка. Данная способность производной спектров поглощения обуславливается повышением контраста между полосами разной полуширины, так как при дифференцировании малохарактерное поглощение подавляется, а характерные полосы, несмотря на малую интенсивность, усиливаются, что позволяет использовать данный метод в качественном и количественном анализе веществ в многокомпонентных смесях без их предварительного разделения

Применение производной спектрофотометрии дает возможность определения как индивидуальных веществ, например АФИ, так и проведение анализа сложных смесях, состоящих из компонентов, поглощающих при близких длинах волн и в условиях наложения спектров друг на друга. Высокую селективность применения производной спектрофотометрии обуславливает способность высокой разрешающей способности и снижения влияния фона [88].

Разрешающая способность производной спектрофотометрии зависит от выбора шага сканирования спектра, скорости сканирования и шага дифференцирования, использованного для получения данной производной спектра поглощения.

Рассмотрим примеры применения метода производной спектрофотометрии при определении синтетических пищевых красителей (СПК). Так, для анализа двухкомпонентных смесей СПК, спектры

поглощения которых значительно перекрываются, предложен один из вариантов производной спектрофотометрии, в котором аналитическими длинами волн являются значения «нулевого пересечения» с осью абсцисс первых производных спектров поглощения компонентов (табл. 6). При однократном дифференцировании такое «нулевое пересечение» соответствует максимуму поглощения компонента в исходном спектре нулевого порядка. При этом значение производной оптической плотности пропорционально концентрации другого компонента, у которого это значение отлично от нуля.

Таблица 6 Применение производной спектрофотометрии при «нулевом пересечении» для определения СПК в бинарных смесях

СК	λ_{\max} , нм	Длина волны «нулевого пересечения», нм	Шаг дифференцирования, $\Delta\lambda$	Правильность, % (Sr, %)	Ссылка
E110 E124	486 507	480.3 510.7	2	(5) (5)	89
E110 E124	486 507	486 507	20	99.7-102.2 92.0-103.0	90
E110 E102	486 527	486 539.5	20	99.7-102.2 93.9-103.3	
E110 E127	486 526	482.7 526.3	2	105.8 102.8	91
E110 E102	486 427	482.7 526.3; 538	8	96-105; 96-101; 99-124	92
E110 E101	482 445	481.7 448.5	2	102 101	93
E110 E102	486 427	484.5 427	4	(0.9) (1)	94
E110 E127	486 526	480.9 525.4	-	94.8-102.8 99.2-100.6	95
E132 E124	610 507	507 610	10	94-104 90-97	96
E131 E122	640 515	640 515	20	95.2-124 103.8-117.6	97

Как видно из приведенных данных, длина волны «нулевого пересечения» не всегда точно совпадает со значением максимума поглощения определяемого компонента. Так, например, для красителя E110 значение «нулевого пересечения» варьирует от 480.3 нм до 486 нм, а для

E124 – от 507 нм до 510.7 нм. Другой параметр получения производной спектра – шаг дифференцирования ($\Delta\lambda$) – также варьируется в достаточно широких пределах от 2 до 20 нм. Недостаточно ясно, как эти параметры отражаются на погрешности определения.

Производная первого порядка применена в работе [98] для одновременного определения красителей бриллиантового зеленого и основного красного 46 в их бинарных растворах. Такой подход позволил изучить фотодеградацию красителей под влиянием УФ-облучения в присутствии нанокompозитного материала оксида лантана-оксида алюминия ($\text{La}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$) в качестве эффективного фотокатализатора. Применение производных второго порядка в качестве метода контроля при перекрытии спектров поглощения описано в работе [99], в которой изучено удаление малахитового зеленого и метиленового синего из водных растворов с использованием металлоорганического комплекса MIL-68(Al).

В работе [100] исследована адсорбция конго красного, флоксина В и прочного зеленого при совместном присутствии нанокompозитами CuS/ZnS, адсорбированными на активированный уголь (CuS/ZnS-NCs-AC), в зависимости от pH, массы адсорбента, времени ультразвукового воздействия и концентрации красителей. Определение концентрации красителей проводили методом спектрофотометрии производных первого и второго порядка в тройной смеси. Для сорбции красителей подобраны такие оптимальные условия как: значение pH = 6.0, масса нанокompозита и активированного угля CuS/ZnS-NCs-AC = 0.02 г, время обработки ультразвуком 5 минут. При данных условиях связывание и удаление исследуемых красителей из растворов составили 99.72, 98,8 и 98.17% для конго красного, флоксина В и прочного зеленого соответственно.

Одним из классических подходов количественного спектрофотометрического анализа двух- и более компонентных смесей является метод Фирордта, основанный на решении системы уравнений. Широкое практическое применение его ограничивается сложностью выбора

аналитических длин волн, обязательным выполнением закона Бугера-Ламберта-Бера и соблюдением принципа аддитивности оптических плотностей компонентов в смеси. Погрешность определения индивидуальных компонентов также зависит и от их соотношения [101]. Анализ работ по определению СПК показал, что метод Фирордта применяли для ограниченного числа бинарных смесей: E102 и E124 [102]; E132 и E124 [103], различающихся положением максимумов поглощения на 81 и 103 нм соответственно.

Сочетание производной спектрофотометрии и хемометрических алгоритмов не так широко распространено в анализируемой литературе, за счет более сложного проведения эксперимента и некоторых трудностей при работе с производной спектров поглощения.

Определение тартразина, аллюра красного и желтого «солнечнозакатного» при совместном присутствии в порошках безалкогольных напитков проводилось в работе [104] с применением производных спектров поглощения первого порядка в сочетании с алгоритмом ПЛС-1. В четырех безалкогольных напитках без предварительной пробоподготовки (высоком уровне мешающих аналитов) определено содержание тартразина и желтого «солнечнозакатного» в диапазонах 323-480 и 84-1016 мг/кг, соответственно, аллюра красного обнаружено не было. Сравнение результатов определения методом ПЛС-1 и ВЭЖХ показало высокую открываемость (104% для E102 и 104,9% для E110).

Количественное определение красителей (амаранта, понсо 4R, желтого заката, тартразина и бриллиантового синего) в смеси проводилось с использованием алгоритмов регрессии на главные компоненты (РГК), частичных наименьших квадратов (ПЛС) и искусственной нейронной сети (ИНН) [105]. Выбранные алгоритмы позволили отдельно определить СПК с погрешностью, не превышающей 9%, правильность определения подтверждена методом ВЭЖХ.

Способ анализа тройных смесей СПК тартразина, патентованного синего V и индигокармина с использованием первой производной, производной отношения спектров и методов ПЛС-1 и РГК для калибровки описан в работе [106]. Многомерные модели для анализа тройной смеси показали высокую степень повторяемости и сходимости. Также проведено сравнение результатов определения методами производной спектрофотометрии и методами многомерной калибровки, и показано, что погрешность определения во всех случаях не превышает 15%. Способ применен для анализа кондитерских изделий, содержащих данные красители.

Также предложен метод прямой спектрофотометрии с использованием метода наименьших квадратов с переменным разрешением многомерной кривой (MCR-ALS) для определения трех СПК – E123, E110 и E102 в напитках [107]. Обнаружено, что с использованием внутренних эталонных материалов модель MCR-ALS позволяет получить объективные результаты даже при наличии помех в спектрах.

В ряде работ показано, что перспективным является использование хемометрических алгоритмов (из которых наиболее распространены инструменты многомерной калибровки, ПЛС-1 или РГК) в сочетании с производной спектрофотометрией. Это обеспечивает преимущество быстрого химического анализа и позволяет избежать процедур разделения или очистки. Так, сочетанием спектрофотометрии на основе производной второго порядка с хемометрическими алгоритмами (ПЛС и РГК) разработан метод одновременного определения E110 и E102 в безалкогольных напитках без предварительного разделения или очистки [108]. Значения RMSE, относящиеся к ПЛС и РГК, составили: 0.2578, 0.3023 и 0.2635, 0.5602 для E110 и E102 соответственно. В качестве эталонного метода оценки правильности определения СПК в напитках использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Предложен [109] метод одновременного определения пяти триарилметановых красителей (бриллиантового синего FCF, патентованного

синего V, патентованного синего VF, быстрого зеленого FCF и зеленого S) в сиропе путем применения метода многомерного разрешения кривых к спектру поглощения второго порядка. Даже для сильно перекрывающихся спектров применение второй производной и многофакторного анализа повысило специфичность анализа и обеспечило эффективность прогнозирования с коэффициентом детерминации (R^2) > 0.90, среднеквадратической ошибкой предсказания (RMSEP) < 0.20 мг/л и пределом обнаружения (LOD) < 0.50 мг/л для всех пяти аналитов. Для коммерческих образцов сиропа данный метод показал результаты сопоставимые с измеренными методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Предлагаемый метод обеспечивает быструю альтернативу методам жидкостной хроматографии для количественного определения нескольких красителей в образцах пищевых продуктов.

Применение метода производной спектрофотометрии не ограничивается определением СПК в многокомпонентных смесях, также он используется для количественного определения АФИ в различных ЛП.

В работе [110] для количественного определения цизаприда в таблетках и суспензии под торговым названием «Препульсид» применяли производные спектров поглощения первого и второго порядка, в качестве метода сравнения выбран метод ВЭЖХ. Оптическую плотность регистрировали в диапазоне длин волн 340-220 нм, скорость сканирования 3800 нм/мин. Расчет производных производили с использованием программного обеспечения спектрофотометра при $\Delta\lambda=4$ нм. Для производной спектра поглощения нулевого порядка характерны максимумы при 272 и 308 нм. Производная спектра поглощения первого порядка имела два максимума при 264 нм и 300 нм, минимум при 284 нм. Производная спектра поглощения второго порядка – максимум при 290 нм, минимум при 276 нм. Применение производной первого порядка повлекло к полному исключению влияния фона вспомогательных веществ в составе таблеток при 264 и 300 нм, а также

влияния матрицы суспензии при 300 нм. Диапазон линейности градуировочной зависимости составил 2-12 мкг/мл. Способ определения цизаприда оказался быстрым, простым и пригодным для применения в целях контроля качества лекарственных препаратов.

Для определения индивидуального АФИ рабепразола [111] в субстанциях и таблетках двух различных производителей применялся метод производной спектрофотометрии первого порядка в сравнении с традиционной спектрофотометрией. При использовании спектрофотометрии нулевого порядка максимум поглощения исходного спектра рабепразола наблюдался при 284 нм, в то время как для первой производной спектра наблюдался минимум при 298 нм. Расчет производной производился в программном обеспечении спектрофотометра Shimadzu UV-2450 с шагом длины волны ($\Delta\lambda$) 2 нм. Относительное стандартное отклонение при определении рабепразола в таблетках двух разных производителей методом прямой спектрофотометрии составило 0.232% и 0.151%, методом первой производной 0.313% и 0.314% для торговых марок первого и второго производителя соответственно. При использовании метода прямой спектрофотометрии воспроизводимость составляла 98.77% и 98.73%, а при использовании метода первой производной – 98.54% и 98.04% для торговых марок первого и второго производителя соответственно. Полученные данные хорошо согласовывались с данными, заявленными производителем на этикетке, и предложенные методы могут использоваться для рутинного анализа субстанций и таблеток рабепразола.

В работе [112] АФИ флутамид определяли как в лабораторно приготовленной смеси, идентичной по составу таблеткам, так и коммерческих таблетках флутамида. Регистрация спектров поглощения проводилась в диапазоне длин волн 220-490 нм, оптическую плотность регистрировали через каждые 5 нм. Спектр нулевого порядка характеризовался двумя полосами поглощения с максимумами при 235 нм и 400 нм. Расчеты производной второго порядка проводились методом

численного дифференцирования. В качестве аналитической длины волны выбрана полоса поглощения с максимумом при 400 нм. Переход от первых ко вторым производным проводили с уменьшением шага дифференцирования для снижения влияния шума. Относительное стандартное отклонение при определении в модельных смесях составило 3.80%, а в таблетках – 3.14%. Относительная ошибка среднего результата при определении флутамида в модельных смесях составила 4.03%, при определении в таблетках – 4.38%. Время, затраченное на проведение одного определения, не превышает 10-15 минут.

Вторую производную применяли для определения нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она в таблетках VMA-10-13 в сравнении с раствором плацебо [113]. На спектрофотометре регистрировали спектр нулевого порядка, который имел максимумы поглощения при 226 и 265 нм. В качестве аналитической длины волны была выбрана полоса поглощения с максимумом при 265 нм, так как она более широкая по сравнению с максимумом при 226 нм. Для построения производной второго порядка использовали программное обеспечение спектрофотометра «UVWin 5». Диапазон линейности градуировочной зависимости составил 0.005 – 0.035 мг/мл. Сходимость (прецизионность) и правильность методики определяли по значениям среднего ($Z = 100.24\%$), относительного стандартного отклонения ($S_r = 0.51\%$), доверительного интервала ($\Delta Z=1.18$) и систематической погрешности ($\delta = 0.24\%$). Установлено, что использование второй производной спектра позволяет устранить поглощение вспомогательных веществ таблеток (например, разрыхлителя коллидона, ПЭГ-6000) в ультрафиолетовой области, тем самым исключить систематические погрешности, обусловленные неучтённым фоном.

В ряде работ описано применение производной второго порядка в фармацевтическом анализе. Лекарственное вещество мебендазол [114] определяли в таблеточной массе и в таблетках в среде диметилсульфоксида.

Оптическую плотность растворов мебедазола измеряли с шагом 5 нм в диапазоне длин волн 245-380 нм. Производную второго порядка рассчитывали методом численного дифференцирования, для сглаживания шума последовательно уменьшали шаг дифференцирования. Исходный спектр поглощения и его производная имели экстремумы при 265 нм и 320 нм. Диапазон линейности градуировочной зависимости составил 1-20 мг/мл. Относительная ошибка среднего результата при определении препарата в таблеточной массе составила 1.90%, при определении в таблетках – 1.98%. Предел обнаружения мебедазола 0.5 мкг/мл, предел определения – 1 мкг/мл. Предложенная методика достаточно экспрессная: время, затраченное на проведение одного исследования, не превысило 10-12 минут.

Также в анализе индивидуальных лекарственных веществ используют производную третьего порядка. Этот метод применяли для зафирлукаста в таблетках под торговым наименованием «Аколат» в сравнении с методом ВЭЖХ [115]. Спектры нулевого порядка получали с помощью спектрофотометра Chemito UV 2500-а (ширина щели 2 нм, скорость сканирования 480 нм/мин). Для расчета производной использовали программное обеспечение спектрофотометра ($\Delta\lambda = 2.1$ нм), точка нулевого пересечения при длине волны 251.1 нм. Диапазон линейности градуировочной зависимости составил 3.2 – 16 мкг/мл. Исследование селективности проводили путем добавления действующего вещества к раствору таких широко используемых вспомогательных веществ как крахмал, тальк, стеариновая кислота, желатин, карбонат магния и лаурилсульфат натрия. Результат варьировал от 98.23% до 101.64%, и смесь только вспомогательных веществ давала базовый спектр при длине волны определения зафирлукаста. Градуировочная зависимость показала хорошую линейность с коэффициентом детерминации $R^2 = 0.999$. Определение правильности методики проводили при концентрациях 4; 8 и 12 мкг (по три параллельных измерения для каждой). Правильность при 4 мкг – 101.2%, при 8 мкг – 99.6%, при 12 мкг – 99.3%. Содержание действующего вещества,

заявленное производителем – 20 мг, при использовании метода производной спектрофотометрии третьего порядка найдено 20.144 мг (стандартное отклонение 0.1445), методом ВЭЖХ обнаружено 20.05 мг (стандартное отклонение 0.0837). Результаты определения зафирлукаста в таблетках методом производной спектрофотометрии и методом ВЭЖХ хорошо согласовались. Таким образом, помимо количественного определения индивидуальных компонентов, метод производной позволяет определять два или несколько лекарственных веществ при совместном присутствии.

В результате анализа литературных данных можно сказать, что хемометрические алгоритмы и производная спектрофотометрия расширяют возможности спектрофотометрического метода анализа при определении различных смесей. Однако отсутствуют систематические исследования влияния применяемого хемометрического метода, совместного использования хемометрики и производных спектров поглощения, условий регистрации спектров и дифференцирования на метрологические характеристики разрабатываемых методик.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы, посуда, оборудование

В экспериментальной части работы использовали **синтетические азокрасители**: Тартразин, Понсо 4R, Азорубин, Желтый «солнечный закат» (чистота: $\geq 85\%$), Красный очаровательный (чистота: $\geq 80\%$), производство «Роха Дайкем», Дания и Sigma-Aldrich, США; **активные фармацевтические ингредиенты**: дифенгидрамина гидрохлорид (чистота: $\geq 99.17\%$, LGC Dr.Ehrenstorfer, Германия), нафазолина нитрат (чистота: $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, США); **антибиотики**: цефуроксим натрия (цефуроксим), цефтриаксон натрия (цефтриаксон), цефотаксим натрия (цефотаксим), цефазолин натрия (Цефазолин) (порошок для приготовления раствора для инъекций, ОАО «Красфарма»), амоксициллин в таблетированной форме (в виде амоксициллина тригидрата, ООО «Барнаульский завод медицинских препаратов»); ацетонитрил (ХЧ), аммоний уксуснокислый 83% (0.1 моль/л раствор)

Посуда:

1. Колбы мерные 22-го класса точности, номинальной вместимостью 10, 25, 50, 100, мл, ГОСТ 1770-74.
2. Колбы стеклянные лабораторные конические номинальной вместимостью 100 см³, типа Кн, ГОСТ 25336.
3. Пробирки стеклянные, ГОСТ 1770-74.
4. Пипетки 1, 2-го класса точности номинальной вместимостью 1, 2, 5, 10, мл, ГОСТ 29227-91.
5. Стаканы стеклянные мерные 2-го класса точности, номинальной вместимостью 100, мл, ГОСТ 1770-74.
6. Воронки стеклянные, лабораторные тип В стекло ХС, ГОСТ 25336-82.

Оборудование:

1. Двухлучевой сканирующий спектрофотометр Shimadzu UV-1800. Спектральный диапазон 190-1100 нм, $l=1$ см. Пределы допустимых значений абсолютной погрешности по шкале $\lambda \pm 0.3$ нм, по коэффициенту пропускания $\pm 1\%$;
2. Хроматограф высокоэффективной жидкостной «Стайер» Спектрофотометрический детектор UVVIS-104. Хроматографическая колонка «Phenomenex» Luna 5u C18(2), 100 А, длина 150 мм, диаметр 4.6 мм, зернение 5 мкм;
3. Центрифуга лабораторная CM-50;
4. Ультразвуковая ванна «Digital Ultrasonic cleaner».
5. Весы аналитические AND Company Limited HR-250 A 252g / 0,1 mg Япония.
6. рН-метр 150МИ, стеклянный измерительный электрод ЭСЛК-01.7, электрод сравнения - хлорид серебряный.
7. Дозаторы BIONIT Proline 20-200, 100-1000, 200-1000 и 1000-10000 мкл.

Программное обеспечение: Расчет хемометрическими методами ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК проводили в надстройке Chemometrics2 для Microsoft Excel, предоставленной профессором Померанцевым А.Л. Производные электронных спектров поглощения первого порядка получали с помощью программного обеспечения спектрофотометра Shimadzu UV-1800 – UV-Probe 2.31.

2.2 Объекты исследования

Синтетические пищевые азокрасители:

Тартразин (E102) – 5-Окси-1-(п-сульфофенил)-4-[(п-сульфофенил)-азо]-пиразол-3 карбоновой кислоты тринатриевая соль, молекулярная масса – 534.3 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 426 нм. Допустимое суточное потребление 7.5 мг/кг веса.

Желтый «солнечнозакатный» (E110) – 6-гидрокси-5-(4'-сульфонатофенилазо) -2-нафталин сульфонат динатрия, молекулярная масса – 452.4 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 483 нм. Допустимое суточное потребление 4 мг/кг веса.

Азорубин (E122) – 4-гидрокси-3-[(4-сульфонатонафталин-1-ил)дiazенил]нафталин-1-сульфонат динатрий, молекулярная масса – 502.4 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 516 нм. Допустимое суточное потребление 4 мг/кг веса.

Понсо 4R (E124) – 2-гидрокси-1-(4'-сульфонато-1'нафтилазо)-6,8нафталиндисульфонат тринатрия, молекулярная масса – 604.5 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 507 нм. Допустимое суточное потребление 4 мг/кг веса.

Красный очаровательный AC (E129)– 6-гидрокси-5-[(2-метокси-5-метил-4-сульфофенил)-азо]-2-нафталенсульфоновой кислоты двунарий, молекулярная масса – 496 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 504 нм Допустимое суточное потребление 7.5 мг/кг веса.

Все выше перечисленные СПК (рис. 5) хорошо растворимы в воде и устойчивы в широком диапазоне pH [108]:

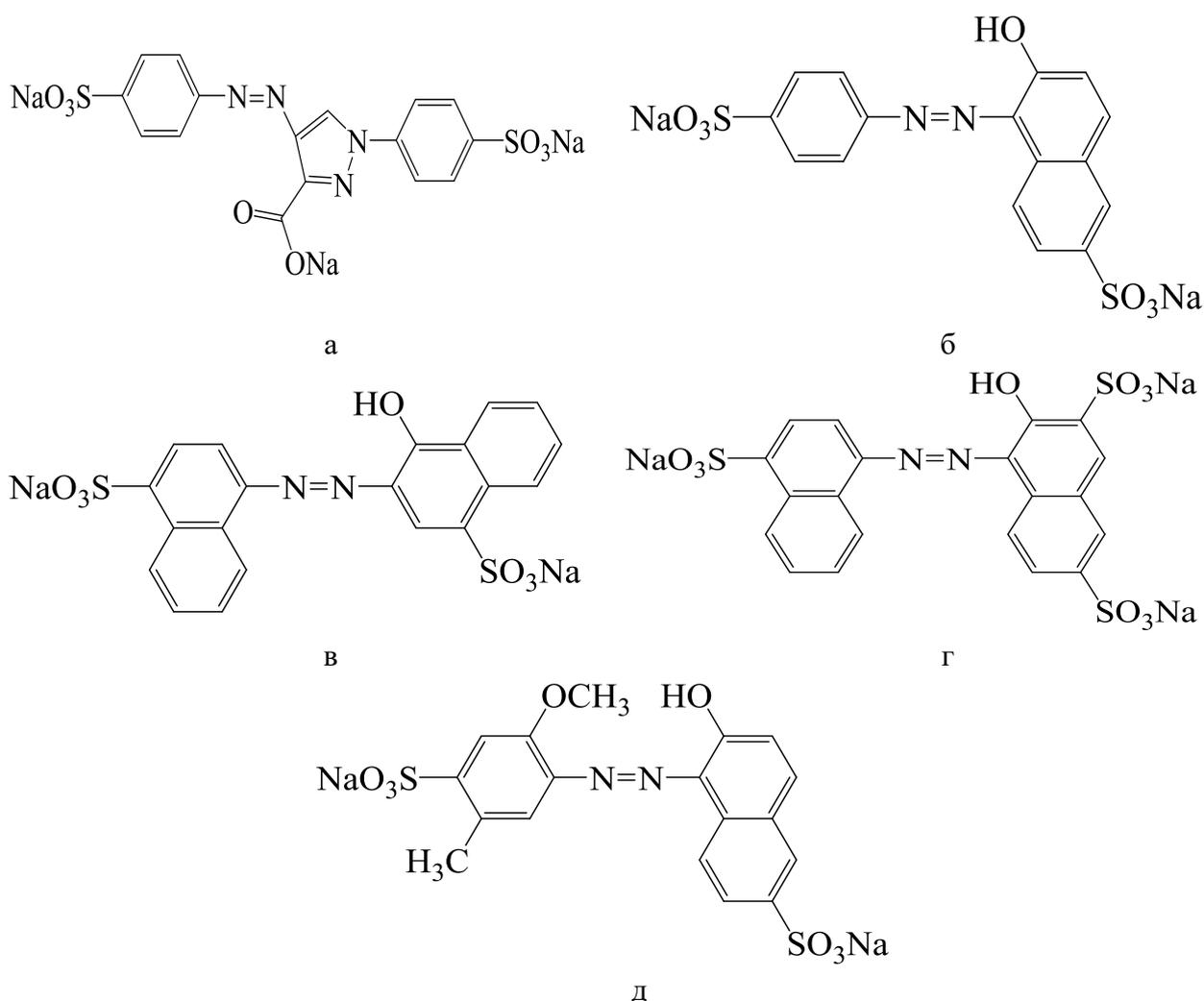


Рис. 5 Структурные формулы СПК E102 (а), E110 (б), E122 (в), E124 (г), E129(д)

Активные фармацевтические ингредиенты:

Дифенгидрамина гидрохлорид – 2-(Дифенилметокси)-N,N-диметилэтанамин (рис. 6а) – относится к H1-антигистаминные средства, оказывает антигистаминное, местноанестезирующее, противоаллергическое, противорвотное, седативное, снотворное, холинолитическое действие. Молекулярная масса – 255.36 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 258 нм.

Нафазолина нитрат (рис. 6б) – 4,5-Дигидро-2-(1-нафталинилметил)-1H-имидазол относится к группе α-адреномиметикам и антиконгестантам, суживает сосуды слизистых оболочек, зрачок, обладает противовоспалительными (противоотечными) свойствами. Молекулярная масса – 246.74 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 280 и 221нм.

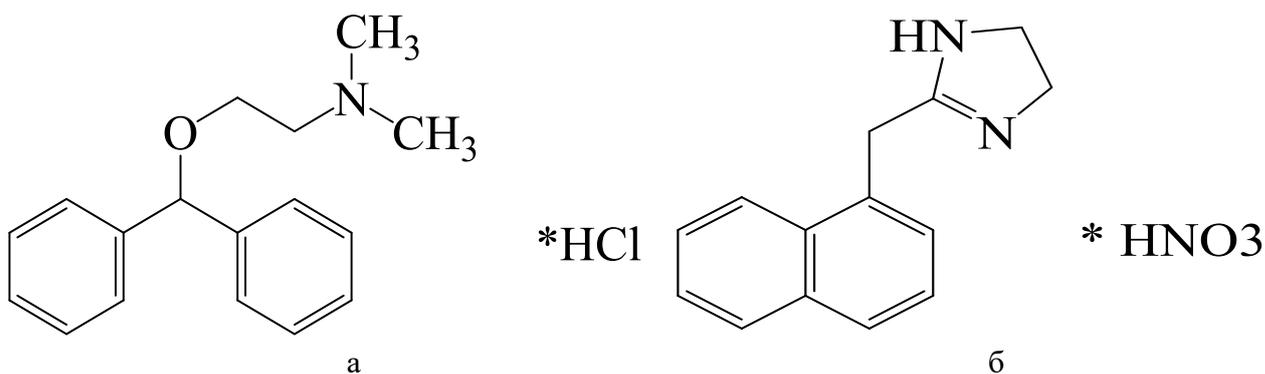


Рис.6 Структурные формулы Дифенгидрамина гидрохлорид (а) и Нафазолина нитрата (б)

Амоксициллина тригидрат – [2S-[2альфа,5альфа,6бета(S*)]]-6-[[Амино-(4-гидроксифенил)ацетил] амино]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновая кислота (в том числе в виде тригидрата или натриевой соли)., Полусинтетическое антибактериальное средство, обладающий широким спектром бактерицидной активности широкого спектра. Относится к группе пенициллинов. Молекулярная масса – 419.5 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 272 нм.

Цефуроксима натрия – [6R-[6альфа,7бета-(Z)]]-3[[Аминокарбонил)окси]метил]-7-[[2-фуранил (метоксиимино)ацетил] амино] - 8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2- карбоновая кислота (и в виде ацетила, гидрохлорида или натриевой соли), полусинтетический цефалоспориновый антибиотик II поколения, оказывает антибактериальное широкого спектра, бактерицидное действие Молекулярная масса – 446.4 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 274 нм.

Цефтриаксона натрия – [6R-[6альфа,7бета(Z)]]-7-[[2-Амино-4-тиазолил)(метоксиимино)ацетил]амино]-8-оксо-3-[[1,2,5,6-тетрагидро-2-метил-5,6-диоксо-1,2,4-триазин-3-ил)тио]метил]-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0] окт-2-ен-2-карбоновая кислота (и в виде динатриевой соли), Цефалоспориновый антибиотик III поколения. Фармакологическое действие - антибактериальное широкого спектра, бактерицидное. Подавляет рост большинства Грамположительных и Грамотрицательных микроорганизмов.

Молекулярная масса – 576.6 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 240 нм.

Цефотаксима натрия – [6R-[бальфа,7бета(Z)]]-3-[(Ацетилокси)метил]-7-[[2-амино-4-тиазолил) (метоксиимино)ацетил]амино]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2- карбоновая кислота (в виде натриевой соли). Полусинтетический цефалоспориновый антибиотик широкого спектра действия для парентерального введения. Цефотаксим оказывает бактерицидное действие путем ингибирования синтеза клеточной стенки бактерий Молекулярная масса – 477.5 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 235 нм.

Цефазолина натрия – (6R-транс)-3-[[5-Метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тио]метил]-8-оксо-7-[(1H-тетразол-1-илацетил)амино]-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота (в виде натриевой соли), Фармакологическое действие - антибактериальное широкого спектра, бактерицидное. Полусинтетический цефалоспориновый антибиотик I поколения для парентерального применения. Молекулярная масса – 476.5 г/моль, максимум поглощения водного раствора – 272 нм.

Структурные формулы антибиотиков представлены на рис. 7.

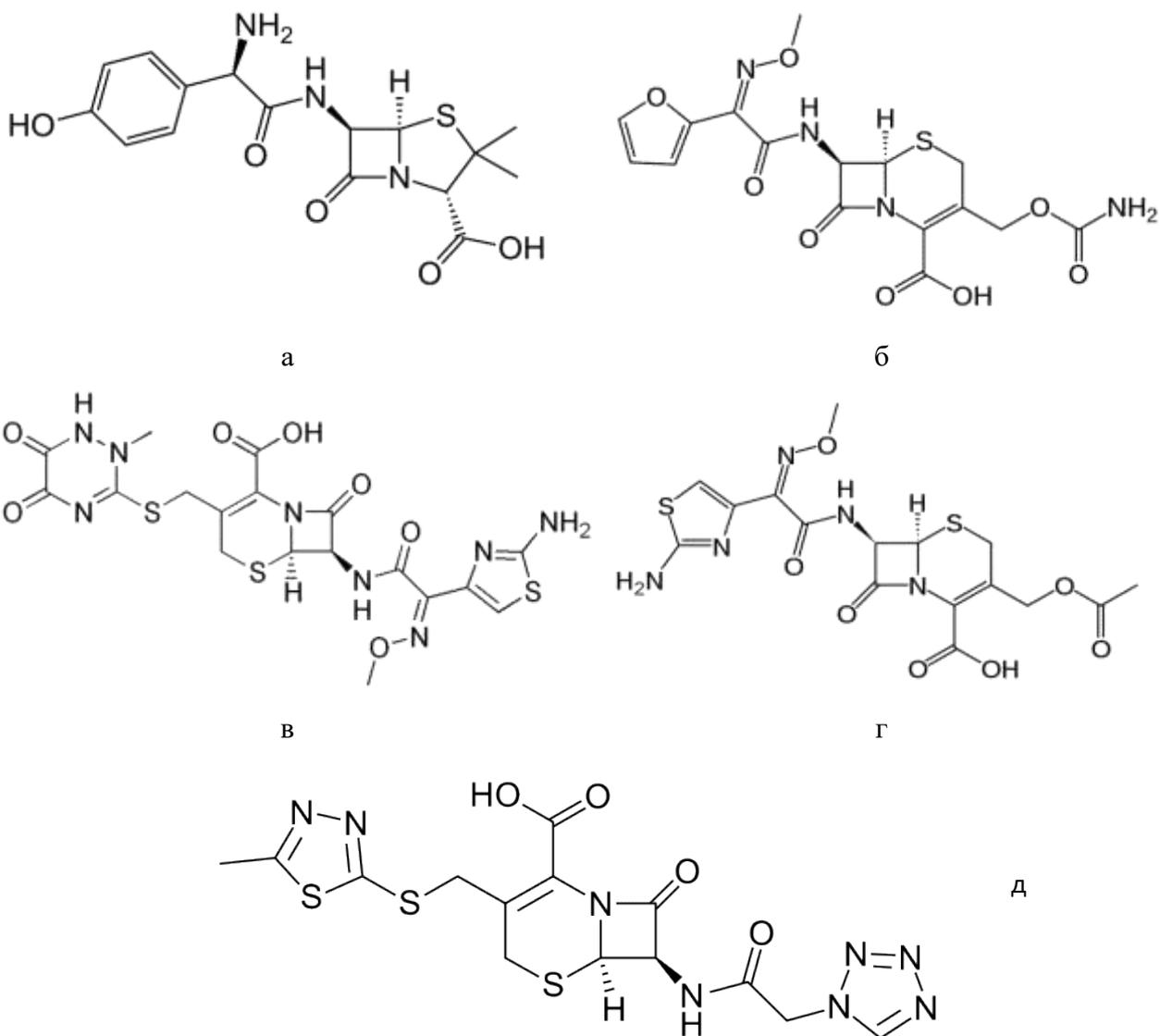


Рис.7 Структурные формулы Амоксициллина (а); Цефуроксима (б); Цефтриаксона (в); Цефотаксима (г); Цефазолина (д)

Лекарственные препараты:

Таблетки для рассасывания «**Стрепсилс® с витамином С**» («Рекитт Бенкизер Хэлскэр Интернешнл Лтд», Великобритания, регистрационный номер П N015529/01, серия KL532, изготовленный 10.2020). Действующие вещества в составе таблеток: 2,4-дихлорбензиловый спирт – 1.2 мг, амилметакрезол – 0.6 мг, кислота аскорбиновая – 100 мг. Вспомогательные вещества: ароматизатор апельсиновый PHL 105288 – 3.12 мг, левоментол – 2 мг, пропиленгликоль – 3 мг, краситель Желтый «солнечный закат» – 0.162 мг, краситель Понсо 4R – 0.0162 мг, винная кислота – 26 мг, сахароза

жидкая, декстроза жидкая [декстроза, олиго- и полисахариды] (жидкая глюкоза) до получения таблетки массой 2.6 г.;

Таблетки для рассасывания «*Трависил апельсиновые*» (производитель «Плетхико Фармасьютикалз Лтд», Индия, регистрационный номер П N011223/01-090410, серия SA5487 изготовленный 10 2020). Действующие вещества в составе таблетки: сухие экстракты листьев Адониды сосудистой – 5 мг; плодов Перца длинного – 25 мг; плодов Перца черного – 20 мг; корневищ Имбиря лекарственного – 12 мг; корней Солодки голой – 10 мг; плодов Эмблики лекарственной – 16 мг; корневищ Куркумы длинной – 15 мг; коры Акации катеху – 17 мг; плодов Фенхеля обыкновенного – 18 мг; листьев, корней и семян Базилика священного – 5 мг; плодов Терминалии чебулы – 5 мг; плодов Терминалии беллерики – 5 мг; корневищ Альпинии лекарственной – 20 мг; левоментол – 2 мг. Вспомогательные вещества: сахароза, жидкая декстроза, краситель желтый «солнечный закат», краситель азорубин, масло апельсина, масло листьев эвкалипта прутовидного, вода.

Глазные капли: «*Сигида Дуо*» (производитель ООО «ГРОТЕКС», Россия). В составе 1 мл препарата входят действующие вещества: дифенгидрамина гидрохлорид - 1 мг, нафазолина нитрат – 0.33 мг. Вспомогательные вещества: борная кислота – 16 мг; макрогол 300 – 1.125 мг; натрия гиалуронат - 1 мг; Трилон Б – 0.5 мг; 1 М раствор натрия гидроксида или 0.1 М раствор до pH 4-7; вода до 1 мл.

«*Окуметил*». (Производитель: «ООО Випс-Мед», Россия). 10 мл раствора содержат:

- активные вещества: цинка сульфат 10 мг, дифенгидрамина гидрохлорид 10 мг, нафазолина гидрохлорид 10 мг;

- вспомогательные вещества: натрия цитрат 140 мг, лимонная кислота 6 мг, бензалкония хлорид 2 мг, краситель синий метиленовый 0.3 мг, натрия хлорид 32 мг, гипромеллоза 4000 2.5 мг, натрия гидроксид 3 мг, дистиллированная вода до 10 мл.

«Полинадим» (производитель: «Синтез ОАО», Россия). Состав 1 мл раствора:

- активные вещества: дифенгидрамина гидрохлорид (димедрол) – 1.0 мг, нафазолина нитрат (нафтизин) – 0.25 мг,

- вспомогательные вещества: борная кислота (кислота борная) – 15.0 мг, натрия тетрабората декагидрат (натрия тетраборнокислый 10-водный) – 0.5 мг, динатрия эдетат (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трилон Б) – 0.6 мг, метилцеллюлоза водорастворимая – 1.5 мг, вода для инъекций – до 1.0 мл.

Состав на одну таблетку.

«Амоксициллин» (Красфарма, Россия) в таблетированной форме (в виде тригидрата амоксициллина). Действующее вещество: амоксициллина тригидрат (в пересчете на амоксициллин) – 250.0 мг. Вспомогательные вещества: крахмал картофельный – 112.6 мг, тальк – 3.7 мг, магния стеарат – 3.7 мг.

«Цефуроксим» – цефуроксима натриевая соль (Красфарма, Россия) в форме порошка для инъекций. Состав на 1 флакон – цефуроксима натрия 1.578 г, в пересчете на цефуроксим 1.5 г.

«Цефтриаксон» – цефтриаксона натриевая соль (Красфарма, Россия) в форме порошка для инъекций. Флакон содержит 1.193 г цефтриаксона натрия, в пересчете на цефтриаксон 1.0 г.

«Цефотаксим» – цефотаксима натриевая соль (Красфарма, Россия) в форме порошка для инъекций. Состав 1 флакона – 0.524 г. цефотаксима натрия, в пересчете на цефотаксим 1.0 г.

«Цефазолин» – цефазолина натриевая соль (Красфарма, Россия) в форме порошка для инъекций, флакон содержит 0.5 г цефазолина.

Пищевая продукция (напитки):

- Напиток сильногазированный безалкогольный **«Schweppes Spritz Aperitivo»**, содержащий очищенную воду, сахар, натуральные ароматизаторы, регуляторы кислотности (лимонная кислота, яблочная

кислота, цитрат натрия, винная кислота), консерванты (сорбат калия, бензоат натрия), подсластители (ацесульфам калия, сахаринат натрия), красители (желтый «солнечный закат», понсо 4R).

- Сухой порошкообразный растворимый **напиток со вкусом апельсина и клубники «YUPI»**, содержащий в своем составе сахар, регулятор кислотности (лимонная кислота), подсластители (цикломат, аспарат, сахарин), агент антислеживатель E551, регулятор кислотности (фумаровая кислота), мальтодекстрин, пищевые красители (E122, E102, E110), ароматизаторы (апельсин, клубника).

- Безалкогольный сильногазированный напиток **«YES!Fruit» вкус Персика**, содержащий воду, сахар, лимонную кислоту, концентрированный яблочный сок, ароматизатор (стабилизатор E414, E445, красители E110 и E102, антиокислители), консервант бензоат натрия, подсластители (аспартам и ацесульфам калия).

- Безалкогольный сильногазированный напиток **«Fresh Orange»** содержащий воду, сахар, лимонную кислоту, ароматизатор «Апельсин», стабилизаторы (гумми арабик, эфиры глицерина и смоляных кислот), красители (Желтый «солнечный закат», Тартразин), антиокислители, консервант бензоат натрия.

2.3 Методики приготовления растворов

Рабочие растворы СПК с концентрацией 0.1 г/л готовили растворением в дистиллированной воде точной навески СПК (0.0100 г) в мерной колбе вместимостью 100 мл. Рабочие растворы в диапазоне концентраций 1.0-25.0 мг/л, полученные разбавлением исходных растворов тем же растворителем, использовали для построения градуировочных зависимостей и приготовления модельных смесей.

Стандартные растворы АФИ с концентрацией 10^{-4} М готовили путем растворения точных навесок в 100 мл дистиллированной воды. Рабочие

растворы для приготовления модельных и проверочных смесей готовили путем последовательного разбавления стандартных растворов.

Стандартные растворы антибиотиков цефуроксима, цефазолина, цефтриаксона и цефотаксима ($C=0.01$ М) готовили из стандарта путем растворения точной навески в дистиллированной воде в мерных колбах вместимостью 25 мл.

Раствор амоксициллина ($C= 500$ мкг/мл) – 1 таблетку истирали в фарфоровой ступке, навеску 0.0050 г растворяли в том же растворителе в мерной колбе вместимостью 10 мл. Рабочие растворы ($C= 3;7;10;20;30$ мкг/мл) готовили путем дальнейшего разведения стандартного раствора. Для отделения вспомогательных веществ из растворов амоксициллина при спектрофотометрическом исследовании использовали ультразвуковую ванну "Digital Ultrasonic cleaner" («Granbo Technology Industrial Shenzhen Co., LTD, Китай).

Определение содержания красителей **E110 и E122 в препарате Трависил**: две таблетки помещали в стакан объемом 50 мл, добавляли 25 мл дистиллированной воды и перемешивали до полного растворения. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой до метки, перемешивали и регистрировали спектры поглощения

Приготовления анализируемых растворов **«Стрепсилс с витамином С»** проводилась по следующей схеме: в стакан помещали 7 таблеток препарата добавляли 25 мл воды дистиллированной растворяли до полного растворения, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки тем же растворителем.

Препараты **«Сигида Дуо»**, **«Окуметил»** и **«Полинадим»** готовили доведением аликвоты (0,5 мл для «Сигида ДУО» и «Полинадим» 0,2 мл препарата «Окуметил») разбавляли дистиллированной водой до 5 мл и регистрировали спектры поглощения..

Готовили 20 модельных смесей с разных концентраций АФИ, в диапазоне концентраций 0.038-0.400 мг/мл.

Навеску порошка «*Yupi*» 0.010 г взвешивали на аналитических весах, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяли в дистиллированной воде. Модельные растворы СПК E102, E110 и E122 готовили в диапазоне концентраций 0.5-15 мг/л, так как содержание красителей не было указано на упаковке.

Hanumok «Schweppes Spritz Aperitivo» разбавляли в 2-4 раз.

Магнитные наночастицы магнетита, модифицированные полиэтиленгликолем, синтезированы группой проф. Штыкова С.Н. согласно работе [116]. МНЧ получали методом химического осаждения из смешанного щелочного раствора солей двух- и трехвалентного железа при обработке ультразвуком. Синтез проводили на установке оригинальной конструкции при найденных ранее оптимальных параметрах (температура 40°C и скорость оборотов ≈ 1800 об/мин) с добавлением водного раствора полиэтиленгликоля в среде азота. Для удаления из раствора кислорода и создания инертной среды через раствор пропускали азот (ГОСТ 9293-74).

Полученный черный осадок МНЧ осаждали с помощью постоянного магнита (ВН) макс= 40 МГсЭ и сливали надосадочную жидкость. Затем несколько раз промывали водой в атмосфере азота и полученный коллоидный раствор помещали в пластиковую пробирку и хранили при комнатной температуре.

Средний размер МНЧ, определенный методом просвечивающей электронной микроскопии, составил 8 ± 3 нм. Дзета-потенциал МНЧ, измеренный методом электрофоретического рассеяния света (анализатор Zetasizer Nano-Z, Malvern Instruments Ltd, Великобритания) составил 24 ± 2 мВ.

Твердофазную экстракцию красителей из напитков «*YES!Fruit*» и «*Fresh orange*» проводили путем отбора 2.5 мл напитка, последующим

разбавлении их 1.5 мл дистиллированной воды и добавлении 1 мл суспензии МНЧ Fe_3O_4 . Далее МНЧ с сорбированными красителями отделяли магнитом.

Спектрофотометрическое определение красителей в напитках. Красители десорбировали с МНЧ путем добавления 3 мл раствора 0.1М NaOH и последующей нейтрализации 1М HCl. Все этапы анализа схематично представлены на рис. 8.

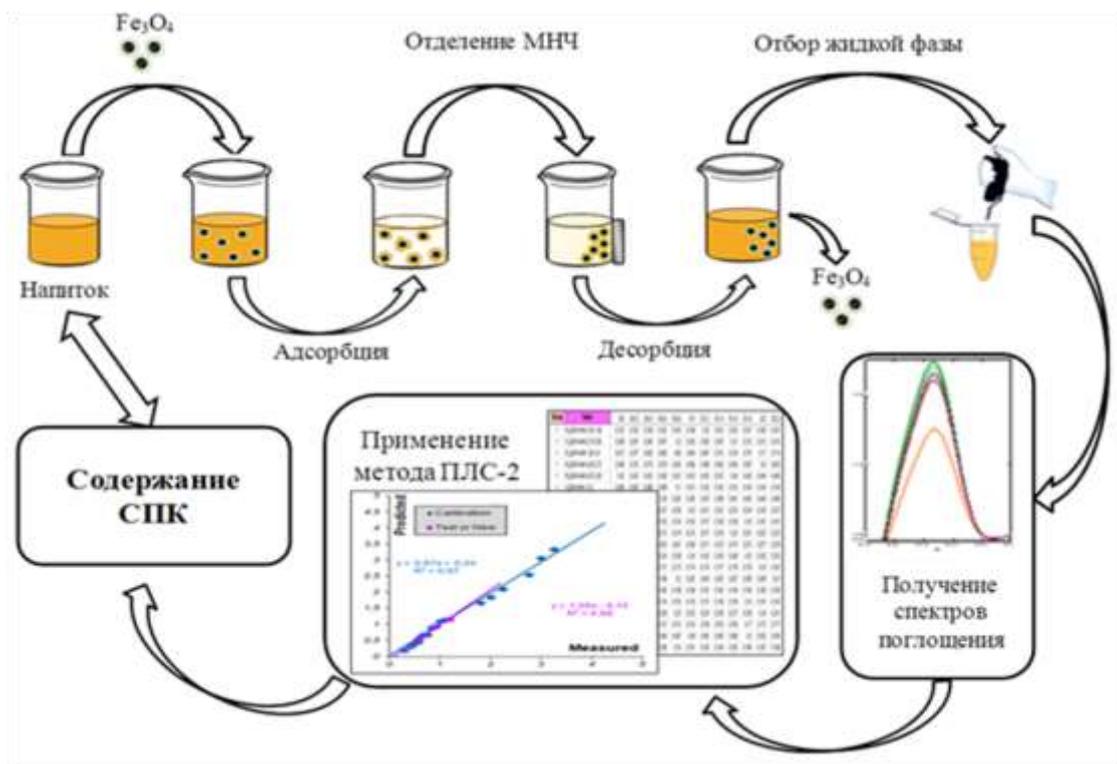


Рис. 8. Схема проведения анализа

Для оценки правильности результатов использовали метод «введено-найденно», а также метод обращено-фазовой ВЭЖХ.

Хроматографическое определение красителей. Определение красителей в напитках методом ВЭЖХ проводили методом внешнего стандарта на основе модифицированных методик [118, 119]. В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали ацетонитрил : аммоний уксуснокислый (0.1 моль/л) в градиентном режиме (с начала анализа до 2 минуты в соотношении 0:100%; со 2 по 20 минуту анализа содержание ацетонитрила постепенно возрастает до 20%, а содержание аммония уксуснокислого снижается 80%; с 21 по 40 минуту содержание ацетонитрила достигает 40%. Скорость подвижной фазы 1.4 мл/мин.

ГЛАВА 3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И НАПИТКАХ

Результаты главы опубликованы:

Силаев Д. В., Шестопалова, Н. Б., Фомина, Ю. А., Русанова, Т. Ю. Определение синтетических пищевых красителей E110 и E124 при совместном присутствии методами Фирордта и производной спектрофотометрии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2019. – Т. 19. – №. 3. – С. 257-267.

Силаев Д. В., Шестопалова Н. Б., Фомина Ю. А., Русанова Т. Ю. Применение хемометрических алгоритмов для спектрофотометрического определения синтетических пищевых красителей E110 И E124 // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2022. – Т. 65. – №. 2. – С. 50-59.

Синдяев Д.С., Силаев Д.В., Русанова Т.Ю. Применение хемометрических алгоритмов для спектрофотометрического определения синтетических красителей E124 И E129 // В сборнике: Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Межвузовский сборник научных трудов. Саратов, Изд-во «Саратовский источник». 2021. С. 156-158.

Силаев Д.В., Шестопалова Н.Б., Фомина Ю.А., Русанова Т.Ю. Определение синтетических пищевых красителей азорубина и желтого "солнечнозакатного" при совместном присутствии в модельных растворах и лекарственном препарате «Трависил" // В сборнике: Химия биологически активных веществ. Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского. Изд-во «Саратовский источник». 2019. С. 52-54.

Silaev D., Rusanova T. Y., Fomina Y., Shestopalova, N. Chemometrics-assisted spectrophotometric determination of synthetic food colorants in "Strepsils" lozenges // Optical Technologies for Biology and Medicine. – SPIE, 2022. – Т. 12192. – С. 48-52.

В настоящее время синтетические пищевые красители (СПК) широко используются в промышленности, в том числе в пищевой и фармацевтической. СПК добавляют в пищевые продукты, напитки и фармацевтические препараты как индивидуально, так и в виде смесей, позволяющих создавать цветовую гамму, ассоциирующуюся у потребителей с натуральными продуктами (малина, апельсин, смородина, лимон и т.д.). В производстве лекарственных препаратов они применяются как вспомогательные вещества для улучшения внешнего вида лекарственной формы, маркировки дозы, идентификации препарата. Широкодоступным и аппаратурно оснащенным методом определения СПК является спектрофотометрия. Однако ее применение чаще всего ограничивается анализом однокомпонентных систем, или сложной пробоподготовкой для устранения влияния других компонентов и матрицы. Спектрофотометрическое определение индивидуальных красителей в смесях осложнено сильно перекрывающимися полосами поглощения аналитов. Для решения этой проблемы предложены различные графические и математические манипуляции со спектрами поглощения. Для одновременного определения 2-3 красителей при совместном присутствии применяют спектрофотометрический метод анализа в сочетании с производными различного порядка; метод Фирордта и хемометрические алгоритмы. Для количественного определения компонентов в сложных смесях, как правило, используют метод проекций на латентные структуры (ПЛС) и регрессию на главные компоненты (РГК).

3.1 Анализ бинарных смесей синтетических пищевых красителей

Первым этапом нашего исследования явилась оценка возможности определения красителей в их бинарных смесях, так как такие смеси широко используются в промышленности и являются удобным объектом для изучения влияния различных факторов на хемометрическую модель.

3.1.1 Определение красителей E110 и E124 методом Фирордта и производной спектрофотометрии

Электронные спектры поглощения водных растворов красителей имеют широкие полосы поглощения с характеристическими максимумами при 482.5 нм и 507 нм для E110 и E124 соответственно, в модельных смесях наблюдается сильное перекрывание полос поглощения в диапазоне 350-550 нм (рис. 9).

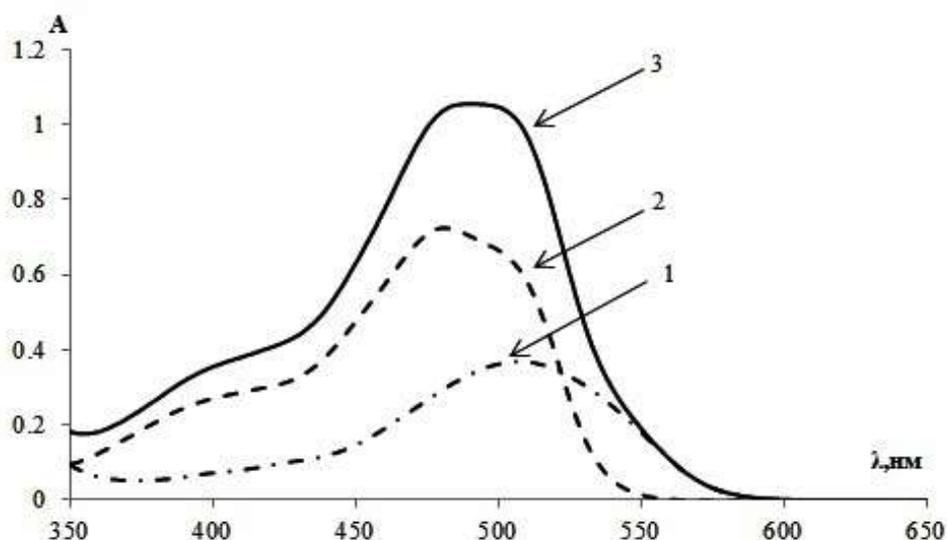


Рис. 9. Электронные спектры поглощения индивидуальных красителей E110 (1), E124 (2) и их смеси (3) ($C_{110} = 14$ мг/л, $C_{124} = 8$ мг/л)

Поскольку и метод Фирордта, и производная спектрофотометрия могут быть использованы только при соблюдении основного закона светопоглощения для обоих компонентов и условия аддитивности для их смеси, предварительно была установлена линейная зависимость оптической плотности растворов от концентрации индивидуальных красителей в диапазоне 2-20 мг/л.

Метод Фирордта. Определение аналитических длин волн по методу Фирордта проводили по спектрам поглощения индивидуальных красителей с концентрацией 8 мг/л. Рассчитывали разности $A(E110) - A(E124)$ при каждой длине волны, строили график зависимости $\Delta A = f(\lambda)$; максимальное и минимальное значения на полученной кривой были выбраны в качестве

аналитических длин волн, которые составили 470.2 нм и 536.7 нм. Найденные таким способом λ_1 и λ_2 не совпадают с максимумами поглощения индивидуальных соединений.

Для каждой концентрации красителя (2.0; 8.0; 14.0; 20.0 мг/л) при выбранных длинах волн рассчитывали коэффициенты поглощения по формуле:

$$k = \frac{A}{lc}$$

Полученные значения коэффициентов поглощения ($\text{л} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) составили для E110 – $k_1^{470.2} = 0.049 \pm 0.001$; $k_2^{536.7} = 0.005 \pm 0.001$; для E124 – $k_1^{470.2} = 0.030 \pm 0.001$; $k_1^{470.2} = 0.034 \pm 0.001$.

Проверку закона аддитивности проводили для приготовленных 16 модельных смесей с различным соотношением концентраций индивидуальных компонентов (2.0; 8.0; 14.0; 20.0 мг/л) по методике [23]. Результаты измеренных значений оптических плотностей отличались от рассчитанных по формуле:

$$A_{\text{расч}}^{\lambda} = k_1^{\lambda} C_1 l + k_2^{\lambda} C_2 l,$$

не более чем на 5% для смесей, в которых общее содержание красителей не превышало 28 мг/л. Для дальнейших расчетов смеси, отличающиеся оптической плотностью более чем на 5%, не принимали во внимание.

Концентрацию каждого красителя в 12 модельных смесях определяли при выбранных длинах волн по формулам:

$$C_{E110} = \frac{A^{\lambda_1} k_2^{\lambda_2} - A^{\lambda_2} k_2^{\lambda_2}}{(k_1^{\lambda_1} k_2^{\lambda_2} - k_2^{\lambda_1} k_2^{\lambda_1}) l} \quad C_{E124} = \frac{A^{\lambda_2} k_1^{\lambda_1} - A^{\lambda_1} k_1^{\lambda_2}}{(k_1^{\lambda_1} k_2^{\lambda_2} - k_1^{\lambda_2} k_2^{\lambda_1}) l}$$

Полученные результаты представлены в табл.7.

Как видно из представленных данных, во всех модельных растворах наблюдали несколько завышенные значения содержания E110, правильность определения варьировала от 102 до 105 %. Содержание красителя E124, наоборот, в большинстве случаев заниженное, и варьировала от 93 до 107 %.

Таблица 7. Результаты определения содержания красителей E110 и E124 при совместном присутствии в модельных водных растворах по методу Фирордта (n = 3; P = 0.95)

Введено, мг/л		Найдено, мг/л		Правильность, %	
CE110	CE124	CE110	CE124	CE110	CE124
2.0	2.0	2.04 ± 0.04	2.05 ± 0.04	102 ± 2	102 ± 2
2.0	8.0	2.10 ± 0.06	7.8 ± 0.2	105 ± 3	95.3 ± 0.8
2.0	14.0	2.05 ± 0.07	14.1 ± 0.3	103 ± 4	97 ± 1
2.0	20.0	2.10 ± 0.05	19.5 ± 1.2	102 ± 5	96 ± 1
8.0	2.0	8.3 ± 0.4	2.10 ± 0.05	103 ± 5	105 ± 2
8.0	8.0	8.2 ± 0.3	7.76 ± 0.02	103 ± 3	97.0 ± 0.3
8.0	14.0	8.2 ± 0.2	13.6 ± 0.2	102 ± 3	97.1 ± 1.6
8.0	20.0	8.2 ± 0.2	19.22 ± 0.13	102 ± 3	96.1 ± 0.7
14.0	2.0	14.4 ± 0.5	2.1 ± 0.2	103 ± 4	104 ± 6
14.0	8.0	14.3 ± 0.5	7.69 ± 0.07	102 ± 4	96 ± 1
20.0	2.0	20.4 ± 1.1	2.05 ± 0.01	102 ± 6	107 ± 6
20.0	8.0	20.5 ± 0.9	7.47 ± 0.12	103 ± 5	93 ± 1

Производная спектрофотометрия первого порядка с аналитическими длинами волн при «нулевом пересечении». Для определения содержания индивидуальных компонентов с помощью рассматриваемого подхода необходимо в первую очередь установить значения длин волн «нулевого пересечения» производных спектров поглощения первого порядка каждого соединения. Как видно из рис. 10, первые производные спектров поглощения E110 и E124 имеют единственную точку пересечения с осью абсцисс.

Первые производные спектров поглощения индивидуальных красителей и их смеси, представленные на рис. 10, показывают, что при значении «нулевого пересечения» E110 его вклад в первую производную спектра поглощения смеси будет практически равен нулю. Следовательно, при этой длине волны значение $dA/d\lambda$ будет зависеть только от концентрации E124.

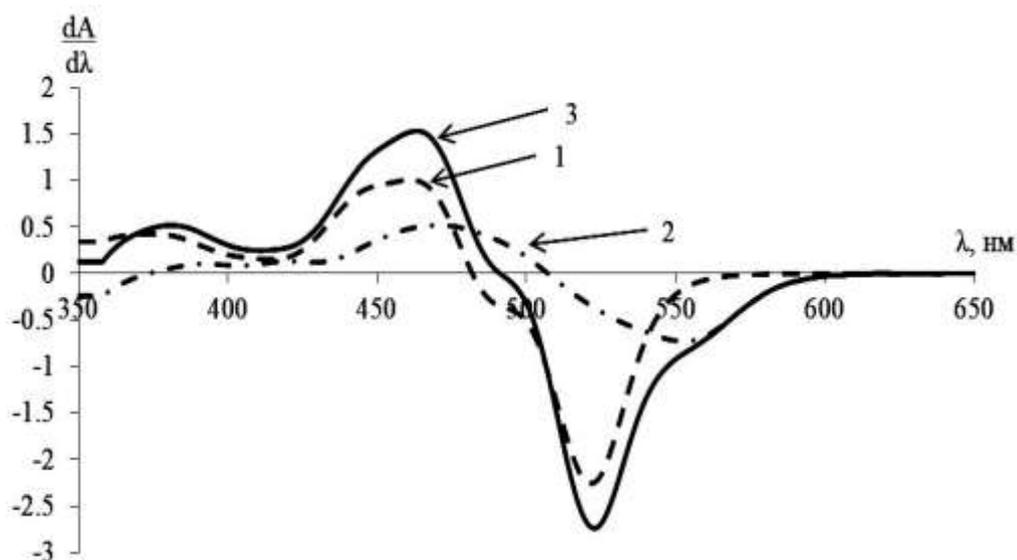
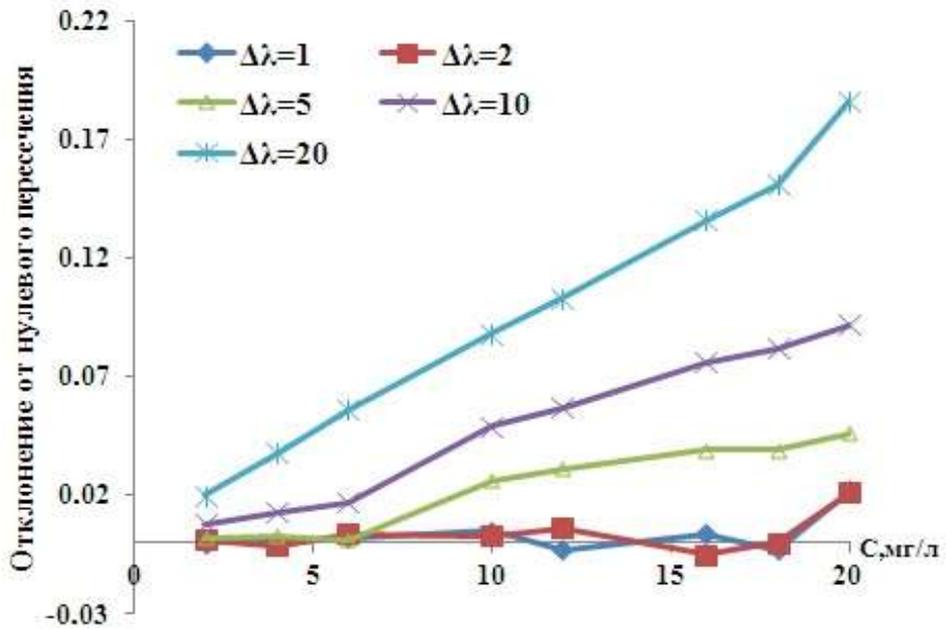


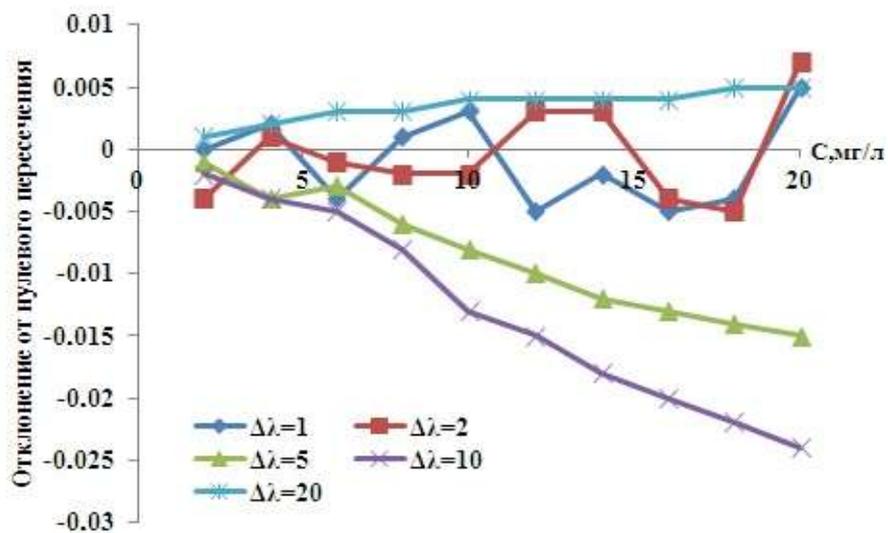
Рис. 10. Первые производные спектров поглощения E110 ($C = 14$ мг/л) (1), E124 ($C = 8$ мг/л) (2) и их смеси (3)

Для каждого красителя получены первые производные спектров поглощения для всех исследуемых концентраций, зарегистрированных с шагом сканирования (1; 0.5; 0.2 и 0.1 нм) с различным шагом дифференцирования $\Delta\lambda$ (от 1 до 80 нм) с использованием программного обеспечения спектрофотометра UV-Probe 2.31. Установлено, что значение первой производной при длине волны максимума поглощения производной нулевого порядка отлично от математического нуля и зависит как от шага сканирования при регистрации спектра поглощения так и шага дифференцирования $\Delta\lambda$ (рис. 11). Величина этого отклонения может влиять на погрешность определения.

Наименьшие отклонения от «нуля» фиксировали при шаге регистрации 0,1 нм и $\Delta\lambda = 1$ и 2 нм, значения отклонений увеличивались с ростом концентрации красителя в растворе: от 0.002 ($C = 2$ мг/л) до 0.021 ($C = 20$ мг/л).



а



б

Рис. 11. Отклонение от математического нуля значения $\frac{\partial A}{\partial \lambda}$ в точках нулевого пересечения

E110 (а), E124 (б); C = 2-20 мг/л

Также установлено, что увеличение шага дифференцирования приводит к бóльшим отклонениям от математического нуля. Так, для концентрации 20 мг/л при $\Delta\lambda = 2$ нм отклонение составляет 0.021, а при $\Delta\lambda = 20$ нм – 0.186, т.е. возрастает на порядок. Очевидно, что это может вносить

вклад в систематическую погрешность определения индивидуального компонента.

Несколько иная картина наблюдается при оценке значения первой производной спектров поглощения E124, соответствующей максимуму поглощения 507.0 нм. Как видно на рис. 6б, значения отклонений от математического нуля были как положительными, так и отрицательными. Максимальные отклонения практически на порядок ниже таковых для E110.

Для оценки погрешности определения индивидуальных красителей в смесях был выбран шаг регистрации спектра через 0,1 нм и шаг дифференцирования $\Delta\lambda = 2$ нм, для которого отклонения от нуля обоих компонентов минимальны во всем диапазоне исследуемых концентраций.

Проведено определение содержания красителей в 12 модельных смесях (концентрации даны на рис. 12) способом градуировочной зависимости.

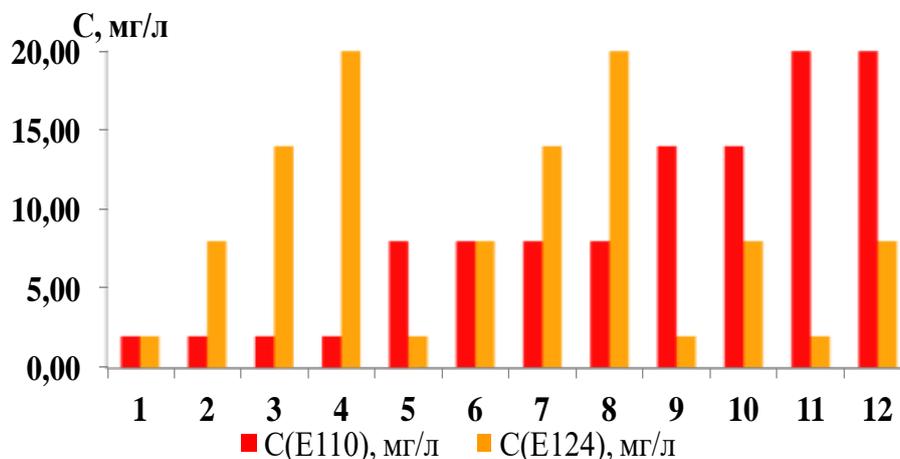


Рис. 12. Концентрации E110 и E124 в модельных растворах

Для определения Понсо 4R строили градуировочную зависимость по значениям его первых производных при длине волны «нулевого пересечения» первой производной спектра поглощения Желтого «солнечный закат» (482.5 нм). Уравнение градуировочной зависимости имело вид $dA/d\lambda = 0.0719C + 0.0002$; $R^2 = 0.9999$. Для определения Желтого «солнечный закат»

строили градуировочную зависимость по значениям его первых производных при длине волны «нулевого пересечения» первой производной спектра поглощения Понсо 4R (507.0 нм). Уравнение градуировочной зависимости имело вид $dA/d\lambda = 0.0629C - 0.0017$; $R^2 = 0.9999$. Полученные результаты представлены в табл.8.

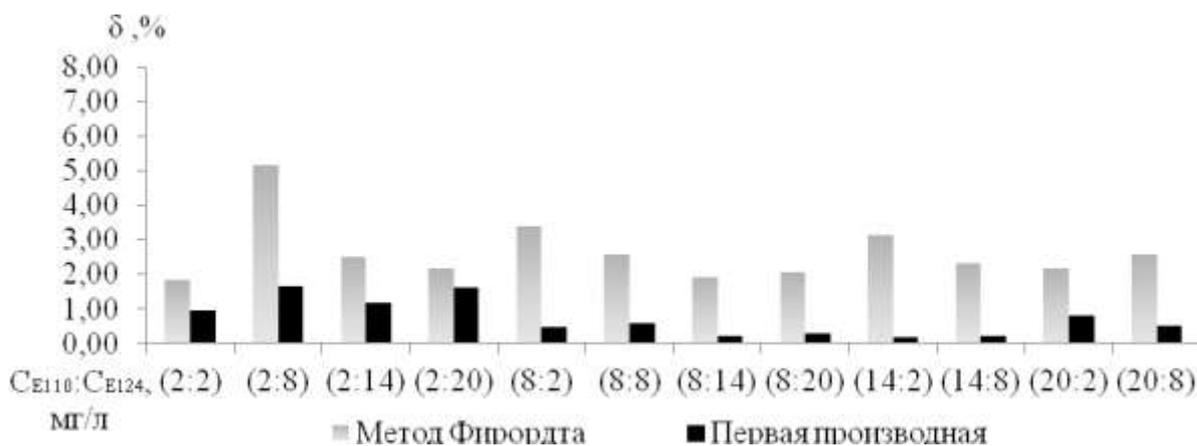
Таблица 8. Результаты определения содержания красителей E110 и E124 в модельных водных растворах методом первой производной при «нулевом пересечении» (n = 3; P = 0.95)

Введено, мг/л		Найдено, мг/л		Правильность, %	
C _{E110}	C _{E124}	C _{E110}	C _{E124}	C _{E110}	C _{E124}
2.0	2.0	2.02 ± 0.05	2.00 ± 0.04	101.0 ± 2.0	100.0 ± 2.0
2.0	8.0	1.99 ± 0.03	7.8 ± 0.1	98 ± 3	99.0 ± 1.0
2.0	14.0	1.98 ± 0.08	14.2 ± 0.2	99 ± 4	101.1 ± 1.1
2.0	20.0	2.00 ± 0.01	19.5 ± 1.2	98.4 ± 2.4	97.7 ± 2.1
8.0	2.0	8.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	101.0 ± 1.0	102.2 ± 2.2
8.0	8.0	8.0 ± 0.1	7.9 ± 0.1	99.4 ± 1.3	99.2 ± 1.7
8.0	14.0	7.98 ± 0.05	14.1 ± 0.3	99.8 ± 0.7	101.0 ± 2.2
8.0	20.0	8.0 ± 0.2	19.9 ± 0.3	99.7 ± 2.1	99.5 ± 1.4
14.0	2.0	14.03 ± 0.06	2.05 ± 0.15	100.2 ± 0.4	103 ± 3
14.0	8.0	14.0 ± 0.1	7.9 ± 0.4	99.8 ± 0.6	98.2 ± 2.2
20.0	2.0	19.8 ± 0.1	2.05 ± 0.12	99.2 ± 0.7	103 ± 3
20.0	8.0	19.9 ± 0.1	7.7 ± 0.6	99.5 ± 0.7	96 ± 3

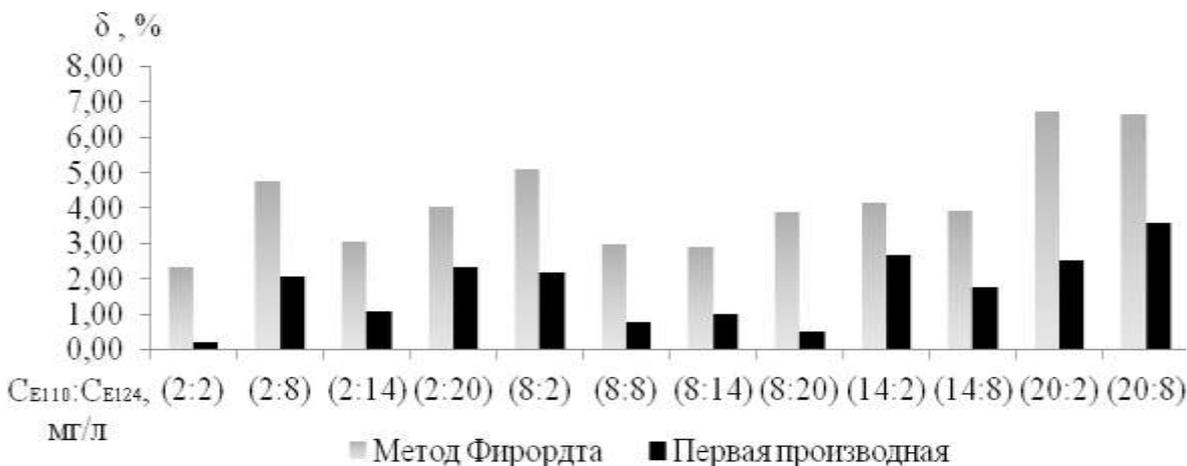
Как видно из табл. 8, правильность определения E110 с использованием метода первой производной варьирует от 98 % до 101 %, E124 – от 96 % до 103%. Проанализированы погрешности двух методов определения содержания красителей в модельных смесях. На рис. 13 представлены значения относительной погрешности определения ($\delta, \%$) в зависимости от соотношения компонентов в смеси.

Как видно из представленных диаграмм, погрешность определения индивидуальных компонентов зависит от содержания компонентов в смеси. Погрешность определения E110 по методу Фирордта составляет 1.8-5%,

погрешность определения с помощью первой производной – 0.2-2%. Применение производной спектрофотометрии для определения E124 также дает более точные результаты, чем метод Фирордта. Однако значения погрешностей несколько выше, чем у E110. Так определение E124 методом Фирордта возможно с погрешностями 2-7%, с использованием первой производной при «нулевом пересечении» – 0.2-4%.



а



б

Рис. 13. Относительные погрешности определения E110 (а) и E124 (б) в модельных смесях, полученные методами Фирордта и первой производной

Таким образом, метод Фирордта применен для определения E110 и E124 при совместном присутствии в модельных водных растворах. При выбранных аналитических длинах волн 470.2 нм и 536.7 нм погрешность определения для E110 не превышала 5%, для E124 – 7%. Для определения E110 и E124 также применен метод первой производной при «нулевом пересечении». Исследовано влияние параметров получения первых

производных и установлено, что значение «нулевого пересечения» зависит от шага регистрации спектра поглощения и шага дифференцирования $\Delta\lambda$ и концентрации компонентов. При увеличении $\Delta\lambda$ и концентрации наблюдается отклонения от «нуля» при аналитической длине волны, соответствующей максимуму поглощения компонента. Минимальные, близкие к «нулю» значения, наблюдаются при $\Delta\lambda$ не превышающей 2 нм.

Проведен сравнительный анализ двух методов по относительной погрешности определения индивидуальных компонентов в модельных смесях. Установлено, что погрешность определения методом производной спектрофотометрии меньше, чем методом Фирордта. Ошибки определения в обоих случаях зависят от концентрации и соотношения компонентов.

3.1.2 Определение E110 и E124 в модельной смеси с использованием хемометрических алгоритмов на основе производных спектров поглощения нулевого и первого порядков

Следующим этапом работы стало сравнение двух различных подходов к обработке спектрофотометрических данных: 1) производная спектрофотометрия; 2) хемометрическая обработка с использованием методов многомерной калибровки, а также их сочетания.

Использовали ранее выбранные параметры спектрофотометрирования и дифференцирования. Электронные спектры поглощения регистрировали в диапазоне 350-650 нм с интервалом 0.1 нм. Условия получения производных: шаг дифференцирования ($\Delta\lambda$) – 2 нм; масштабирующий фактор – 100.

Производные спектров поглощения нулевого (0D) и первого порядка (1D) растворов индивидуальных красителей и их смеси представлены ранее на рис. 9. Как уже отмечалось, спектры пересекаются практически во всем диапазоне и раздельное определение красителей по оптической плотности в максимуме поглощения невозможно. Применение методов Фирордта и первой производной при «нулевом пересечении» описано выше и характеризуется погрешностями 2-7% и 0.2-4% соответственно.

Шаг регистрации спектров поглощения не оказывает влияние на погрешность определения при применении хемометрических данных. При использовании минимального значения шага регистрации происходит усложнение хемометрической модели (размерности матрицы данных).

В качестве модельных смесей для применения хемометрических алгоритмов ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК использовался набор из 16 растворов, содержащих оба красителя в различных концентрациях (табл. 9). В качестве аналитических параметров выступали производные спектров поглощения смесей красителей 0D и 1D в интервале от 350 до 600 нм. Таким образом, матрица данных для хемометрического анализа имела размерность 16×2501. Все смеси разделены на обучающий (11 смесей) и проверочный (5 смесей) наборы данных. Обучающий набор образцов использовали для построения ПЛС и РГК моделей, с помощью которых проводили анализ «новых» (проверочных) смесей. Проверочные смеси характеризовались различными концентрациями обоих красителей (2,8,14,20 мг/л).

Таблица 9. Концентрации E110 и E124 в смесях для обучающего и проверочного наборов

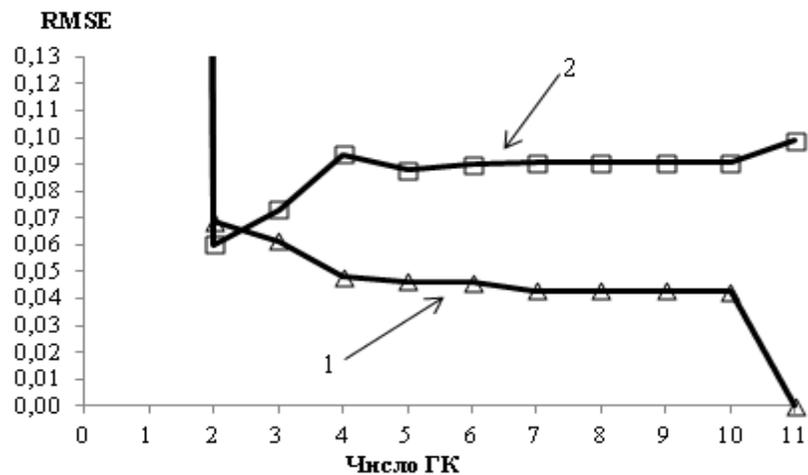
Модельная смесь	1	2*	3	4*	5	6	7*	8	9	10	11	12*	13*	14	15	16
С, мг/л	E110	2	2	2	8	8	8	8	14	14	14	14	20	20	20	20
	E124	2	8	14	20	2	8	14	20	2	8	14	20	2	8	14

*смеси, отнесенные в проверочный набор

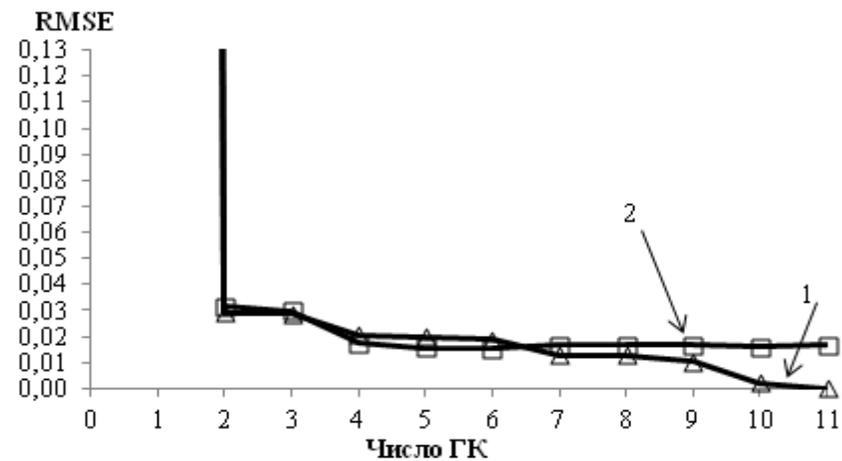
Первым этапом моделирования данных с использованием хемометрических алгоритмов является выбор оптимального числа главных компонент (в методе РГК) и латентных переменных (в методе ПЛС), которое позволяет устранить недооценку или переоценку модели. Точность многомерной градуировки принято характеризовать величиной RMSEC (среднеквадратичная ошибка градуировки), а точность предсказания величиной RMSEP (среднеквадратичной ошибкой прогноза). Эти параметры оценки точности модели связаны между собой, и должны рассматриваться совместно, так как улучшение одного неизбежно приведет к ухудшению

другого параметра [117]. Выбор оптимального числа главных компонент (ГК) и латентных переменных (ЛП) осуществляли на основании минимального значения RMSEP, при котором, однако, не наблюдается резкого возрастания значения RMSEC, что определяет оптимальную сложность модели.

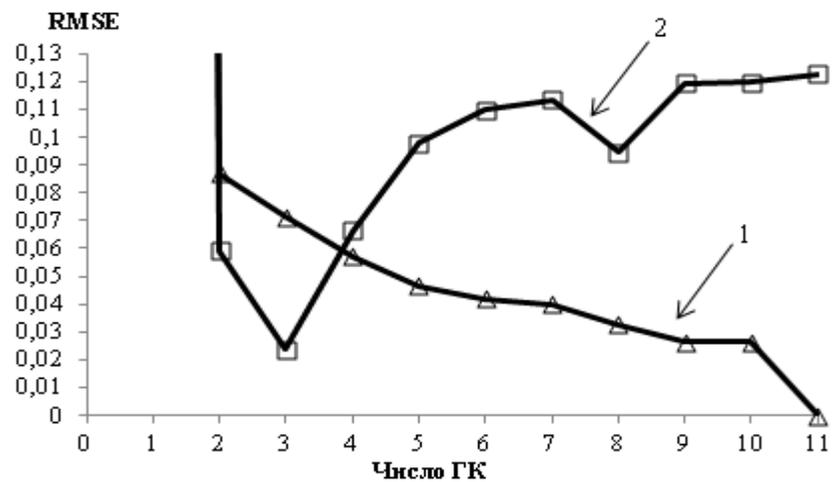
Также проведена оценка влияния диапазона длин волн (350-600; 370-580 и 400-550 нм) на параметры моделей ПЛС и РГК. В таблице 10 суммированы параметры RMSEC и RMSEP при различных диапазонах длин волн. Как видно из таблицы с уменьшением числа длин волн (переменных матрицы данных) происходит упрощение модели, что приводит к недооценке данных, тогда как усложнение модели может привести к переоценке. Параметры RMSEC и RMSEP, характеризующие оценку точности модели являются взаимосвязанными и не могут рассматриваться отдельно, на рис. 14 представлена зависимость представленных значений. Выбранное число ГК (ЛП) представлено в табл. 11.



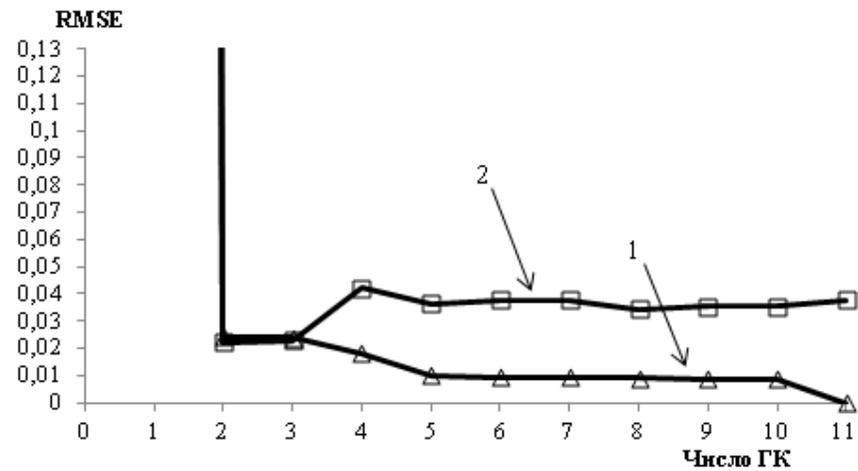
а



б



в



г

Рис.14. Зависимость RMSEC (1) и RMSEP (2) от числа главных компонент на примере метода РГК при определении E110 0D(а), 1D(б) и E124 0D(в), 1D(г) в их смесях

Таблица 10. Значения параметров RMSEC и RMSEP при различных диапазонах длин волн методами ПЛС-1 и РГК для E110 и E124

Число LV/PC	E110						E124					
	350-600		370-580		400-550		350-600		370-580		400-550	
	ПЛС-1											
	RMSEC	RMSEP										
1	4,329	3,375	4,323	3,384	4,389	3,402	5,174	2,976	5,175	2,971	5,237	3,042
2	0,052	0,276	0,052	0,272	0,052	0,302	0,019	0,367	0,018	0,410	0,018	0,368
3	0,050	0,237	0,049	0,230	0,049	0,259	0,018	0,409	0,018	0,432	0,018	0,381
4	0,016	0,689	0,014	0,226	0,014	0,250	0,005	0,109	0,004	0,308	0,005	0,322
5	0,004	0,390	0,002	0,223	0,004	0,243	0,001	0,160	4,69E-04	0,308	0,001	0,311
6	0,001	0,449	0,001	0,221	0,001	0,245	1,64E-04	0,153	1,32E-04	0,309	1,68E-04	0,311
7	1,79E-04	0,453	5,54E-05	0,221	1,04E-04	0,243	3,34E-05	0,153	2,17E-05	0,309	2,96E-05	0,310
8	2,22E-05	0,452	9,68E-06	0,221	4,11E-07	0,243	4,72E-06	0,153	3,00E-06	0,309	3,86E-06	0,310
9	1,34E-06	0,452	1,94E-07	0,221	7,35E-09	0,243	4,95E-07	0,153	1,02E-08	0,309	3,74E-07	0,310
10	1,78E-15	0,452	9,28E-16	0,221	1,31E-15	0,243	1,89E-15	0,153	1,71E-15	0,309	3,44E-15	0,310
	РГК											
1	4,763	3,215	4,758	3,224	3,356	3,078	5,726	3,799	5,729	3,799	5,720	3,778
2	0,052	0,672	0,052	0,674	0,136	0,986	0,019	0,367	0,077	0,397	0,018	0,368
3	0,051	0,690	0,051	0,678	0,045	0,298	0,018	0,408	0,014	0,408	0,018	0,377
4	0,048	0,935	0,049	0,672	0,031	0,312	0,017	0,288	0,013	0,391	0,018	0,380
5	0,046	1,087	0,042	0,689	0,030	0,316	0,016	0,203	0,013	0,387	0,017	0,373
6	0,041	0,913	0,041	0,710	0,027	0,305	0,016	0,245	0,013	0,386	0,017	0,373
7	0,038	0,831	0,040	0,717	0,017	0,293	0,015	0,227	0,012	0,336	0,017	0,379
8	0,036	0,881	0,035	0,742	0,013	0,304	0,013	0,187	0,010	0,316	0,017	0,376
9	0,033	0,850	0,030	0,692	0,012	0,299	0,001	0,156	0,004	0,283	0,003	0,318
10	0,000	0,915	0,000	0,691	0,000	0,289	0,000	0,153	0,000	0,287	0,000	0,310

Таблица 11. Оптимальное число ГК для определения красителей различными методами

Метод	РГК		ПЛС1		ПЛС2	
	0D	1D	0D	1D	0D	1D
E110	2	3	2	3	2	3
E124	6	2	4	2	4	2

В выбранной системе наблюдается при всех выбранных диапазонах длин волн закономерное снижение значений показателя RMSEC с возрастанием числа LV или PC в зависимости от рассматриваемого метода ПЛС, РГК. Значение RMSEP в зависимости от диапазона длин волн имеет разное значение и варьируется от 3 до 5 для обоих красителей для метода ПЛС и 2 до 6 для метода РГК соответственно.

Увеличение числа латентных переменных больше 6 ведет к усложнению моделей а, следовательно, приводит к переоценке значений среднеквадратичных остатков в обучающем и проверочном наборах.

Исходя из данных среднеквадратичных ошибок определения в изучаемых моделях, исключая возможность упрощения модели и уменьшения влияния фактора переоценки для дальнейшего определения содержания красителей в объекте исследования был выбран диапазон 350-600 нм, который убирает шум, и не усложняет или упрощает модель, снижает относительную погрешность определения (табл. 10, рис. 14).

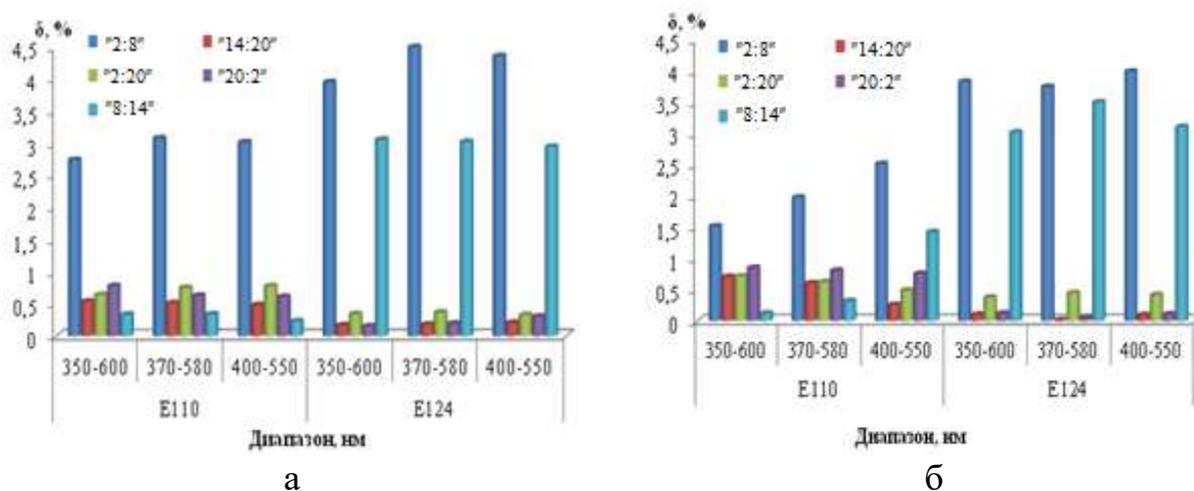


Рис.15. Относительная погрешность определения E110 и E124 в обучающем наборе методом ПЛС (а) и РГК (б)

При оптимальном количестве ГК (ЛП) проводили моделирование данных спектров поглощения 0D и 1D методами ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК.

При построении проекционного пространства метод ПЛС-1 учитывает значения матрицы X и один отклик Y (т.е. концентрацию одного красителя), в результате получается несколько проекционных подпространств в отдельности для каждого компонента, а в методе ПЛС-2 отклики Y (концентрации обоих красителей) рассматриваются как общее подпространство [117]. Основные параметры моделей для определения E110 и E124 суммированы в таблице 12.

Таблица 12. Параметры моделей определения E110 и E124 методами РГК, ПЛС-1 и ПЛС-2

Краситель	Метод	D	Обучающий набор			Проверочный набор		
			Уравнение	R ²	RMSEC	Уравнение	R ²	RMSEP
E110	РГК	0	$y=0.9999x+0.0014$	0.99	0.069	$y=1.0086x-0.0763$	1.00	0.075
		1	$y=0.9999 +0.0015$	0.99	0.071	$y=1.0033x-0.0377$	1.00	0.033
	ПЛС-1	0	$y=0.9999x+0.0014$	0.99	0.069	$y=1.0086x-0.0762$	1.00	0.075
		1	$y=0.9999x+0.0008$	0.99	0.052	$y=1.0045x-0.0376$	0.99	0.068
	ПЛС-2	0	$y=0.9999x+0.0014$	0.99	0.069	$y=1.0086x-0.0762$	1.00	0.075
		1	$y=0.9999x+0.0008$	0.99	0.052	$y=1.0045x-0.0381$	0.99	0.069
E124	РГК	0	$y=1.0000x+0.0001$	1.00	0.021	$y=1.0000x+0.0136$	1.00	0.018
		1	$y=1.0000x+0.0001$	1.00	0.024	$y=0.9993x+0.0225$	1.00	0.024
	ПЛС-1	0	$y=1.0000+0.0001$	1.00	0.008	$y=0.9998x+0.0122$	1.00	0.015
		1	$y=1.0000x+0.0001$	1.00	0.024	$y=0.9993x+0.0226$	1.00	0.024
	ПЛС-2	0	$y=1.0000x+0.0002$	1.00	0.02	$y=0.9991x+0.0388$	1.00	0.022
		1	$y=1.0000x+0.0001$	1.00	0.024	$y=0.9993x+0.0225$	1.00	0.024

Как видно из данных таблицы уравнения зависимостей «измерено-предсказано» имеют тангенс наклона близкий к 1 и свободный член близкий к нулю; коэффициент корреляции близок к 1; что говорит о высоком качестве моделей.

Величины правильности определения E110 и E124 в проверочных смесях различными методами представлены в таблице 13.

Таблица 13. Правильность определения E110 и E124 в проверочном наборе

Краситель	Метод	D	C _{E110} :E ₁₂₄ в смеси, мг/л				
			2:20	2:8	8:14	14:20	20:2
E110	РГК	0D	95.63	99.13	100.10	99.8	100.69
		1D	98.08	99.13	99.99	99.76	100.26
	ПЛС-1	0D	95.63	99.13	100.10	99.8	100.69
		1D	96.51	100.97	100.47	99.46	100.53
	ПЛС-2	0D	95.63	99.13	100.10	99.8	100.69
		1D	96.46	100.97	100.48	99.46	100.56
E124	РГК	0D	100.11	100.2	100.22	99.98	100.33
		1D	100.14	100.23	100.23	99.9	100.7
	ПЛС-1	0D	100.08	100.15	100.19	99.95	100.27
		1D	100.14	100.23	100.23	99.9	100.7
	ПЛС-2	0D	100.18	100.44	100.34	99.95	101.37
		1D	100.14	100.23	100.23	99.9	100.7

Сравнивая результаты определения красителей методами ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК, можно сказать о зависимости правильности определения не только от метода, но и концентрации красителей E110 и E124 в смеси.

Наибольшая погрешность наблюдается при определении E110 в смеси с его малой концентрацией и большой концентрацией E124 (2:20 мг/л E110 и E124 соответственно). При малых концентрациях E124 проявляется обратная зависимость – завышение погрешностей определения данного компонента (20:2 мг/л E110 и E124 соответственно). Диапазоны величин правильности для различных методов суммированы в табл. 14.

Таблица 14. Правильность определения синтетических пищевых красителей с использованием различных хемометрических алгоритмов

СПК	Правильность, %					
	ПЛС-2		ПЛС-1		РГК	
	0D	1D	0D	1D	0D	1D
E110	95.63–100.69	96.46–100.97	95.63–100.69	96.51–100.97	95.63–100.69	98.08–100.26
E124	99.95–101.37	99.90–100.70	99.95–100.27	99.90–100.70	99.98–100.33	99.90–100.70

Таким образом, показана возможность отдельного определения синтетических пищевых красителей E110 и E124 в их смесях проекционными методами РГК, ПЛС-1 и ПЛС-2 с использованием производных спектров поглощения нулевого и первого порядка. Оценены среднеквадратичные ошибки градуировки и прогноза, на основании которых подобраны оптимальное количество главных компонент/латентных переменных для данных методов.

Установлено, что все исследованные модели дают высокие значения коэффициентов корреляции и тангенсы угла наклона зависимостей «измерено-предсказано» близкие к единице, что позволяет рекомендовать эти методы для практического использования.

3.1.3 Спектрофотометрическое определение синтетических пищевых красителей E110 и E124 в пастилках «Стрепсилс»

Пастилки «Стрепсилс» содержат красители E110 и E124 в качестве вспомогательных веществ – корригента цвета. Согласно инструкции по применению препарата «Стрепсилс» разрешено к применению взрослым – 8 таблеток в сутки. Превышение норм предельно допустимого поступления красителей в организм может привести к негативным последствиям (аллергическим реакциям, гиперактивности и снижению внимания у детей).

Для моделирования был расширен диапазон концентраций красителей, что связано с соотношением концентраций красителей в препарате «Стрепсилс». Готовили 18 модельных смесей в диапазоне концентраций индивидуальных компонентов 1-25 мг/л и в различных соотношениях (табл. 15). Регистрацию спектров проводили в интервале – 0,5 нм.

Таблица 15. Концентрации красителей E110 и E124 в модельных растворах

Модельная смесь	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Концентрация мг/л	E110	2	2	2	2	8	8	8	8	14	14	14	14	20	20	20	20	25
	E124	2	8	14	20	2	8	14	20	2	8	14	20	2	8	14	20	1

На рис. 16 представлены спектры поглощения индивидуальных красителей, их смеси и раствора препарата «Стрепсилс». Раствор таблеток препарата «Стрепсилс» осуществляли путем растворения на УЗ-ванне 7 таблеток в 25 мл дистиллированной воды и последующим количественным переносом в мерную колбу на 50 мл (см. Глава 2, раздел 2.3).

Как видно из рисунка, спектр поглощения препарата имеет широкую полосу поглощения с максимумами характерными как для красителя E110, так и красителя E124.

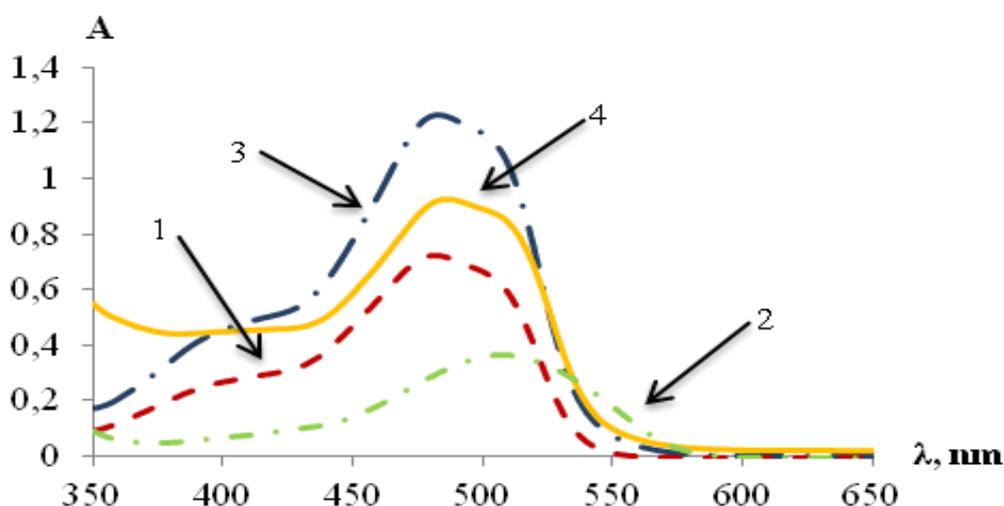


Рис. 16. Электронные спектры поглощения E110 (1), E124 (2) с концентрацией 10 мг/л, их смеси с концентрацией 20:2 мг/л (3) и раствора 7 таблеток «Стрепсилса» (4)

Для определения содержания E110 и E124, входящих в состав таблеток «Стрепсилс», методом РГК была использована матрица 20×561 и спектральный диапазон длин волн 420-700 нм. Определение E110 методом ПЛС проводилось с использованием матрицы 20×800 в диапазоне 350-750 нм; E124 – 20×700 в диапазоне 450-700 нм.

Среднеквадратичные ошибки калибровки и предсказания в изучаемых моделях представлены на рис. 17. Исходя из представленных данных для метода РГК наиболее подходящим числом ГК для определения E110 является 9; для E124 – 6; алгоритм ПЛС показывает наиболее подходящее число ЛП 4 и 3 для E110 и E124 соответственно.

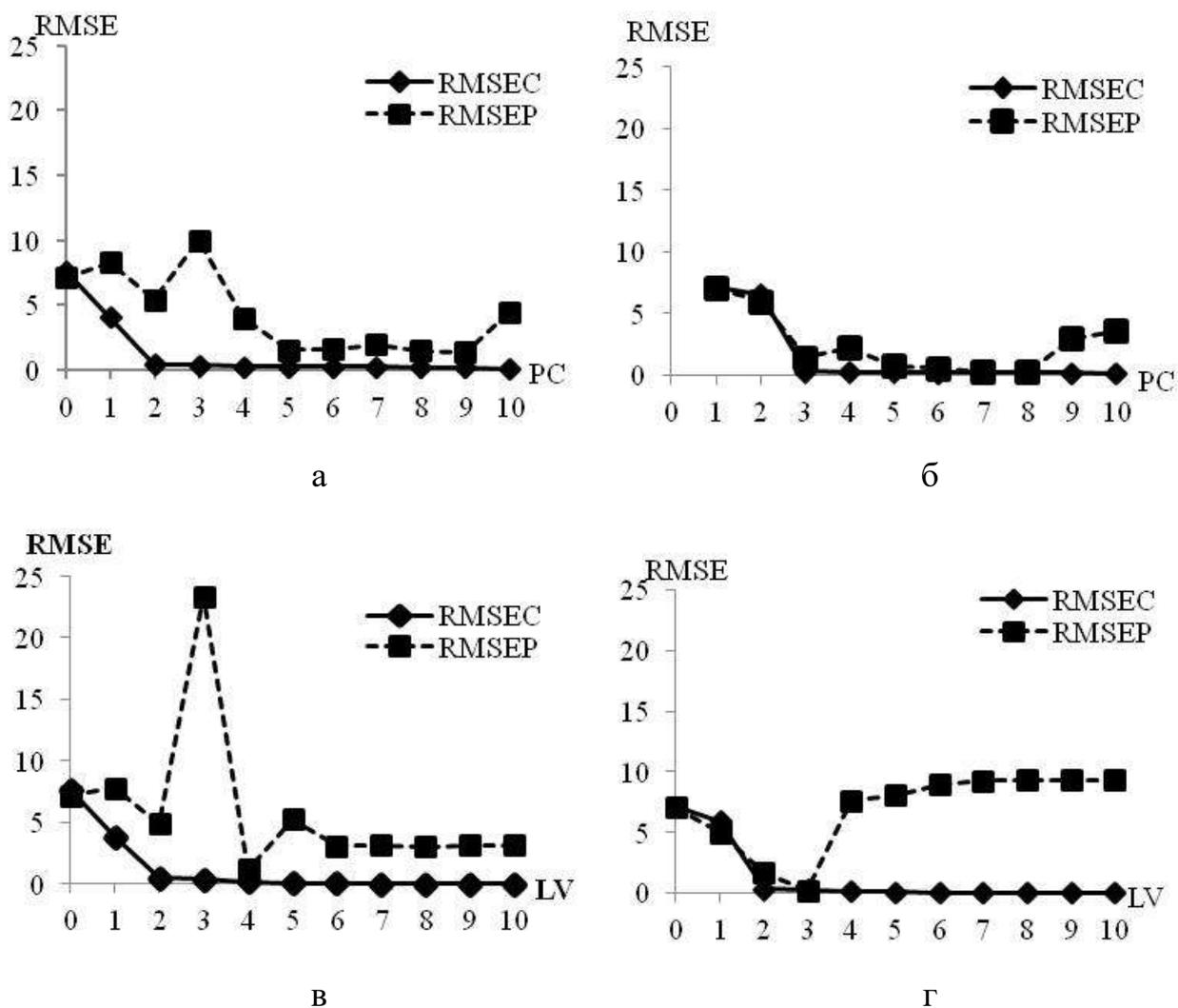


Рис. 17. Среднеквадратичные ошибки определения обучающего и проверочного наборов методами РГК E110 (а); E124 (б); ПЛС E110 (в); E124 (г)

При выбранных ГК / ЛП проводилось определение содержания СПК в анализируемом растворе препарата. Метод РГК дает наименьшие ошибки определения независимо от концентрации красителей в анализируемом растворе. При выбранных значениях ГК найдено 0.152 и 0.0174 мг в таблетке E110 и E124, что соответствует ошибке определения 6.1 и 7.5 % соответственно. Алгоритмы ПЛС в свою очередь показывают ошибки определения больше чем РГК 4.95 и 14.1 %, что соответствует 0.154 и 0.0185 мг E110 и E124 в таблетке соответственно при заявленном содержании в инструкции по применению 0,162 мг E110 и 0,0162 мг E124 в 1 таблетке.

3.1.4 Определение красителей E110 и E124 в напитке «Schweppes Spritz Aperitivo»

Сочетание СПК E110 и E124 также было обнаружено в сильногазированном безалкогольном напитке «Schweppes Spritz Aperitivo». На этикетке отсутствует информация о концентрации СПК, входящих в состав напитка. Неразбавленный напиток показывал высокую оптическую плотность, для определения концентрации смеси E110 и E124 напиток разбавляли в несколько раз и регистрировали спектры поглощения, которые представлены на рис. 18.

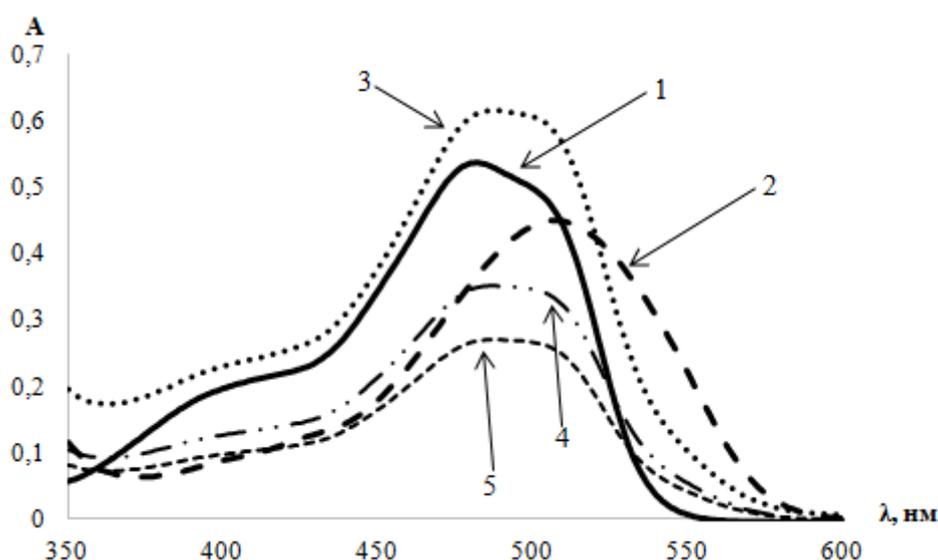


Рисунок 18. Спектры поглощения СПК E110 (1), E124 (2) и напитка “Schweppes”, разбавленного в 2(3),3 (4) и 4 (5) раз.

Видно, что без применения хемометрической обработки данных раздельно определить красители невозможно.

Для разрешения перекрывающихся спектральных кривых зарегистрирован спектры поглощения смесей красителей и образцов напитка с шагом регистрации 1 нм. Составлен набор данных, включающий обучающие и проверочные набор смесей (табл.9). Общая матрица данных для определения имела размерность 19*251

При выбранных ГК / ЛП производилось определение содержания СПК в анализируемом растворе напитка. Метод РГК дает наименьшие ошибки определения не зависимо от концентрации красителей в анализируемом растворе. При выбранных значения ГК найдено 44 ± 7 и 25 ± 5 мг/л в таблетке E110 и E124, что соответствует относительной погрешности определения от 2,1 до 4,6% и 2,9-3,6% соответственно. Алгоритмы ПЛС в свою очередь показывают ошибки определения больше чем РГК, от 4,09 до 5,3 – 6,2%, что соответствует 41 ± 6 и 22 ± 3 мг/л E110 и E124 соответственно.

3.1.5. Применение хемометрических алгоритмов для спектрофотометрического определения синтетических красителей E124 и E129

На рис. 19 представлены электронные спектры поглощения индивидуальных красителей. Как видно из рисунка в спектре красителя E129 наблюдается широкая полоса с максимумом в области 502 нм, для E124 характерна полоса с максимумом при 507 нм. Таким образом, красители имеют близкие значения λ_{\max} , нм. Для определения СПК с близкорасположенными максимумами поглощения использовали хемометрические алгоритмы.

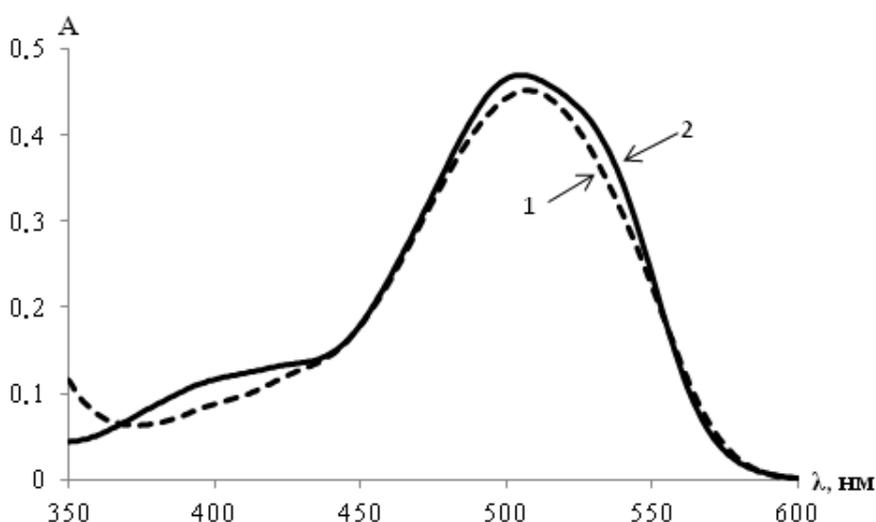


Рис.19. Электронные спектры поглощения красителей E124 (1), E129 (2).

В качестве образцов (модельных смесей) для применения хемометрических алгоритмов ПЛС-1 и ПЛС-2 использовался набор из 16 растворов, содержащих оба красителя в различных концентрациях (табл. 15).

Таблица 15. Концентрации E124 и E129 в смесях для обучающего набора, мкмоль/л

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
E124	1	2	3	4	2.5	3.5	4.5	4.5	4	3.5	3	2	1.5	1	0.5	0.7
E129	1	2	3	4	2.5	3.5	4.5	0.5	1	1.5	2	3	3.5	4	4.5	0.7

Первым этапом моделирования данных с использованием метода ПЛС является выбор оптимального числа латентных переменных (ЛП). Точность многомерной градуировки принято характеризовать величиной RMSEC (среднеквадратичная ошибка градуировки), а точность предсказания величиной RMSEP (среднеквадратичной ошибкой прогноза). Выбор оптимального числа ЛП был осуществлен на основании минимального значения RMSEP, при котором, однако, не наблюдается резкого возрастания значения RMSEC, что определяет оптимальную сложность модели.

Наиболее подходящим числом ЛП для определения E124 методом ПЛС-1 является 7, методом ПЛС-2 – 8; для определения E129 предложенными методами наиболее подходящее число ЛП – 1.

При оптимальном количестве ЛП проводили моделирование данных спектров поглощения методами ПЛС-1 и ПЛС-2. Основные параметры моделей для определения E110 и E124 суммированы в таблице 16.

Таблица 16. Параметры моделей определения E124 и E129 методами ПЛС-1 и ПЛС-2

СПК	Метод	Обучающий набор			Проверочный набор		
		Уравнение	R ²	RMSEC	Уравнение	R ²	RMSEP
E124	ПЛС-1	$y = 1.00x + 0.00$	0.98	0.0193	$y = 0.35x + 12.32$	1.00	11.28
	ПЛС-2	$y = 1.00x + 0.00$	0.98	0.0362	$y = 1.69x + 1.45$	0.35	28.76
E129	ПЛС-1	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.0004	$y = 0.99x + 0.49$	1.00	0.2911
	ПЛС-2	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.0787	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.2574

Как видно из данных таблицы 16 уравнения зависимостей «измерено-предсказано» для красителя E129 имеют тангенс наклона близкий к 1 и свободный член близкий к нулю; коэффициент корреляции близок к 1; что говорит о высоком качестве этих моделей. Таким образом, E129 определяется обоими методами, в отличие от E124. Правильность определения E129 с использованием алгоритмов ПЛС-1 составляет 97-99%; ПЛС-2 показывает правильность 98-102%. Правильность определения E124 не является приемлемой для определения СПК в смеси.

Таким, образом, показана возможность индивидуального определения синтетического пищевого красителя E129 на фоне E124 проекционными методами ПЛС-1 и ПЛС-2 с использованием спектров поглощения. Оценены среднеквадратичные ошибки градуировки и прогноза, на основании которых подобраны оптимальное количество латентных переменных для данных методов.

3.1.6 Определение E110 и E122 при совместном присутствии в лекарственном препарате «Трависил» методом производной спектрофотометрии

К фармацевтической продукции предъявляются высокие требования безопасности, распространяющиеся не только на действующие вещества, но и на вспомогательные, к которым относятся СПК. Однако соответствующих требований по содержанию СПК в лекарственных формах до настоящего времени не разработано, в Государственной Фармакопее РФ отсутствуют единые, утвержденные методики определения красителей в лекарственных формах. Для определения синтетических красителей в БАДах предложены спектрофотометрические и хроматографические методы с предварительной твердофазной экстракцией, которые характеризуются достаточной трудоемкостью и применением токсичных органических растворителей [120].

Одним из подходов, применяемых для определения содержания красителей при перекрывании полос поглощения, является метод первой производной при «нулевом пересечении». Однако в литературе отсутствуют сведения о применении данного метода для определения исследуемых красителей.

Электронные спектры поглощения водных растворов СПК имеют широкие полосы с характеристическими максимумами при 481.6 ± 0.2 нм и 515.9 ± 0.2 нм для E110 и E122 соответственно (рис. 20, кривая 1,2). В модельных смесях наблюдается сильное перекрывание полос поглощения в диапазоне 350-750 нм (рис. 20, кривая 3).

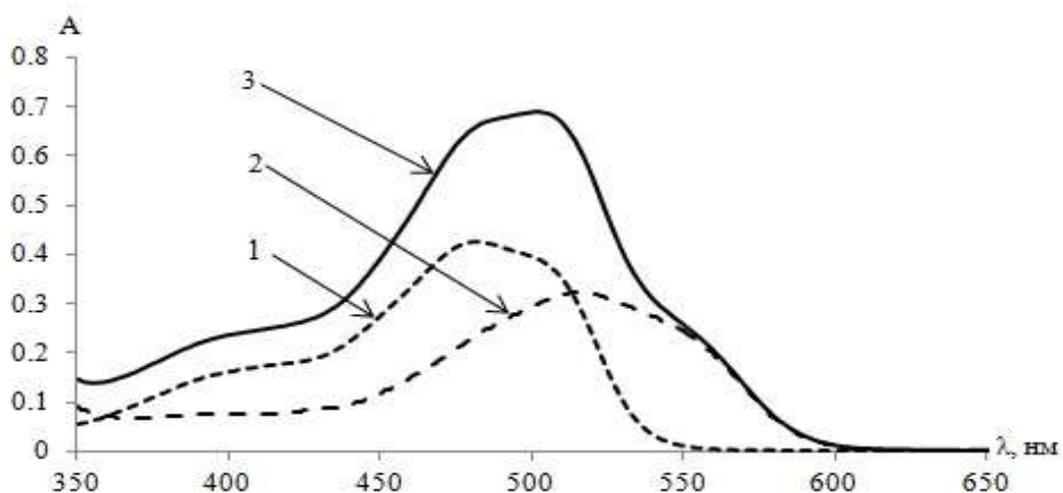


Рис. 20. Электронные спектры поглощения индивидуальных красителей E110 (1), E122 (2) и их смеси (3) ($C_{E110} = 8$ мг/л, $C_{E124} = 8$ мг/л)

Далее проведено определение содержания красителей в 12 модельных смесях. Состав смесей подбирали с учетом значений оптических плотностей полученных растворов в диапазоне 0.2-1.5 (табл. 17). Производные электронных спектров поглощения первого порядка получали при помощи программного обеспечения спектрофотометра UV-Probe 2.31 с шагом дифференцирования $\Delta\lambda$ 2 нм, масштабирующий фактор – 100. Определены длины волн, соответствующие «нулевому пересечению» первых

производных спектров с осью абсцисс, которые составили 481.7 нм и 516.1 нм для E110 и E122 соответственно (рис 21).

Таблица 17. Содержание E110 и E122 в модельных растворах

№ раствора		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Концентрация, мг/л	E110	2	8	8	8	8	14	14	14	14	20	20	20
	E122	14	2	8	14	20	2	8	14	20	2	8	14

Построены градуировочные зависимости для определения E110 по значениям первых производных при 516.1 нм; уравнение имело вид $A'_{516.1} = (-0.1476 \pm 0.0012) \cdot C_{E110}$; $R^2 = 1.0000$. Для определения E122 – при длине волны 481.7 нм; уравнение имело вид $A'_{481.7} = (0.0491 \pm 0.0007) \cdot C_{E122}$; $R^2 = 1.0000$. Определены относительные погрешности определения индивидуальных компонентов в модельных смесях (рис. 22). Проведенные исследования по применению производной спектрофотометрии при «нулевом пересечении» для определения E110 и E122 при совместном присутствии позволили разработать простую и экспрессную методику определения этих красителей в таблетках для рассасывания «Трависил» (производитель «Плетхико Фармасьютикалз Лтд», Индия). В инструкции по применению таблеток указано наличие в составе E110 и E122, но отсутствует содержание данных веществ.

Содержание красителей рассчитывали, как описано выше для модельных растворов.

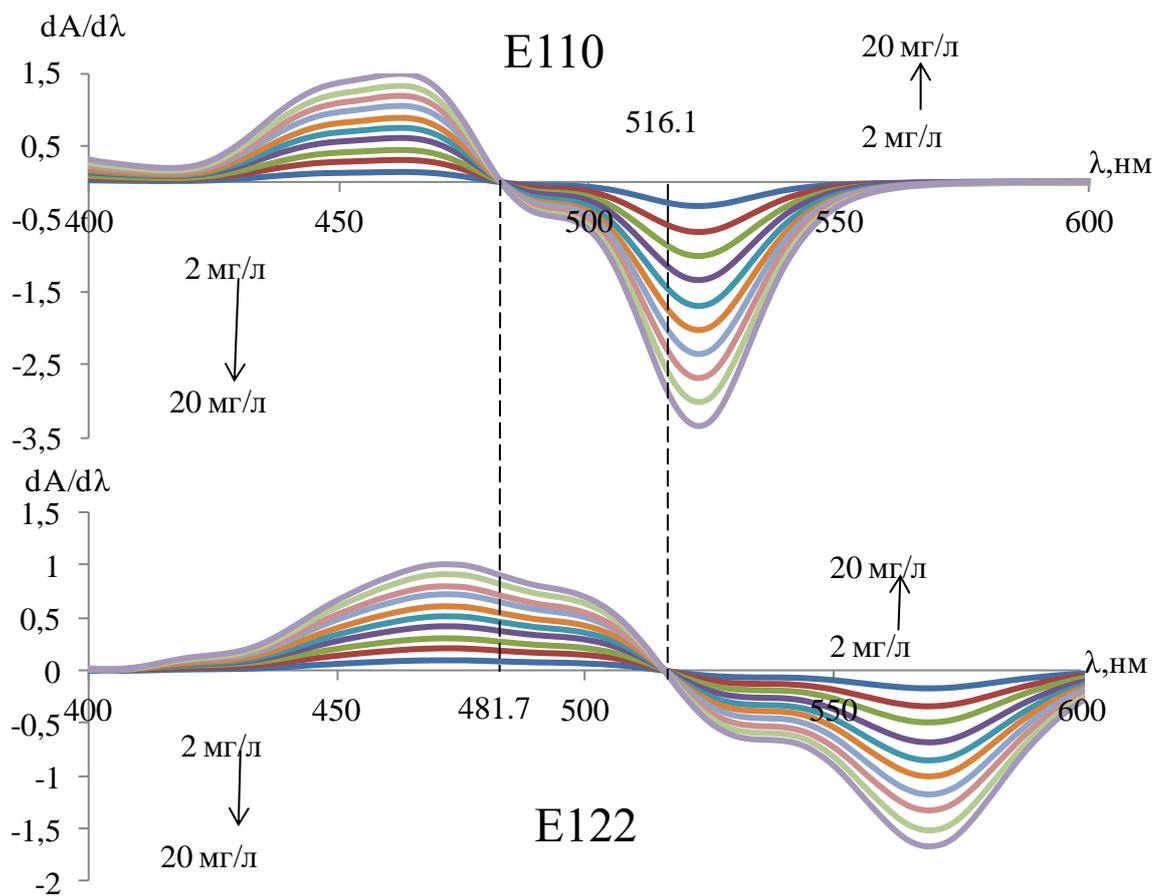


Рис.21. «Нулевое пересечение» первых производных спектров для E110 и E122

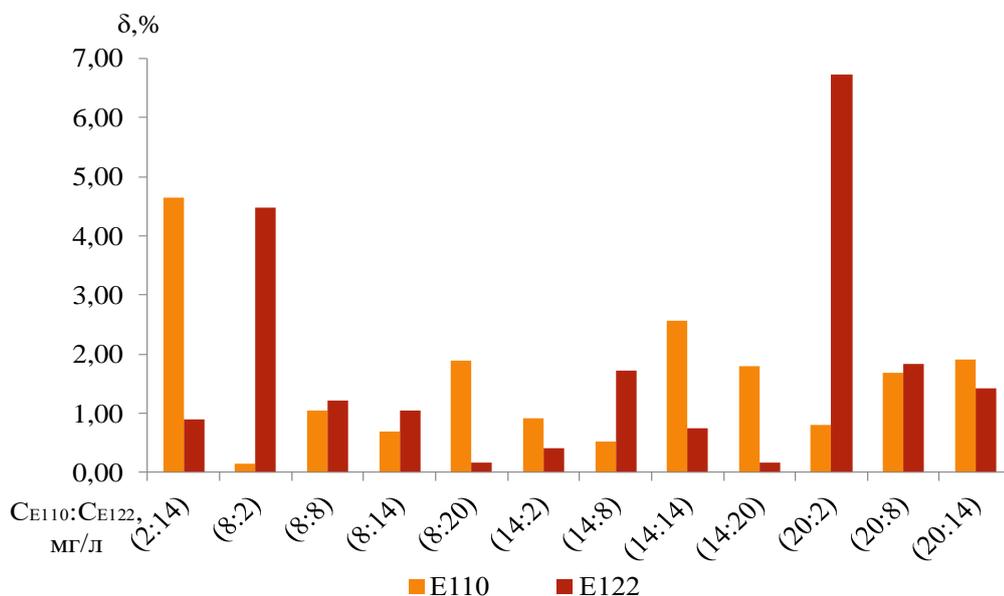


Рис. 22. Относительные погрешности определения E110 и E122 в модельных смесях методом первой производной при «нулевом пересечении»

Результаты определения представлены в таблице 18, правильность определения проверяли методом «введено-найдено».

Таблица 18. Результаты определения красителей E110 и E122 в таблетках «Трависил» (мг в 1 таблетке) и проверки правильности методом «введено-найдено» (n = 3, P = 0.95)

№ опыта	E110				E122			
	Введено, мг	Найдено всего, мг	Найдено в добавке, мг	S _r , %	Введено, мг	Найдено всего, мг	Найдено в добавке, мг	S _r , %
1	–	0.380 ± 0.003	–	4.2	–	0.058 ± 0.002	–	3.7
2	–	0.380 ± 0.003	–	–	0.060	0.117 ± 0.006	0.059	2.2
3	0.380	0.758 ± 0.005	0.378	0.65	–	0.058 ± 0.002	–	–
4	0.380	0.762 ± 0.005	0.382	4.7	0.060	0.119 ± 0.004	0.061	3.0

Таким образом, показано, что метод первой производной при «нулевом пересечении» может быть применен для определения E110 и E122 в модельных растворах и в таблетках для рассасывания «Трависил». Установлено, что относительная ошибка определения в исследованных модельных растворах не превышает 5% для E110 и 7% для E122. Найдено содержание СПК в таблетках для рассасывания «Трависил»: E110 – 0.380 ± 0.003 мг и E122 – 0.058 ± 0.002 мг в одной таблетке. Правильность определения подтверждена методом «введено-найдено».

3.1.7 Определение красителей E102 и E110 в напитках «YES!Fruit» и «Fresh Orange» с предварительной выделением на магнитных наночастицах

Электронный спектр поглощения E102 характеризуется широкой полосой поглощения с характерным максимумом поглощения при 427 нм, спектр поглощения E110 имеет максимум поглощения при 482 нм и характерном плечом в районе 380 нм (рис. 23). Таким образом, спектры пересекаются практически во всем диапазоне и отдельное определение красителей по оптической плотности в максимуме поглощения невозможно.

Поэтому применяли хемометрический алгоритм ПЛС для индивидуального определения красителей в их смеси. Спектры поглощения напитков «YES!Fruit» и «Fresh orange» представлены на рис. 23.

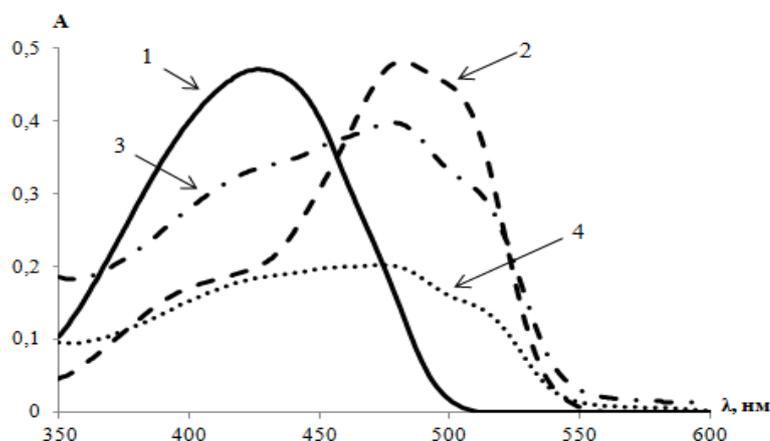


Рис 23. Спектры поглощения водных растворов с $C = 10$ мг/л E102 (1), E110 (2) и напитков «Fresh orange» (3) и «YES!FRUIT» (4)

В качестве модельных смесей для построения многомерной калибровки использовали набор из 28 растворов, содержащих оба красителя в различных концентрациях (табл. 19). В качестве аналитических параметров выступали спектры поглощения смесей красителей в интервале от 350 до 550 нм. Таким образом, матрица данных для хемометрического анализа имела размерность 28×201 . Все смеси разделены на обучающий (21 смесей) и проверочный (7 смесей) наборы данных. Проверочные смеси характеризовались различными концентрациями обоих красителей (10, 20, 30, 40, 50, 60 мкмоль/л).

Таблица 19. Концентрации E102 и E110 в смесях для обучающего и проверочного наборов

№ Смеси		1	2	3	4	5	6*	7*	8*	9	10	11	12	13	14*
С в смеси, мкмоль/л	E102	5	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20
	E110	5	10	20	50	70	30	40	60	10	20	30	40	60	50
№ Смеси		15	16	17	18	19*	20	21	22	23*	24	25	26*	27	28
С в смеси, мкмоль/л	E102	30	30	30	30	30	40	40	40	40	50	50	50	60	60
	E110	10	20	30	50	40	10	20	40	30	10	30	20	10	10

*- смеси,отнесенные в проверочный набор

В качестве хемометрического алгоритма использовали вариант метода ПЛС, в котором в качестве отклика используется концентрация обоих красителей - метод ПЛС-2. Предварительно показано, что он дает параметры

модели, статистически не отличимые от варианта ПЛС-1, однако позволяет использовать одну модель для обоих красителей, что удобнее в практике.

Параметры RMSEC и RMSEP, характеризующие точность построения и обучения модели, а также выбор оптимального числа латентных переменных (ЛП) проводили как описано выше (см. раздел 3.1.2). Оптимальное число ЛП для E102 составило 4 (RMSEC – 0.633; RMSEP – 0.392), для E110 – 3 (RMSEC – 0.056; RMSEP – 0.103). Зависимости «измерено-предсказано» согласно выбранному оптимальному числу ЛП представлены на рис. 24.

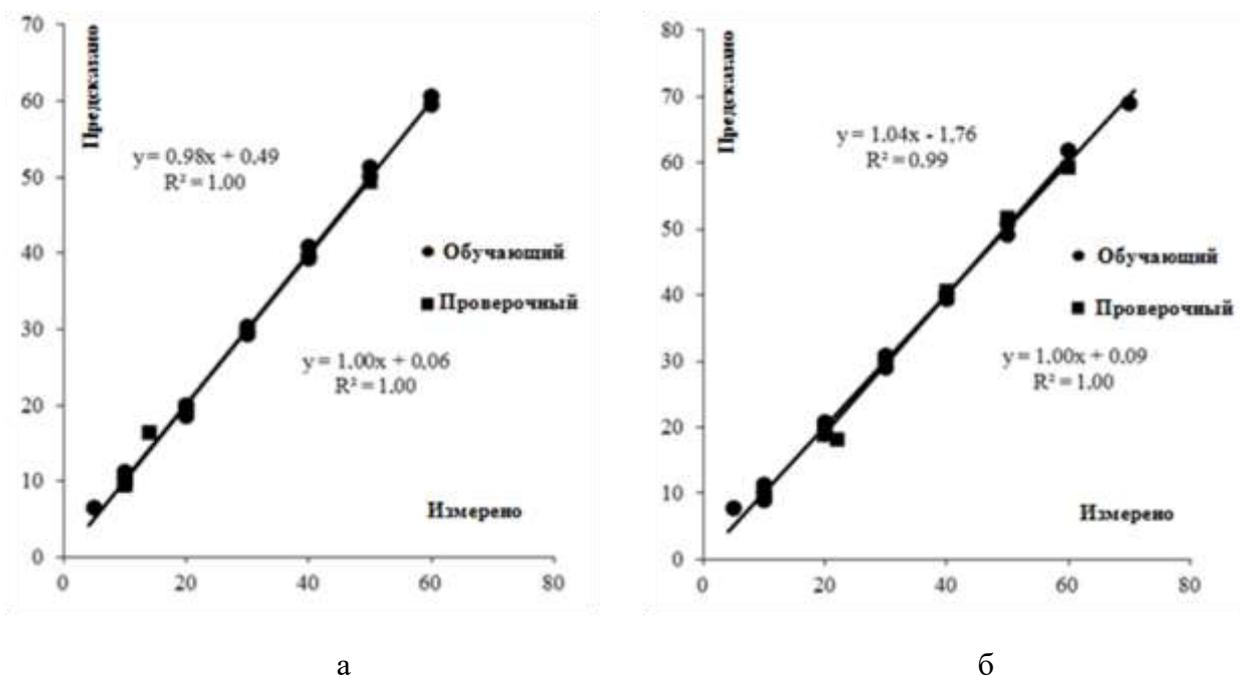


Рис. 24. Зависимости «предсказано-измерено» для E102 (а) и E110 (б).

Как видно из рис.24 уравнения зависимостей «измерено-предсказано» имеют тангенс наклона и квадрат коэффициента аппроксимации близкие к 1, что говорит о высоком качестве моделей.

Погрешность определения в проверочном наборе составляет не более 5.3 % для E102 и 3.3 % для E110 (см. рис.25).

Проверку правильности проводили методом «введено-найдено». Результаты суммированы в таблице 20.

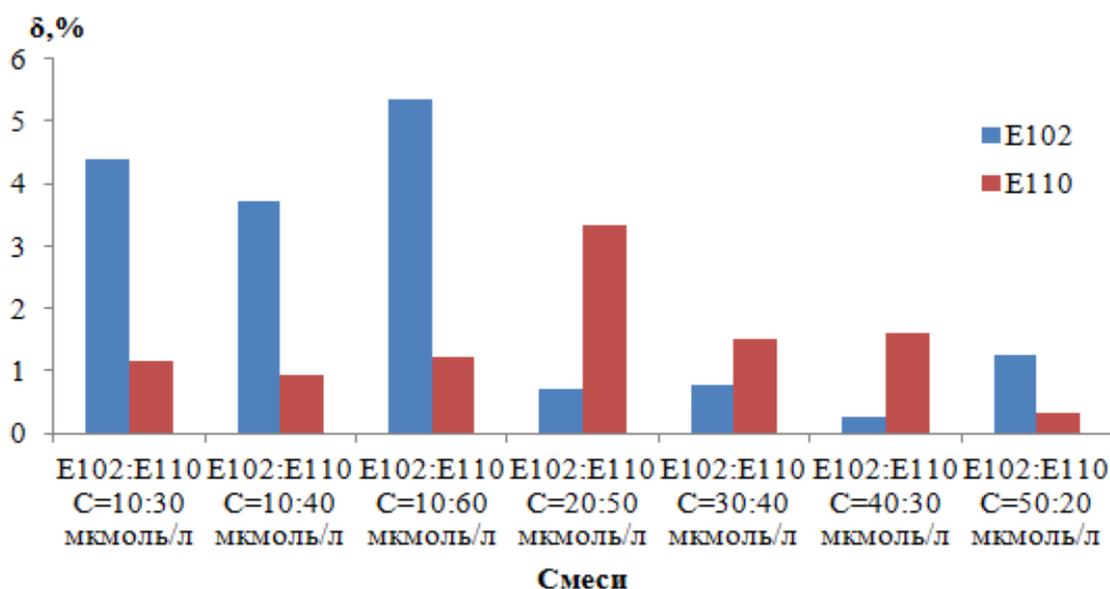


Рис.25. Погрешность определения красителей в проверочном наборе для различных концентраций E102 и E110

Таблица 20. Результаты определения красителей E102 и E110 в напитках «YES!Fruit» и «Fresh orange» и проверки правильности методом «введено-найдено» (n=3, P=0.95)

Напиток	E102, мкмоль/л				E110, мкмоль/л			
	Введено	Найдено всего	Найдено в добавке	Sr, %	Введено	Найдено всего	Найдено в добавке	Sr,%
«YES! FRUIT»	-	4.1 ± 0.3	-	2.4	-	11.5 ± 1.4	-	4.8
	10	16.1 ± 1.7	11.9	4.2	10	22.2 ± 1.8	16.6	3.2
«Fresh orange»	-	4.5 ± 0.2	-	2.0	-	19 ± 3	-	5.5
	10	17.2 ± 1.5	12.6	3.6	10	30 ± 2	11	2.9

Правильность подтверждали методом ВЭЖХ (табл. 21). Как видно из данных таблицы, полученные значения F- и t-критериев меньше соответствующих табличных, что подтверждает правильность предложенного нами способа.

Таблица 21. Правильность определения E102 и E110 в напитках «YES!Fruit» и «Fresh orange» ($F_{\text{табл}}-19.2$; $t_{\text{табл}}-2.45$)

Напиток	СПК	СФМ+ПЛС-2, мг/л	ВЭЖХ, мг/л	Критерий	
				F	t
«YES!FRUIT»	E102	2.19 ± 0.4	2.05 ± 0.4	4.09	1.05
	E110	5.2 ± 0.6	5.3 ± 0.3	4.22	0.16
«Fresh orange»	E102	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.5	5.98	1.48
	E110	8.5 ± 1.2	7.5 ± 0.4	1.41	2.33

Таким образом, в настоящей работе предложен способ твердофазной экстракции магнитными наночастицами модифицированными полиэтиленимином для определения синтетических пищевых азокрасителей E102 и E110 в матрице напитков «YES!Fruit» и «Fresh orange» с последующим применением хемометрического алгоритма ПЛС-2.

Содержание в образце «YES!Fruit» составляет для E102 4.1 ± 0.3 мкмоль/л, E110 – 11.5 ± 1.4 мкмоль/л, что соответствует 2.19 ± 0.4 мг/л и E102 5.2 ± 0.6 мг/л для E110; в напитке «Fresh orange» 4.5 ± 0.2 и 19 ± 3 мкмоль/л для E102 и E110, что эквивалентно 2.4 ± 0.1 и $8.5 \pm 1,2$ мг/л для E102 и E110.

3.2 Анализ трехкомпонентных смесей синтетических пищевых красителей

Для придания необходимого цвета раствору в основном используют двухкомпонентные смеси красителей. Так для создания цвета водного раствора продукта в черешневый или персиковый цвет используют сочетание красителей E110 и E124 в различных соотношениях. Не всегда доступным является создания цветовой гаммы только из пары красителей. Так для создания мандаринового, апельсинового цвета раствора используют комбинации красителей E102, E122 и E124.

На рис. 26 представлены электронные спектры поглощения индивидуальных красителей трехкомпонентной смеси. В электронном спектре поглощения красителя E129 наблюдается широкая полоса с

максимумом в области 502 нм, для E124 характерна полоса с максимумом при 507 нм, а спектр поглощения красителя E110 имеет характерный максимум поглощения при 483 нм.. Таким образом, спектры пересекаются практически во всем диапазоне и раздельное определение красителей по оптической плотности в максимуме поглощения невозможно.

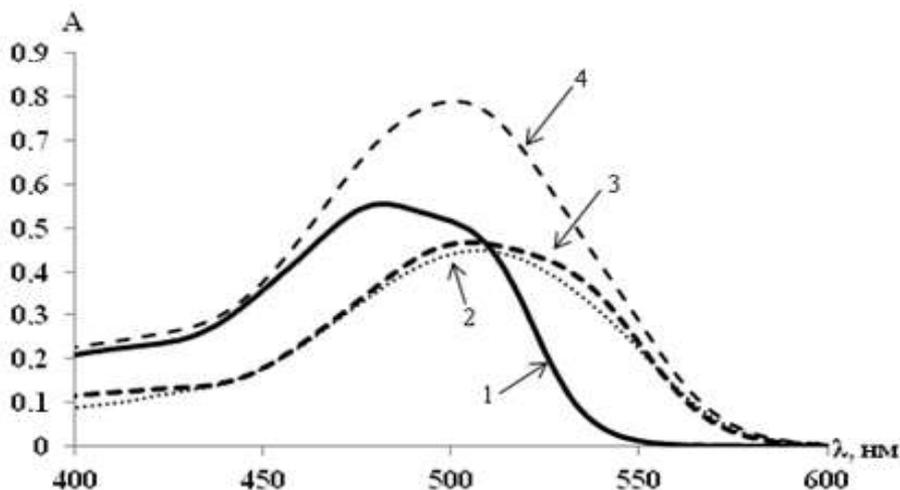


Рис. 26. Электронные спектры поглощения красителей E110 (1), E124 (2), E129 (3) и их смеси(4)

Как показано на рис. 26 красители E124 и E129 имеют близкие значения λ_{\max} , нм. Для определения возможности определения СПК с близкорасположенными максимума поглощения, а так же в присутствии постороннего агента использована трехкомпонентная смесь состоящая из 15 растворов с концентрациями от 1 до $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л (табл. 22). В качестве аналитических параметров выступали электронные спектры поглощения смесей красителей E110-E124-E129 в интервале от 350 до 600 нм.

Таблица 22. Концентрации E110, E124, E129 в смесях для обучающего и проверочного набора, $C \cdot 10^{-5}$ моль/л

№ п/п	1 ^b	2 ^{b,c}	3 ^b	4 ^b	5	6	7	8	9 ^c	10	11	12 ^{a,c}	13 ^a	14 ^{a,c}	15 ^a
E110	1	1	1	1	1	1	1,5	2	2,5	3	3	2,5	2	1,5	1
E124	3	2,5	2	1,5	1	2	2	2	2	2	1	1,5	2	2,5	3
E129	1	1,5	2	2,5	3	3	2,5	2	1,5	1	3	3	3	3	3

^a – проверочный набор для E110; ^b – проверочный набор для E124;

^c – проверочный набор для E129

Матрица данных для хемометрического анализа имела размерность 11×251 . Все смеси разделены на обучающий (11 смесей) и проверочный (4 смесей) наборы данных. Обучающий набор образцов использовали для построения ПЛС-1 и ПЛС-2 моделей, с помощью которых проводили анализ «новых» (проверочных) смесей. Проверочные смеси характеризовались различными концентрациями красителей от 1 до $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Выбор оптимального количества латентных переменных производился по значению RMSEP, на рис. 27 представлен график зависимости RMSEC и RMSEP в зависимости от числа ЛП для красителя E129, в табл. 23 приведены значения для параметров RMSEC и RMSEP в изучаемой тройной смеси красителей E110:E124:E129.

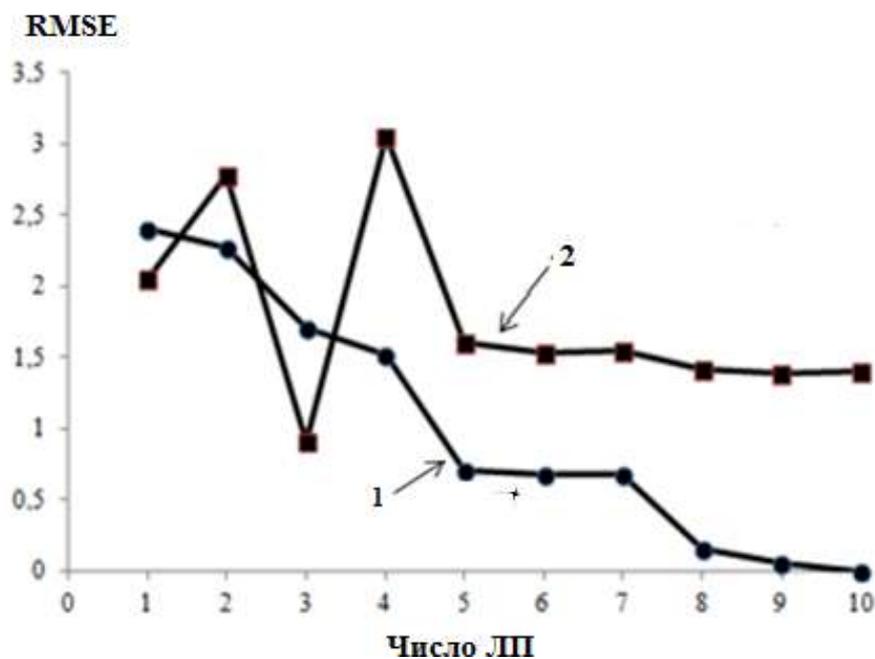


Рис.27. Зависимость RMSEC и RMSEP от числа латентных переменных на примере метода ПЛС-2 при определении E110 - E124 –E129 в их смесях.

Таблица 23. Оптимально число латентных переменных для определения красителей методами PLS-1 и PLS-2

Метод	PLS-1	PLS-2
E110	2	2
E124	3	3
E129	3	3

При построении проекционного пространства метод ПЛС-1 учитывает значения матрицы X и один отклик Y (т.е. концентрацию одного красителя), в результате получается несколько проекционных подпространств в отдельности для каждого компонента, а в методе ПЛС-2 отклики Y (концентрации обоих красителей) рассматриваются как общее подпространство. Основные параметры моделей для определения E110, E124 и E129 суммированы в таблице 24.

Табл. 24 Параметры определения модельных растворов смесей E110, E124 и E129 методами ПЛС-1 и ПЛС-2

СПК	Метод	Чисто ЛП	Обучающий набор			Проверочный набор		
			Уравнение	R ²	RMSEC	Уравнение	R ²	RMSEP
E110	ПЛС-1	2	$y=0.99x+1.21$	0.99	4,59	$y=1.09x-14.16$	0.94	5,26
	ПЛС-2	2	$y=0.99x+1.22$	0.99	4,22	$y=0.95x+0.07$	0.93	6,17
E124	ПЛС-1	3	$y=0.99x+0.90$	0.99	5,61	$y=0.97x-1.11$	1.00	9,15
	ПЛС-2	3	$y=0.99x+0.92$	0.99	2,19	$y=0.97x+5.21$	0.97	4,15
E129	ПЛС-1	3	$y=1.00x+0.19$	1.00	2,28	$y=1.02x-2.82$	1.00	2,78
	ПЛС-2	3	$y=1.00x+0.19$	1.00	1,69	$y=1.04x-3.93$	1.00	1,91

Как видно из данных таблицы 24 уравнения зависимостей «измерено-предсказано» имеют тангенс наклона близкий к 1; коэффициент корреляции близок к 1; что говорит о высоком качестве моделей.

Для проверочных растворов была рассчитана правильность определения, как отношение найденного моделью значения к известному. Результаты представлены в табл. 25.

Таблица 28. Правильность определения синтетических пищевых красителей с использованием методов ПЛС-1 и ПЛС-2

СПК	ПЛС-1	ПЛС-2
E110	96-107%	96-107%
E124	95-104%	99-106%
E129	95-104%	99-102%

Таким образом, показана возможность определения красителей E110, E124, E129 в смеси методами ПЛС-1 и ПЛС-2. Показана возможность отдельного определения синтетических пищевых красителей E110, E124, E129 в их смесях методами ПЛС-1 и ПЛС-2 с использованием спектров поглощения. Оценены среднеквадратичные ошибки градуировки и прогноза, на основании которых подобраны оптимальное количество латентных переменных для данных методов.

Правильность определения E110 составляет от 96 % до 107 %. Для E124 эти значения составили от 95 % до 106 %, а для E129 от 95% до 104%. Установлено, что все исследованные модели дают высокие значения коэффициентов корреляции и тангенсы угла наклона зависимостей «измерено-предсказано» близки к единице, что позволяет рекомендовать эти методы для практического использования.

Определение красителей E102, E110 и E122 в напитке «Yori»

Трехкомпонентная смесь красителей E102, E110 и E122 представляет собой сложную систему для определения содержания в продуктах питания и напитках. Так в напитке «Yori» присутствуют СПК с близкими максимумами поглощения, что делает задачу их определения в смеси актуальной.

В электронном спектре поглощения красителя E102 наблюдается широкая полоса поглощения с максимумом при 4027 нм; характерная полоса поглощения E110 наблюдается при 482 нм, для E122 характерна полоса с максимумом при 516 нм (рис. 28). Таким образом, спектры пересекаются практически во всем диапазоне и отдельное определение красителей по оптической плотности в максимуме поглощения невозможно.

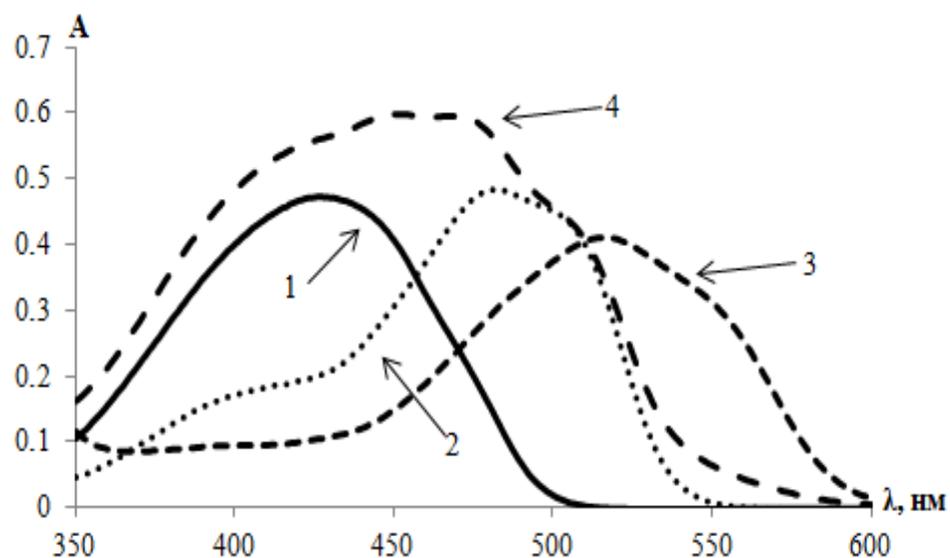


Рис. 28. Электронные спектры поглощения индивидуальных красителей и их смеси:

1 – E102; 2 – E110; 3 – E122 (C=8 мг/л); 4 – смесь красителей E102-E110-E 122

В качестве образцов (модельных смесей) для применения хемометрических алгоритмов ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК использовался набор из 16 растворов, содержащих оба красителя в различных концентрациях (табл. 26).

Таблица 26. Состав модельных растворов

№ смеси	СПК, мг/л			№ смеси	СПК, мг/л		
	E110	E122	E102		E110	E122	E102
Обучающий набор							
1	0.5	14	8	12	14	8	2
2	8	0.5	8	13	14	8	8
3	8	2	14	14	14	8	14
4	8	8	0.5	15	2	2	14
5	8	8	14	16	14	14	2
6	8	14	2	17	14	14	8
7	8	14	8	18	2	8	2
8	8	14	14	19	2	8	8
9	14	14	2	20	2	8	14
10	14	14	8	21	2	8	14
11	14	14	14	22	2	14	2
Проверочный набор							
1	2	14	14	4	8	8	8
2	8	2	2	5	2	2	8
3	0.5	0.5	0.5	6	14	14	14

В качестве аналитических параметров выступали: интервале от 350 до 600 нм, шаг сканирования 0.2 нм; матрица данных для хемометрического анализа имела размерность 28*1251. Все смеси разделены на обучающий (22 смесей) и проверочный (6 смесей) наборы данных. Обучающий набор образцов использовали для построения ПЛС–2, с помощью которых проводили анализ «новых» (проверочных) смесей. Проверочные смеси характеризовались различными концентрациями обоих красителей (0,5;2;8 и 14 мг/л).

Моделирования данных с использованием хемометрических алгоритмов является выбор оптимального числа латентных переменных, которое позволяет устранить недооценку или переоценку модели. Параметры RMSEC и RMSEP характеризующие точность градуировки и точность предсказания модели связаны между собой, и должны рассматриваться совместно, так как улучшение одного неизбежно приведет к ухудшению другого параметра.

Выбор оптимального числа латентных переменных (ЛП) был осуществлен на основании минимального значения RMSEP, при котором, однако, не наблюдается резкого возрастания значения RMSEC, что определяет оптимальную сложность модели. Выбранное число ЛП, значения RMSEC и RMSEP представлено в табл. 30.

Увеличение числа латентных переменных больше 7 ведет к усложнению моделей а, следовательно, приводит к переоценке значений среднеквадратичных остатков в обучающем и проверочном наборах (рис.29).

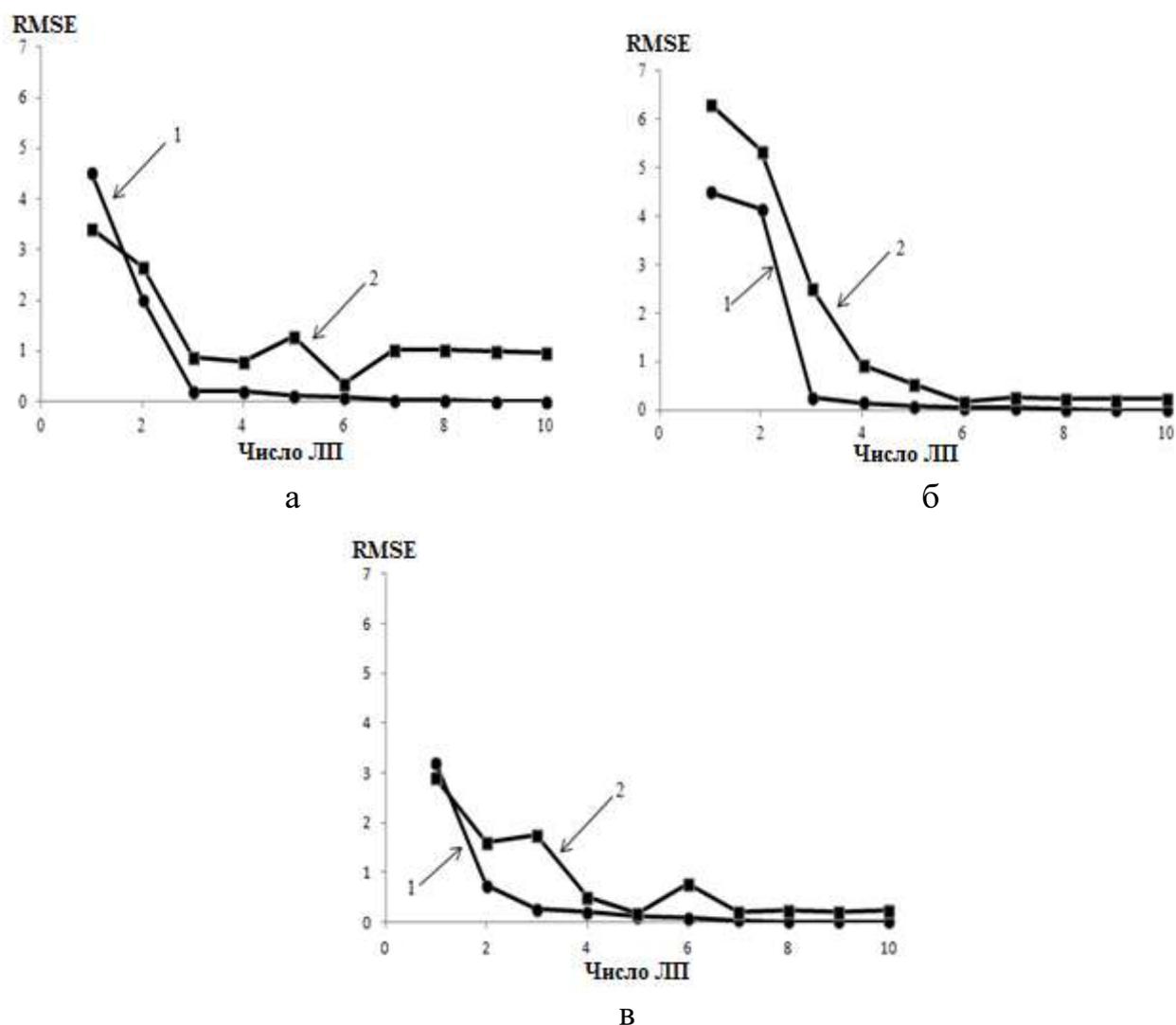


Рис. 29. Зависимость RMSEC (1) и RMSEP (2) в модельных смесях E110 (а), E122 (б); E102 (в).

При оптимальном количестве ГК (ЛП) проводили моделирование данных спектров поглощения 0D и 1D методами ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК.

При построении проекционного пространства метод ПЛС-1 учитывает значения матрицы X и один отклик Y (т.е. концентрацию одного красителя), в результате получается несколько проекционных подпространств в отдельности для каждого компонента, а в методе ПЛС-2 отклики Y (концентрации обоих красителей) рассматриваются как общее подпространство. Основные параметры моделей для определения E110 и E124 суммированы в таблице 27.

Таблица 27. Параметры определения модельных растворов смесей E102, E110 и E122 методами ПЛС-1 и ПЛС-2

СПК	ЛП	Обучающий набор			Проверочный набор		
		Уравнение	R ²	RMSEC	Уравнение	R ²	RMSEP
E110	6	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.083	$y = 0.99x + 0.01$	1.00	0.106
E122	6	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.046	$y = 1.00x - 0.09$	1.00	0.166
E102	5	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.102	$y = 0.97x + 0.14$	1.00	0.169

Как видно из данных таблицы уравнения зависимостей «измерено-предсказано» имеют тангенс наклона близкий к 1 и свободный член близкий к нулю; коэффициент корреляции близок к 1; что говорит о высоком качестве моделей.

Определение СПК в проверочных смесях при выбранных параметрах. Величины правильности определения E102, E110 и E122 в проверочных смесях различными методами представлены на рис. 30.

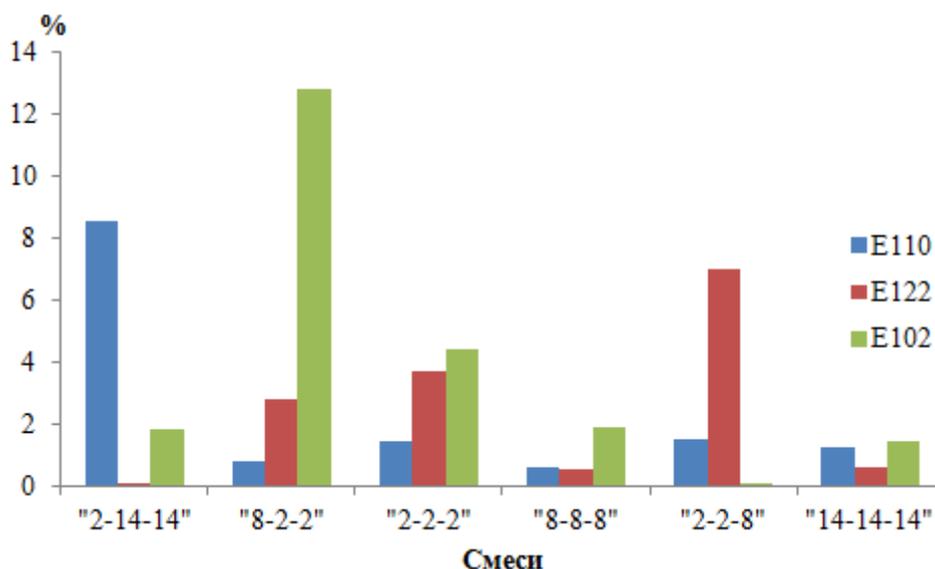


Рис. 30. Правильность определения E110, E102 и E124 в проверочном наборе методом ПЛС-2

Наибольшая погрешность наблюдается при определении: E110 – 8,5% («2-14-14»), E122 – 12,8% (8-2-2) и E102 – 6,99%. Данные относительные

погрешности возникают в смесях с малой концентрацией определяемого компонента.

Результаты определения красителей E102, E110 и E122 в напитке «Уирі» представлены в табл. 28. Проверку правильности осуществляли методом «введено-найдено».

Таблица 28. Результаты определения красителей E102, E110 и E122 в напитке «Уирі» и проверки правильности методом «введено-найдено» (n = 3, P = 0.95)

СПК	Введено, мг/л	Найдено, мг/л	Погрешность определения, %
E110	-	41.06 ± 0.90	2.20
	20.5	61.56 ± 1.10	1.79
	41	82.12 ± 2.81	3.43
E122	-	96.07 ± 4.89	5.09
	48	144.07 ± 2.48	1.72
	96	191.95 ± 3.72	1.94
E102	-	5.86 ± 0.21	3.64
	2,9	8.94 ± 0.34	4.28
	5,8	11.63 ± 0.48	4.10

ГЛАВА 4. СПЕКТРОФОТОМЕЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ МНОГОМЕРНОЙ КАЛИБРОВКИ

Данная глава посвящена определению некоторых β -лактамных антибиотиков и активных фармацевтических ингредиентов глазных капель с использованием методов РГК и ПЛС. Публикации по результатам:

1. Silaev D., Rusanova T. Y. Spectrophotometric determination of active substances in ophthalmic formulation using chemometrics // 13th Winter Symposium on Chemometrics, Saratov, 2022.
2. Кетруш Е.Ф., Мурсалов Р.К., Силаев Д.В., Русанова Т.Ю. Спектрофотометрическое определение некоторых β -лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2023. – Т. 23. – № 4.
3. Коларькова К.В., Силаев Д.В., Русанова Т.Ю. Спектрофотометрическое определение дифенгидрамина и нафазолина в офтальмологических препаратах с использованием метода проекций на латентные структуры // Сборник тезисов докладов VIII Межд. конф. «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» / под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. – М. : «Перо», 2023. – 288 с.

4.1 Спектрофотометрическое определение некоторых β -лактамных антибиотиков в их бинарных смесях с использованием метода проекций на латентные структуры

Электронные спектры поглощения исследуемых антибиотиков представлены на рис. 31. Спектр раствора Cef имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 272 нм. Электронный спектр раствора Ceft имеет характерные максимумы при 240 нм и 271 нм. Cefur представлен широкой полосой поглощения с максимумом при 274 нм и плечом в районе 230 нм. Стох имеет широкую полосу поглощения с максимумом поглощения при 235 нм и плечом в районе 260 нм. Спектр Атох имеет характерные максимумы поглощения при 227 и 272 нм и плечо при 280 нм. Таким образом, Cef, Ceft и Cefur имеют очень близкие максимумы в диапазоне от 271 до 274 нм, а Ceft и Стох имеют близкие максимумы в диапазоне 235-240 нм. Спектры поглощения всех пяти антибиотиков пересекаются практически во всем исследуемом диапазоне.

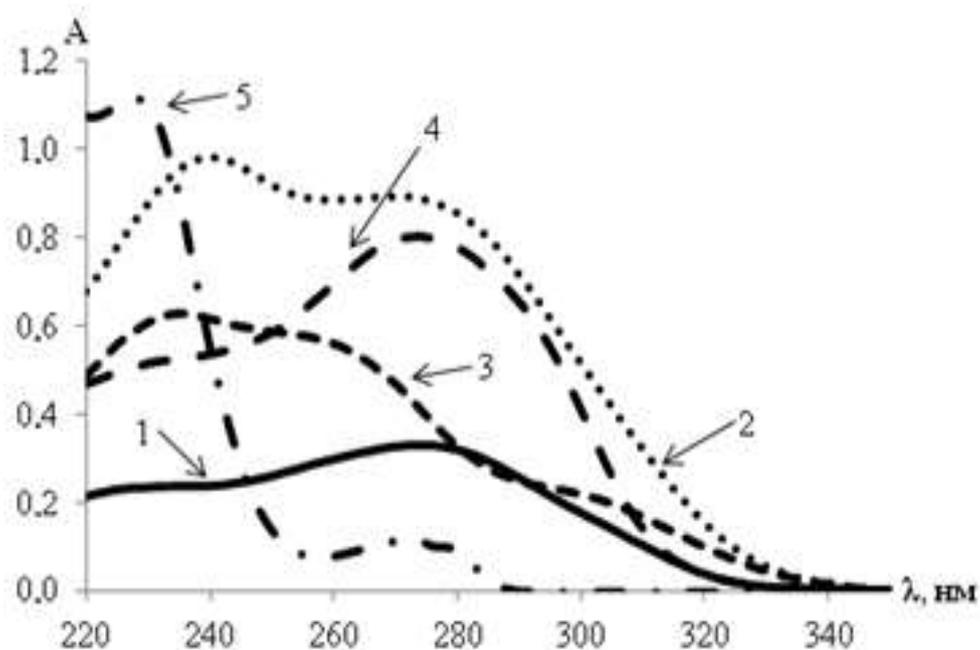


Рис. 31. Электронные спектры поглощения растворов индивидуальных антибиотиков: Cef(1); Ceft (2); Ctox (3); Cefur (4) (C=20 мкг/мл) и Amox (5) (C=73 мкг/мл)

Для проверки выполнения закона аддитивности построены градуировочные зависимости оптической плотности в максимуме поглощения от концентрации антибиотиков (пример показан на рис. 32) и рассчитаны их молярные коэффициенты поглощения (табл. 29).

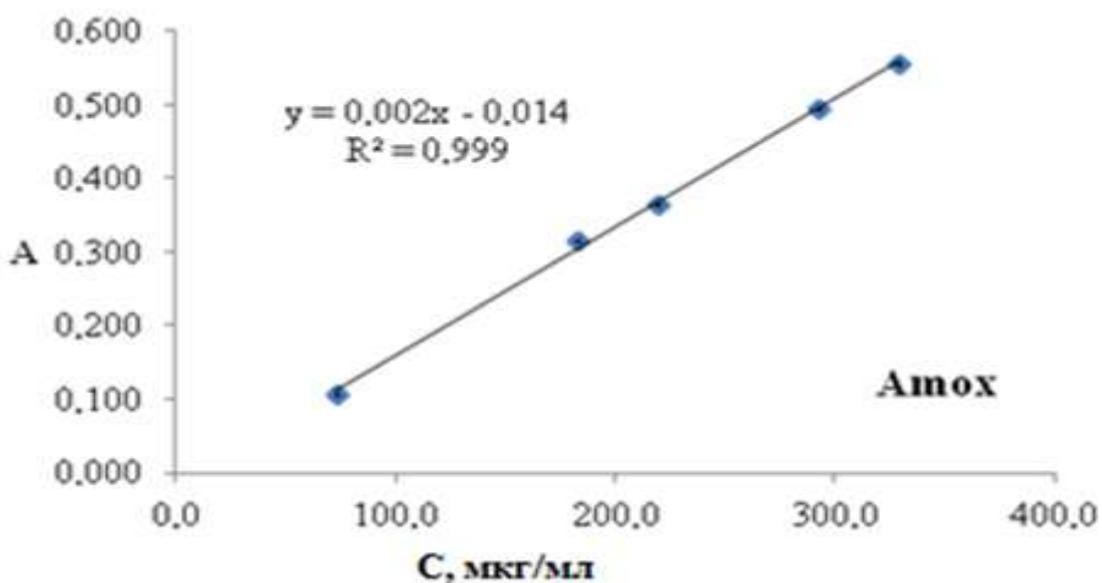


Рис. 32. Градуировочная зависимость для определения Amox

Таблица 29. Параметры спектров поглощения и градуировочных зависимостей исследуемых антибиотиков

Антибиотик	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ϵ , л*моль ⁻¹ *см ⁻¹	C, мкг/мл	R ²
Амох	227; 272	(6.0 ± 0.2)·10 ²	73-330	0.999
Cefur	274	(1.7 ± 0.2)·10 ⁴	3-30	0.995
Стох	235	(1.7 ± 0.2)·10 ⁴	3-30	0.979
Ceft	240; 271	(3.1 ± 1.2)·10 ⁴	3-30	0.966
Cef	272	(9.1 ± 0.2)·10 ⁴	3-30	0.981

В качестве обучающего набора для построения модели методом ПЛС использовали 24 бинарных смеси «цефалоспорин – цефалоспорин»: Cefur-Cef, Ceft-Стох, Cefur-Стох, Ceft-Cef в различных соотношениях (табл. 30). В системе «цефалоспорин – амоксициллин» Cefur-Амох спектры поглощения регистрировали для 16 бинарных смесей, содержащих различные концентрации определяемых антибиотиков (табл. 30). Смесей в проверочных наборах также характеризовались различными концентрациями обоих компонентов.

Таблица 30. Концентрации антибиотиков в бинарных смесях для обучающего и проверочного* набора

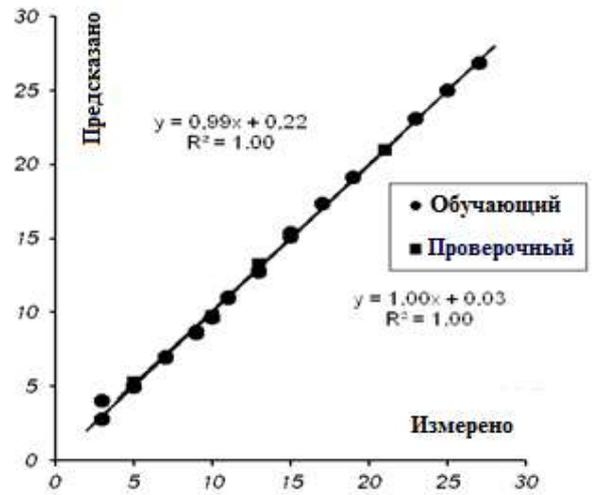
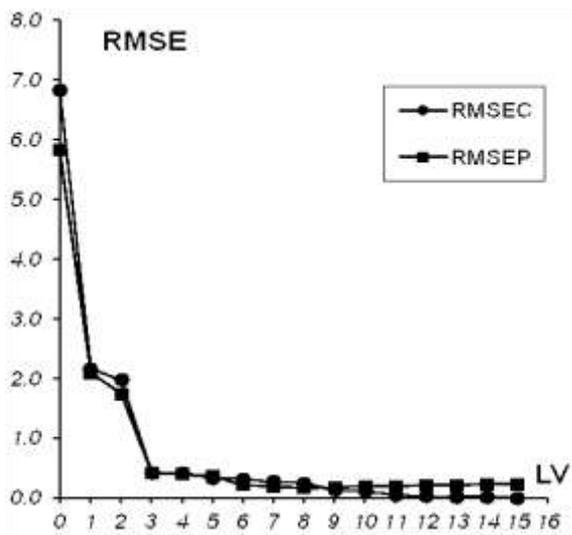
Смеси: Cefur-Cef; Ceft-Стох; Cefur-Стох; Ceft-Cef												
№ смеси	1	2*	3	4	5	6*	7	8	9	10*	11	12 ^c
C, мкг/мл	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25
C, мкг/мл	27	25	23	21	19	17	15	13	11	9	7	5
№ смеси	13	14	15	16	17	18*	19	20	21	22	23	24
C, мкг/мл	27	3	5	7	9	10	11	13	15	17	10	15
C, мкг/мл	3	17	15	13	11	10	19	7	5	3	15	10
Смесь Cefur-Амох												
№ смеси	1	2 ^{a,b,c}	3	4	5	6 ^{a,b}	7	8				
C, мкг/мл	5	10	20	30	5	10	20	30				
C, мкг/мл	95	90	80	70	85	85	85	85				
№ смеси	9	10 ^b	11 ^c	12 ^a	13 ^b	14 ^a	15 ^c	16 ^c				
C, мкг/мл	5	5	5	5	20	20	20	20				
C, мкг/мл	140	130	120	110	140	130	120	110				

a – проверочный набор для Cefur (ПЛС-1); b – проверочный набор для Амох (ПЛС-1); c – Проверочный набор для метода Cefur–Амох (ПЛС-2)

Первом этапе моделирования данных с использованием хемометрического алгоритма ПЛС является выбор оптимального числа латентных переменных (LV), которое позволяет устранить недооценку или переоценку модели. Точность многомерной градуировки принято характеризовать величиной RMSEC (среднеквадратичной ошибкой градуировки), а точность предсказания – величиной RMSEP (среднеквадратичной ошибкой прогноза). Эти параметры оценки точности модели связаны между собой и должны рассматриваться совместно, так как улучшение одного приводит к ухудшению другого параметра.

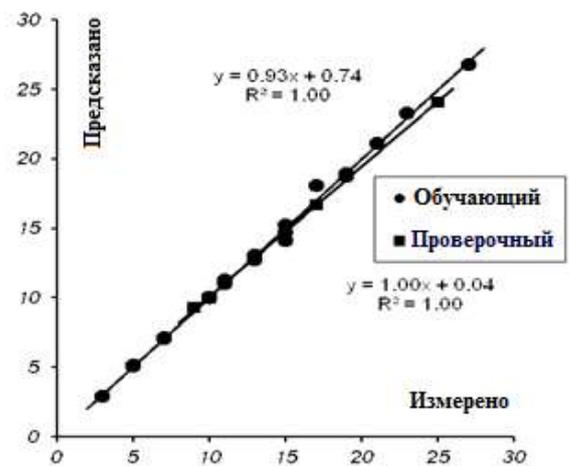
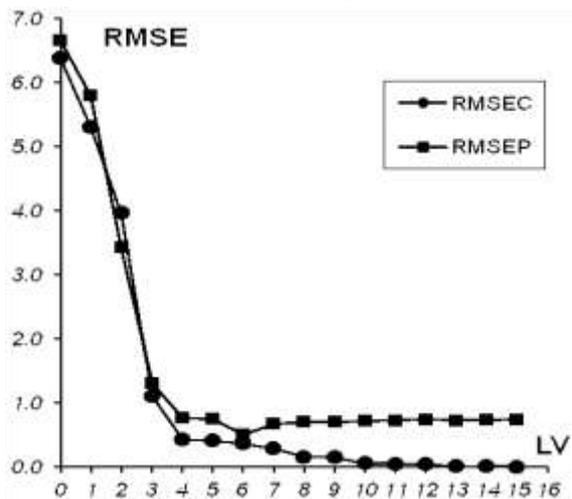
Выбор оптимального числа латентных переменных проводили на основании минимального значения RMSEP, при котором, однако, не наблюдается резкого возрастания RMSEC, что определяет оптимальную сложность модели. На рис. 33 представлены величины RMSEC и RMSEP при различном числе LV, а также зависимости «измерено-предсказано» на примере реализации метода ПЛС-2 для системы Cefur – Cef.

При построении проекционного пространства метод ПЛС-1 учитывает значения матрицы X и один отклик Y (т.е. концентрацию одного красителя), в результате получается несколько проекционных подпространств в отдельности для каждого компонента, а в методе ПЛС-2 отклики Y (концентрации обоих антибиотиков) рассматриваются как общее подпространство. Основные параметры моделей для определения антибиотиках в смесях «цефалоспорин – цефалоспорин» и «цефалоспорин – амоксициллин» суммированы в таблице 31.



а

б



в

г

Рис. 33. Зависимости RMSE от числа LV (а,в) и зависимости «измерено-предсказано» (б,г) при определении Cefur (а,б) и Cef (в,г) в их смеси методом ПЛС-2

Таблица 31. Параметры ПЛС моделей для систем «цефалоспорин – цефалоспорин» и «цефалоспорин – амоксициллин»

Смесь	Метод	Аналит	Число LV	Обучающий набор			Проверочный набор		
				Уравнение	R ²	RMSEC	Уравнение	R ²	RMSEP
Cefur- Ctox	ПЛС1	Cefur	3	$y=1.00x+0.03$	1.00	0.33	$y=0.99x-0.01$	1.00	0.38
		Ctox	5	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.11	$y=0.93x+0.72$	1.00	0.71
	ПЛС2	Cefur	5	$y=1.00x+0.03$	1.00	0.33	$y=0.97x+0.24$	1.00	0.44
		Ctox	5	$y=1.00x+0.02$	1.00	0.23	$y=0.94x+0.47$	1.00	0.61
Cefur- Cef	ПЛС1	Cefur	5	$y=1.00x+0.04$	1.00	0.36	$y=1.03x-0.48$	1.00	0.31
		Cef	7	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.11	$y=1.01x-0.31$	1.00	0.37
	ПЛС2	Cefur	6	$y=1.00x+0.03$	1.00	0.27	$y=0.99x+0.22$	1.00	0.19
		Cef	6	$y=1.00x+0.04$	1.00	0.37	$y=0.93x+0.74$	1.00	0.51
Ceft- Ctox	ПЛС1	Ceft	2	$y=1.00x+0.06$	1.00	0.43	$y=1.01x+0.07$	1.00	0.16
		Ctox	4	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.10	$y=1.00x+0.02$	1.00	0.11
	ПЛС2	Ceft	3	$y=1.00x+0.05$	1.00	0.43	$y=1.00x+0.14$	1.00	0.15
		Ctox	5	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.12	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.97
Ceft- Cef	ПЛС1	Ceft	3	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.09	$y=1.02x-0.11$	1.00	0.22
		Cef	4	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.11	$y=0.97x+0.21$	1.00	0.28
	ПЛС2	Ceft	5	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.08	$y=1.01x-0.01$	1.00	0.21
		Cef	3	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.18	$y=0.98x+0.01$	1.00	0.31
Cefur- Amox	ПЛС1	Cefur	3	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.15	$y=1.00x+0.07$	1.00	0.07
		Amox	2	$y=0.95x+4.66$	0.95	4.73	$y=0.81x+22.11$	0.87	7.83
	ПЛС2	Cefur	3	$y=1.00x+0.01$	1.00	0.09	$y=0.99x+0.05$	1.00	0.07
		Amox	3	$y=0.97x+3.74$	0.97	4.19	$y=0.96x+13.32$	0.92	9.57

Как видно из данных таблицы зависимости «измерено-предсказано» имеют линейный вид с тангенсом наклона близким к 1 и свободным членом близким к нулю (кроме Amox); квадрат коэффициента аппроксимации близок к 1; что говорит о высоком качестве моделей. Можно отметить, что при использовании метода ПЛС-2 для второго компонента в смеси наблюдаются большие значения RMSEC и RMSEP, особенно в случае системы «цефалоспорин – амоксициллин».

Определение содержания антибиотиков в проверочных смесях проводили при оптимальном числе ЛП. Для систем «цефалоспорин – цефалоспорин» и «цефалоспорин – амоксициллин» полученные данные

приведены в табл. 32 и на рис. 34. Видно, что наибольшая ошибка наблюдается при определении Амох, что, вероятно, связано с его низким коэффициентом молярного поглощения света.

Таблица 32. Погрешности определения антибиотиков в проверочном наборе

Системы «цефалоспорин – цефалоспорин»							
Смесь	Компонент	№ смеси	Соотношение антибиотиков	δ, %			
				1-ый компонент		2-ой компонент	
				ПЛС-1	ПЛС-2	ПЛС-1	ПЛС-2
Cefur- Ctox	1. Cefur 2. Ctox	2	5:25	4.94	5.13	6.22	5.13
		6	13:17	4.93	0.45	0.53	0.45
		10	21:9	2.14	3.98	2.13	3.98
		18	10:10	1.93	2.74	2.51	2.74
Cefur- Cef	1. Cefur 2. Cef	2	5:25	5.23	5.98	2.61	3.67
		6	13:17	2.35	1.83	1.68	1.84
		10	21:9	0.81	0.07	1.57	2.99
		18	10:10	4.46	2.20	2.82	0.79
Ceft- Ctox	1. Ceft 2. Ctox	2	5:25	2.81	1.01	0.63	0.53
		6	13:17	0.85	1.61	0.79	0.83
		10	21:9	1.60	0.44	0.75	0.82
		18	10:10	1.62	1.51	0.45	0.34
Ceft- Cef	1. Ceft 2. Cef	2	5:25	2.93	0.53	2.35	2.25
		6	13:17	1.55	1.81	0.78	1.87
		10	21:9	1.46	1.45	1.19	1.11
		18	10:10	2.61	2.47	0.90	1.31
Система «цефалоспорин – амоксициллин»							
Метод		ПЛС-1			ПЛС-2		
Компонент		№	Соотношение антибиотиков	δ, %	№	Соотношение	δ, %
1. Cefur		2	10:90	1.04	2	10:90	0.70
		6	10:85	0.96	11	5:120	1.17
		12	5:110	0.24	15	20:120	0.47
		14	20:130	0.13	16	20:110	0.22
2. Амох		2	10:90	14.69	2	10:90	8.67
		6	10:85	5.61	11	5:120	4.34
		10	5:130	2.59	15	20:120	6.65
		13	20:140	5.50	16	20:110	13.32

Сравнивая результаты определения антибиотиков методами ПЛС-1 и ПЛС-2, можно сказать о зависимости погрешности определения не только от метода, но и концентрации веществ в смеси. Наибольшая погрешность при определении методом ПЛС-1 в системах «цефалоспорин – цефалоспорин»

наблюдается в смеси Cefur–Cef (C=5:25 мкг/мл), которая составила для цефуроксима – 5.23% и цефотоксима – 6.22%. Погрешность определения в остальных случаях не превышает 5%. Метод ПЛС-2 показывает результаты незначительно хуже в сравнении с ПЛС-1. Так, цефуроксим определяется с погрешностями 5.13; и 5.98% в смесях Cefur:Ctox и Cefur:Cef (C=5:25 мкг/мл).

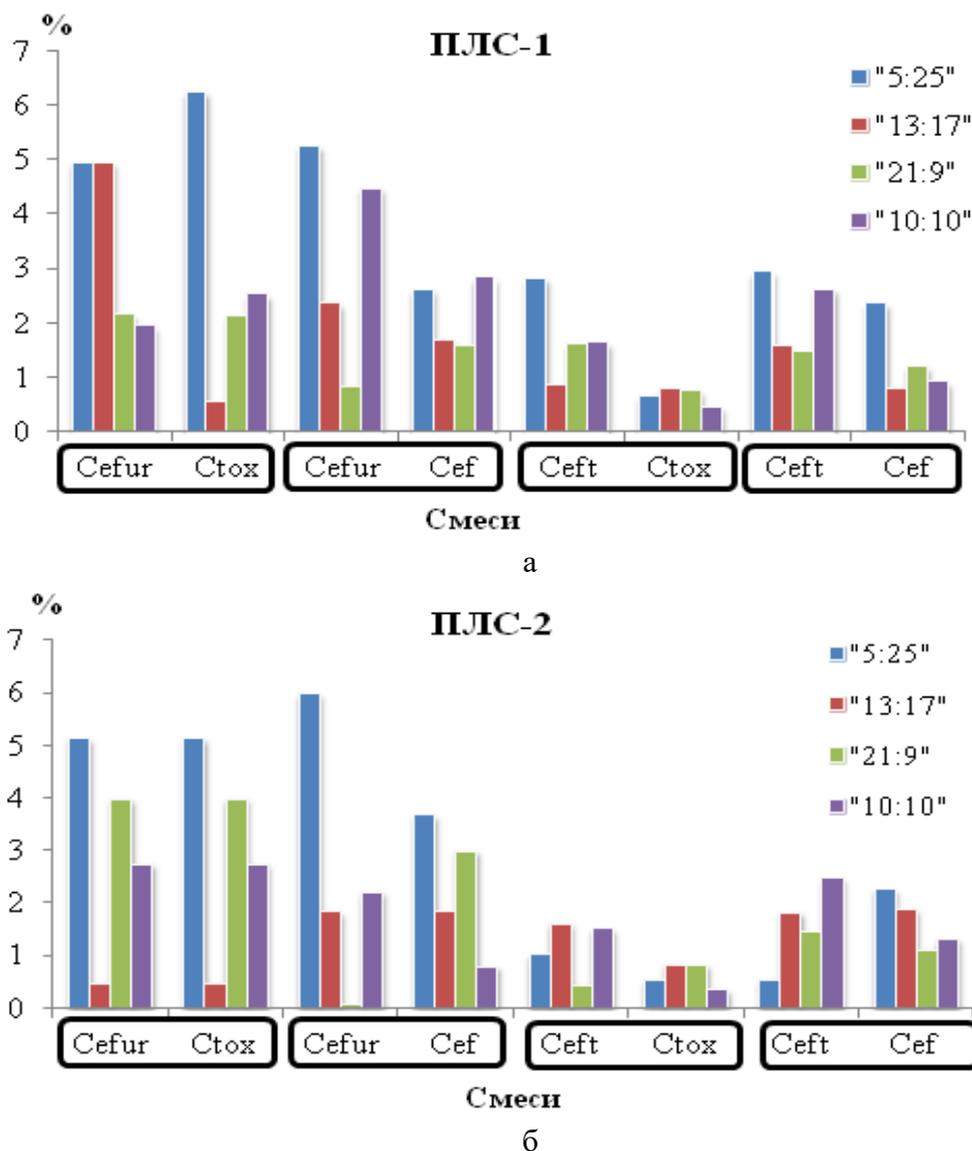


Рис. 34. Погрешности определения антибиотиков в проверочном наборе для систем «цефалоспори́н – цефалоспори́н» методами ПЛС- 1(а) и ПЛС-2(б).

В системе «цефалоспори́н – амоксициллин» погрешность определения Cefur методом ПЛС-1 не превышает 1.5%, Амох – 14.69%. Метод ПЛС-2

показывает погрешность определения не более 1.17 для Cefur, тогда как для Amox – 13.3 %.

Показана возможность отдельного спектрофотометрического определения антибиотиков цефалоспоринового и пенициллинового рядов в их смесях проекционными методами ПЛС-1 и ПЛС-2. Оценены среднеквадратичные ошибки калибровки и прогноза, на основании которых подобрано оптимальное число латентных переменных для каждой системы и метода. Установлено, что все исследованные модели дают высокие значения квадрата коэффициента аппроксимации и тангенсы угла наклона зависимостей «измерено-предсказано» близкие к единице, что позволяет рекомендовать эти методы для практического использования.

4.2 Спектрофотометрическое определение АФИ в глазных каплях с использованием ПЛС и РГК

Сочетание двух и более активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), образующие сложную терапевтическую систему в лекарственном препарате (ЛП), пользуются популярностью у потребителей из-за удобства, экономичности, широкого фармакологического эффекта, сниженной степени возникновения побочных эффектов. Для лечения аллергических реакций и воспалительных раздражений глаз в весенне-осенний период применяются глазные лекарственные формы в которых широко применяется комбинация АФИ, оказывающих противоаллергическое и сосудосуживающее действие.

Трудоемкое и сложное предварительное разделение АФИ обладающих сходными физико-химическими свойствами и входящих в состав комбинированных препаратов затрудняет проведение экспресс анализа при контроле качества в лаборатории. Хемометрические алгоритмы, являющиеся на сегодняшний момент перспективными, экспрессными и не имеющими больших трудозатрат являются альтернативой трудоемким процедурам связанным с предварительным разделением компонентов при анализе.

Электронные спектры (рис.35) поглощения имеют характерные максимумы поглощения 258 и 280 нм для нафазолина гидрохлорида и нафазолина нитрата соответственно.

Путем смешивания стандартных исходных растворов нафазолина нитрата и дифенгидрамина гидрохлорида приготовлены 20 модельных растворов ($V=5$ мл) в диапазоне концентраций 0.017-0.400 мг/мл. По данным таблицы 33, из 20 модельных растворов 14 смесей были выбраны для калибровочного набора, остальные 6 были использованы в качестве тестового набора.

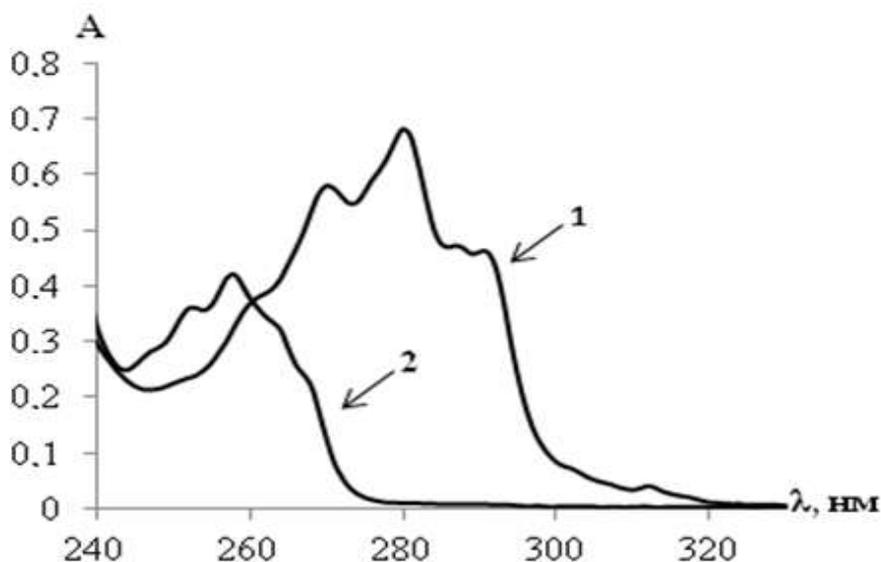


Рисунок 35. Спектры поглощения: 1 – Нафазолина нитрат ($C_M= 10^{-4}M$),
2 – Дифенгидрамина гидрохлорид ($C_M= 10^{-3}M$)

Параметры модели для количественного определения содержания АФИ в ЛП приведены в таблице 34.

Табл. 34. Состав и количество модельных растворов Диф и Наф, С, мг/мл

№	Нафазолин,	Дифенгидрамин,	№	Нафазолин,	Дифенгидрамин,
1*	0.038	0.150	11	0.083	0.200
2	0.038	0.250	12*	0.083	0.300
3	0.038	0.401	13	0.099	0.200
4	0.050	0.150	14*	0.099	0.250
5	0.050	0.200	15	0.099	0.401
6	0.050	0.300	16	0.019	0.200
7	0.067	0.200	17	0.019	0.075
8	0.067	0.250	18*	0.017	0.063
9*	0.067	0.401	19	0.019	0.125
10	0.083	0.150	20*	0.025	0.150

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне 250-330 нм с интервалом 0.2 нм. Таким образом, получена матрица размерностью 26×501, которую использовали для определения содержания активных фармацевтических ингредиентов в глазных каплях «Сигида ДУО», «Окуметил и Полинадим» методами ПЛС-1, ПЛС-2 и РГК. На рис. 36 представлены спектры поглощения разбавленных растворов глазных капель «Сигида ДУО», «Полинадим» в 10 раз и «Окуметил» в 25 раз.

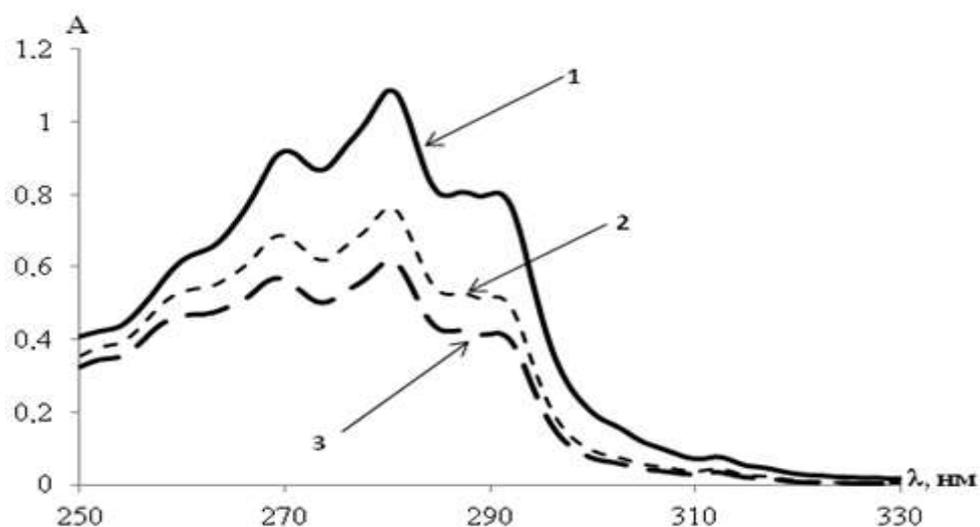
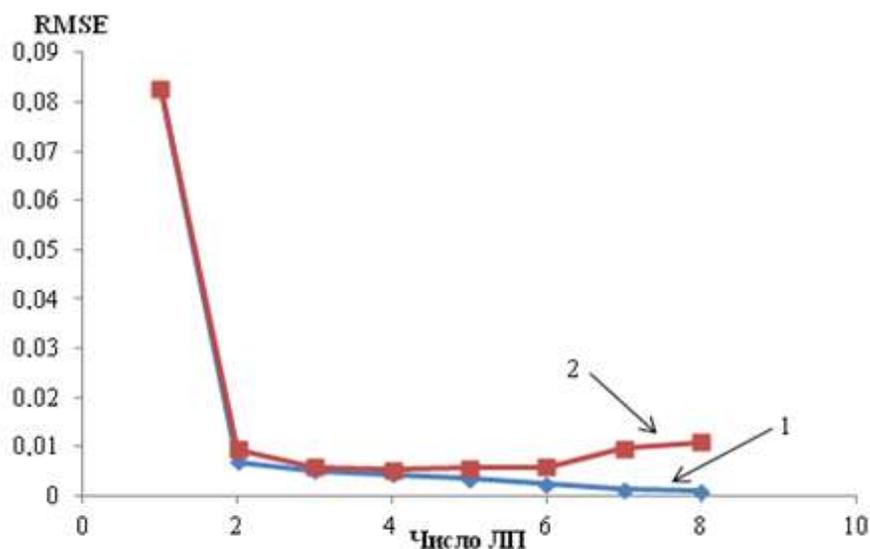
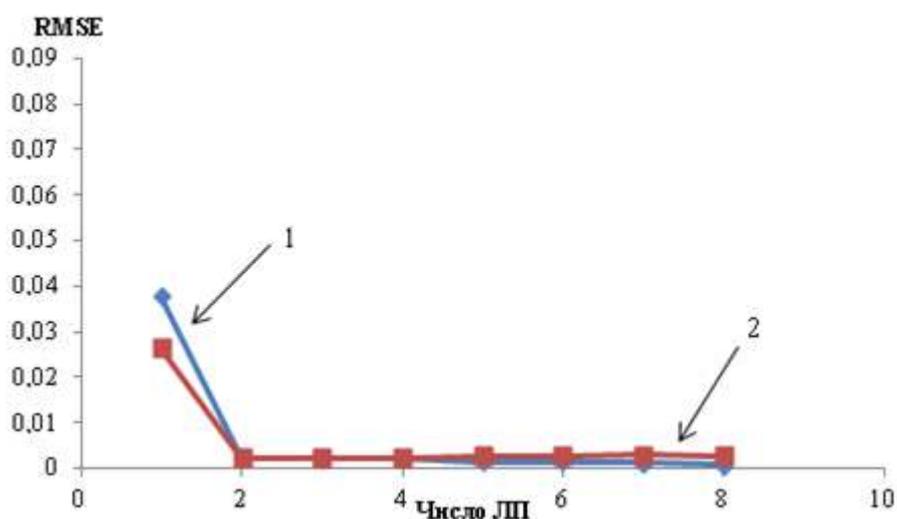


Рисунок 36. Спектры поглощения глазных капель «Окуметил» (1); «Сигида Дуо» (2) и «Полинадим» (3)

Выбор оптимального числа латентных переменных (ЛП) осуществлен на основании минимального значения RMSEP, при котором не наблюдается резкого возрастания значения RMSEC, что определяет оптимальную сложность модели. Пример графиков зависимости RMSEC и RMSEP для выбора оптимального числа ГК/ЛП и выбранные оптимальные значения ГК/ЛП представлены на рис 37.



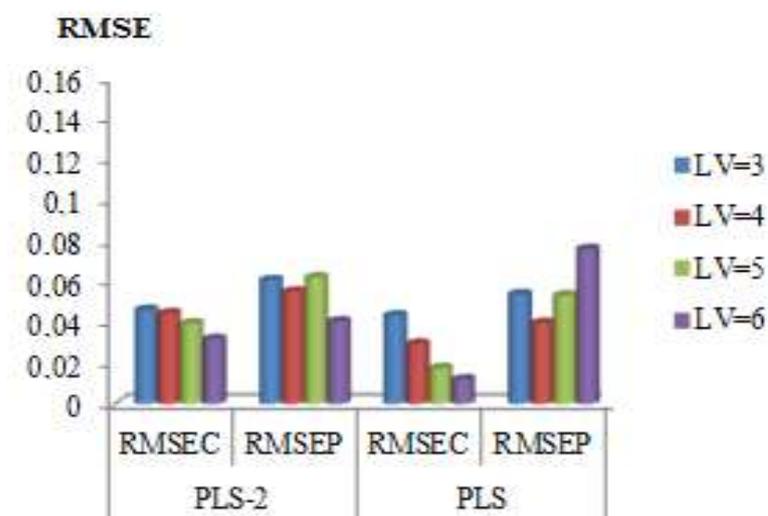
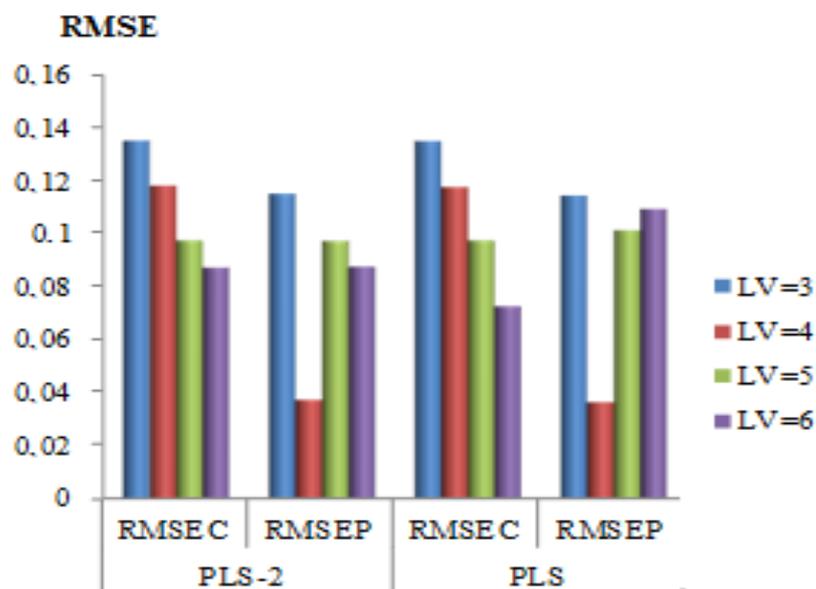
а



б

Рис. 37 Зависимость RMSEC (1) и RMSEP (2) дифенгидрамина (а) и нафазолина (б) от числа ЛП при определении методом ПЛС-2

На рис. 38 представлены величины RMSEC и RMSEP при различном числе LV при определении методами ПЛС-1 и ПЛС-2.



б

Рис. 38. Зависимость RMSEC и RMSEP в модельных смесях Диф (а) и Наф (б) от числа ЛП

При построении проекционного пространства метод ПЛС-1 учитывает значения матрицы X и один отклик Y (т.е. концентрацию одного АФИ), в результате получается несколько проекционных подпространств в отдельности для каждого компонента, а в методе ПЛС-2 отклики Y (концентрации обоих АФИ) рассматриваются как общее подпространство.

Основные параметры моделей для определения ДИФ и НПФ суммированы в таблице 35.

Таблица 35. Параметры моделей определения ДИФ НАФ методами ПЛС-1 и ПЛС-2

АФИ	Метод	Число ЛП	Обучающий набор			Проверочный набор		
			Уравнение	R ²	RMSEC	Уравнение	R ²	RMSEP
ДИФ	ПЛС-1	4	$y = 1.00x - 0.00$	1.00	0.118	$y = 0.98x + 0.03$	0.98	0.036
	ПЛС-2	4	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.118	$y = 0.98x + 0.03$	0.98	0.037
НАФ	ПЛС-1	4	$y = 1.00x + 0.00$	0.98	0.029	$y = 1.03x - 0.03$	1.00	0.039
	ПЛС-2	6	$y = 1.03x - 0.03$	1.00	0.032	$y = 1.00x + 0.00$	1.00	0.041

Как видно из данных таблицы уравнения зависимостей «измерено-предсказано» имеют тангенс наклона близкий к 1 и свободный член близкий к нулю; коэффициент корреляции близок к 1; что говорит о высоком качестве моделей.

Проверку правильности определения проводили методом «введено-найдено». Средние погрешности определения содержания нафазолина нитрата и дифенгидрамина гидрохлорида приведены в таблице 36.

Таблица 36. Результаты определения Диф и Наф в глазных каплях (ммоль/л) методом ПЛС-1 и ПЛС-2 и проверки правильности методом «введено-найдено» (n = 3, P = 0.95)

ЛП	Метод	Диф, ммоль/л				Наф, ммоль/л			
		Введе-но	Найде-но всего	Найде-но в добавке	Sr, %	Введе-но	Найде-но всего	Найде-но в добавке	Sr, %
Сигида ДУО	ПЛС-1	-	0.365± 0.002	-	0.15	-	0.111± 0.004	-	1.3
	ПЛС-2	-	0.364± 0.001	-	0.2	-	0.114± 0.002	-	0.6
	ПЛС-1	0.183	0.556± 0.001	0.191	0.1	-	0.114± 0.004	-	0.5
	ПЛС-2	0.183	0.555± 0.001	0.190	0.1	-	0.115± 0.003	-	0.5
	ПЛС-1	-	0.364± 0.002	-	0.2	0.056	0.180± 0.004	0.069	0.9
	ПЛС-2	-	0.378± 0.3	-	0.3	0.056	0.181± 0.002	0.07	0.5
Полина- дим	ПЛС-1	-	0.408± 0.004	-	0.4	-	0.088± 0.005	-	1.9
	ПЛС-2	-	0.407± 0.002	-	0.2	-	0.090± 0.001	-	2.3
	ПЛС-1	0.2	0.584± 0.003	0.177	0.3	-	0.09± 0.01	-	0.9
	ПЛС-2	0.2	0.583± 0.002	0.176	0.1	-	0.092± 0.003	-	1.2
	ПЛС-1	-	0.408± 0.004	-	0.4	0.045	0.143± 0.002	0.098	0.7
	ПЛС-2	-	0.409± 0.004	-	0.6	-	0.144± 0.003	0.099	0.6
Окуме- тил	ПЛС-1	-	0.180± 0.001	-	0.3	-	0.174± 0.002	-	0.4
	ПЛС-2	-	0.174± 0.002	-	0.5	-	0.166± 0.002	-	0.6
	ПЛС-1	0.09	0.238± 0.003	0.064	0.5	-	0.166± 0.002	-	0.4
	ПЛС-2	0.09	0.247± 0.001	0.073	0.2	-	0.178± 0.003	-	0.6
	ПЛС-1	-	0.174± 0.002	-	0.5	0.09	0.323± 0.002	0.15	0.3
	ПЛС-2	-	0.160± 0.001	-	0.3	-	0.325± 0.002	0.152	0.4

Результаты, полученные этими методами, близки друг к другу. Также сравнили с теоретическими значениями концентраций и показали, что общая погрешность определения дифенгидрамина гидрохлорида и нафазолина нитрата методом ПЛС–1 и ПЛС–2 в препаратах не превышает 15.1% и 16.5% соответственно.

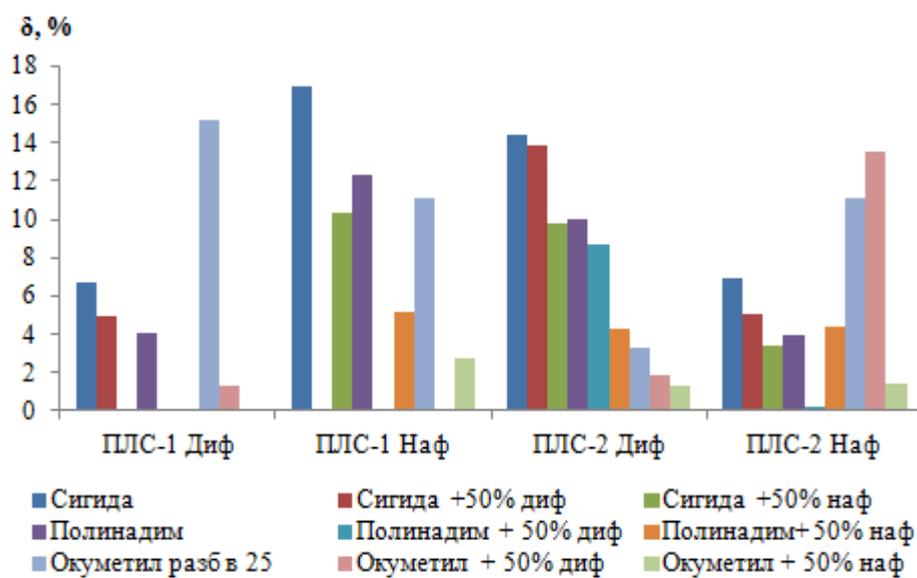


Рис. 39. Относительная погрешность определения Диф и Наф в ЛП

В рамках данной работы поставленная цель достигнута. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что сочетание УФ-спектрофотометрии и методов хемометрики может использоваться как хороший аналитический метод для контроля качества фармацевтической продукции.

Полученные результаты позволяют предположить, что метод проекции на латентные структуры можно использовать для одновременного определения активных фармацевтических ингредиентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложены способы отдельного спектрофотометрического определения синтетических пищевых красителей в напитках и лекарственных препаратах, а также активных фармацевтических ингредиентов в глазных каплях, с использованием направленно выбранных хемометрических алгоритмов многомерной обработки данных (регрессии на главные компоненты и проекции на латентные структуры).
2. Определены оптимальные условия регистрации и дифференцирования спектров поглощения (шаг сканирования, диапазон длин волн, шаг дифференцирования) при спектрофотометрическом определении красителей E110 и E124 методами производной спектрофотометрии в сочетании с обработкой данных хемометрическими алгоритмами.
3. Проведено моделирование спектральных данных на примере спектров поглощения СПК и АФИ методами регрессии на главные компоненты и проекции на латентные структуры. Показано, что на параметры моделирования влияет выбор хемометрического метода, степень перекрытия спектров поглощения аналитов, условия фотометрирования, соотношение концентраций компонентов в смеси. На примере системы E110 и E124 проведено сравнение методов Фирордта, первой производной при «нулевом пересечении», РГК и ПЛС; показано, что хемометрические алгоритмы характеризуются наименьшей погрешностью определения.
4. Разработаны методики спектрофотометрического определения СПК E110 и E122 в препарате «Трависил»; красителей E110 и E124 – в препарате «Стрепсилс»; E110, E122 и E102 – в напитке «YUPI»; E102 и E110 в – непрозрачных напитках в сочетании с магнитной твердофазной экстракцией; нафтизина и дифенгидрамина в глазных каплях различных производителей.

Список литературы

1. Родионова О. Е., Померанцев А. Л. Хемометрика: достижения и перспективы // Успехи химии. 2006. Т. 75. №. 4. С. 302-321.
2. Vignaduzzo S. E., Maggio R. M., Olivieri A. C. Why should the pharmaceutical industry claim for the implementation of second-order chemometric models—A critical review // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2020. Т. 179. С. 112965.
3. El-Gindy A., Hadad G. M. Chemometrics in pharmaceutical analysis: an introduction, review, and future perspectives // Journal of AOAC International. 2012. Т. 95. №. 3. С. 609-623.
4. Cornejo-Báez A. A. et al. Chemometrics: a complementary tool to guide the isolation of pharmacologically active natural products // Drug discovery today. 2020. Т. 25. №. 1. С. 27-37.
5. Challa S., Potumarthi R. Chemometrics-based process analytical technology (PAT) tools: applications and adaptation in pharmaceutical and biopharmaceutical industries // Applied biochemistry and biotechnology. 2013. Т. 169. №. 1. С. 66-76.
6. Roggo Y., Pascal C., Maurer L., Carmen L., Edmond A., Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2007. Т. 44. №. 3. С. 683-700.
7. Razuc M. F., Grünhut M., Saidman E., Garrido M., Band B. F. Green method based on a flow-batch analyzer system for the simultaneous determination of ciprofloxacin and dexamethasone in pharmaceuticals using a chemometric approach // Talanta. 2013. Т. 115. С. 314-322.
8. Attia K. A., Nassar M. W., El-Zeiny M. B., Serag A. Effect of genetic algorithm as a variable selection method on different chemometric models applied for the analysis of binary mixture of amoxicillin and flucloxacillin: A comparative study // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2016. Т. 156. С. 54-62.

9. Borkar P., Sarode M. V., Malik L. G. Employing speeded scaled conjugate gradient algorithm for multiple contiguous feature vector frames: An approach for traffic density state estimation // *Procedia Computer Science*. 2016. T. 78. C. 740-747.
10. Astakhov S., Stögbauer H., Kraskov A., Grassberger P. Spectral mixture decomposition by least dependent component analysis // *ArXiv preprint*. 2004. <https://arxiv.org/pdf/physics/0412029.pdf>.
11. Kraskov A., Stögbauer H., Grassberger P. Estimating mutual information // *Physical review E*. 2004. T. 69. №. 6. C. 066138.
12. Belal F., Ibrahim F., Sheribah Z. A., Alaa H. New spectrophotometric/chemometric assisted methods for the simultaneous determination of imatinib, gemifloxacin, nalbuphine and naproxen in pharmaceutical formulations and human urine // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018. T. 198. C. 51-60.
13. Srathaphut L., Ruangwises N. Genetic algorithms-based approach for wavelength selection in spectrophotometric determination of vitamin B12 in pharmaceutical tablets by partial least-squares // *Procedia engineering*. 2012. T. 32. C. 225-231.
14. Abou Al Alamein A. M., Hussien L. A. E. A., Mohamed E. H. Univariate spectrophotometry and multivariate calibration: Stability-indicating analytical tools for the quantification of pimozone in bulk and pharmaceutical dosage form // *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2015. T. 53. №. 2. C. 173-183.
15. Mahrouse M. A., Elwy H. M., Salem E. M. Simultaneous determination of cefixime and erdosteine in combined dosage form using validated spectrophotometric methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. T. 241. C. 118647.
16. Abdelaleem E. A., Abdelwahab N. S. Simultaneous determination of some antiprotozoal drugs in different combined dosage forms by mean centering of

ratio spectra and multivariate calibration with model updating methods // Chemistry Central Journal. 2012. T. 6. C. 1-8

17. Moustafa A. A., Hegazy M. A., Mohame, D., Ali O. Evaluation of multivariate calibration models with different pre-processing and processing algorithms for a novel resolution and quantitation of spectrally overlapped quaternary mixture in syrup // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2016. T. 154. C. 76-83.

18. Silaev D., Rusanova T. Y. Spectrophotometric determination of active substances in ophthalmic formulation using chemometrics / 13th Winter Symposium on Chemometrics. Moskow, 2022. 28 February–4 March 2022.

19. Saad A. S., Darwish H. W., Badawy A. M., Abd El-Aleem A. E. A. B. Stability-indicating chemometric methods for the determination of tazarotene // Drug Testing and Analysis. 2010. T. 2. №. 7. C. 357-361.

20. Mahrouse M. A., Elwy H. M., Salem E. M. Simultaneous determination of cefixime and erdosteine in combined dosage form using validated spectrophotometric methods // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2020. T. 241. C. 118647.

21. Abou Al Alamein A. M., Elwy H. M., El-Din S. H. S. Univariate and multivariate spectrophotometric methods for simultaneous determination of avobenzone and octinoxate in pure form and in cosmetic formulations: A comparative study // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2019. T. 206. C. 37-47.

22. Belal F., El-Shabrawy Y., Barseem A., Ahmed H. The use of green spectroscopy with multivariate calibration models for simultaneous analysis of ternary drug mixture in combined oral antidiabetic pill // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2020. T. 241. C. 118638.

23. Salim M. M., El Sharkasy M. E., Walsh M., Belal F. Genetic Algorithm with Model-Updating-Based PLS Regression for the Spectrophotometric Determination of Clopidogrel, Atorvastatin, and Aspirin in the

Presence of its Degradation Product // Journal of Applied Spectroscopy. 2020. T. 87. C. 568-578.

24. Wagieh N. E., Hegazy M. A., Abdelkawy M., Abdelaleem E. A. Quantitative determination of oxybutynin hydrochloride by spectrophotometry, chemometry and HPTLC in presence of its degradation product and additives in different pharmaceutical dosage forms // Talanta. 2010. T. 80. №. 5. C. 2007-2015.

25. Shaaban H. , Mostafa A., Al-Zahrani B., Al-Jasser B., Al-Ghamdi R. Simultaneous Determination of Drugs Affecting Central Nervous System (CNS) in Bulk and Pharmaceutical Formulations Using Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) // Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2020. T. 2020.

26. Naguib I. A. Stability indicating analysis of bisacodyl by partial least squares regression, spectral residual augmented classical least squares and support vector regression chemometric models: a comparative study // Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 2011. T. 49. №. 2. C. 91-100.

27. Hegazy M. A., Abdelwahab N. S., Fayed A. S. A novel spectral resolution and simultaneous determination of multicomponent mixture of Vitamins B1, B6, B12, Benfotiamine and Diclofenac in tablets and capsules by derivative and MCR–ALS // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2015. T. 140. C. 524-533.

28. Tan Z., De G., Li M., Lin H., Yang S., Huang L., Tan Q. Combined electricity-heat-cooling-gas load forecasting model for integrated energy system based on multi-task learning and least square support vector machine // Journal of cleaner production. 2020. T. 248. C. 119252.

29. Al-Shaalan N. H. Determination of phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in binary mixture using chemometric-assisted spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic-UV methods // Journal of Saudi Chemical Society. 2010. T. 14. №. 1. C. 15-21.

30. Riahi S., Bagherzadeh K., Davarkhah N., Ganjali M. R., Norouzi P. Spectrophotometric and chemometric studies on the simultaneous determination of

two benzodiazepines in human plasma // *Materials Science and Engineering: C*. 2011. T. 31. №. 5. C. 992-996.

31. Nikolic G. S., Zerajic S., Cakic M. Sensitive analytical method for simultaneous analysis of some vasoconstrictors with highly overlapped analytical signals // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2011. T. 85. C. 1832-1839.

32. Wagieh N. E., Abbas S. S., Abdelkawy M., Abdelrahman M. M. Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of triamterene and xipamide in pure form and in pharmaceutical formulation // *Drug Testing and Analysis*. 2010. T. 2. №. 3. C. 113-121.

33. Glavanovic S., Glavanovic M., Tomisic V. Simultaneous quantitative determination of paracetamol and tramadol in tablet formulation using UV spectrophotometry and chemometric methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016. T. 157. C. 258-264.

34. Khajehsharifi H., Eskandari Z., Asadipour A. Application of some chemometric methods in conventional and derivative spectrophotometric analysis of acetaminophen and ascorbic acid // *Drug testing and analysis*. 2010. T. 2. №. 4. C. 162-167.

35. Zayed S. I. M. Simultaneous determination of cinnarizine and nicergoline in a binary mixture using first derivative spectra, first derivative of ratio spectra and multivariate calibration techniques // *Journal of Analytical Chemistry*. 2010. T. 65. C. 921-928.

36. Mofavvaz S., Sohrabi M. R., Nezamzadeh-Ejhieh A. New model for prediction binary mixture of antihistamine decongestant using artificial neural networks and least squares support vector machine by spectrophotometry method // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. T. 182. C. 105-115.

37. Olawoyin R. Application of back propagation artificial neural network prediction model for the PAH bioremediation of polluted soil // *Chemosphere*. 2016. T. 161. C. 145-150.

38. Zounemat-Kermani M., Kisi O., Rajaei T. Performance of radial basis and LM-feed forward artificial neural networks for predicting daily watershed runoff // *Applied Soft Computing*. 2013. T. 13. №. 12. C. 4633-4644.
39. Mohanty S., Jha M. K., Kumar A., Sudheer K. P. Artificial neural network modeling for groundwater level forecasting in a river island of eastern India // *Water resources management*. 2010. T. 24. C. 1845-1865.
40. Anctil F., Perrin C., Andreassian V. Impact of the length of observed records on the performance of ANN and of conceptual parsimonious rainfall-runoff forecasting models // *Environmental Modelling & Software*. 2004. T. 19. №. 4. C. 357-368.
41. Mofavvaz S., Sohrabi M. R., Nezamzadeh-Ejhi A. New model for prediction binary mixture of antihistamine decongestant using artificial neural networks and least squares support vector machine by spectrophotometry method // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. T. 182. C. 105-115.
42. Khaki M., Yusoff I., Islami N., Hussin N. H. Artificial neural network technique for modeling of groundwater level in Langat Basin, Malaysia // *Sains Malaysiana*. 2016. T. 45. №. 1. C. 19-28.
43. Shahrokhi Z., Sohrabi M. R., Nik S. M. The application of artificial intelligence system and regression methods based on the spectrophotometric method for fast simultaneous determination of naphazoline and antazoline in ophthalmic formulation // *Optik*. 2020. T. 203. C. 164010.
44. Farouk M., Abd Elazi O., Tawakkol S. M., Hemdan A., Shehata M. A. Comparative study between univariate spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools for simultaneous quantitation of moexipril and hydrochlorothiazide // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. T. 123. C. 473-481.
45. Patel N. S., Nandurbarkar V. P., Patel A. J., Patel S. G. Simultaneous spectrophotometric determination of celecoxib and diacerein in bulk and capsule

by absorption correction method and chemometric methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. T. 125. C. 46-52.

46. Naguib I. A., Abdelaleem E. A., Draz M. E., Zaazaa H. E. Linear support vector regression and partial least squares chemometric models for determination of Hydrochlorothiazide and Benazepril hydrochloride in presence of related impurities: a comparative study // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. T. 130. C. 350-356.

47. Farouk M., Abd Elaziz O., Tawakkol S. M., Hemdan A., Shehata M. A. Comparative study between univariate spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools for quantitation of Benazepril alone and in combination with Amlodipine // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. T. 123. C. 473-481.

48. Hegazy M. A. M., Eissa M. S., Abd El-Sattar O. I., Abd El-Kawy M. M. Determination of a novel ACE inhibitor in the presence of alkaline and oxidative degradation products using smart spectrophotometric and chemometric methods // *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014. T. 4. №. 2. C. 132-143.

49. Darwish H. W., Hassan S. A., Salem M. Y., El-Zeany B. A. Advanced stability indicating chemometric methods for quantitation of amlodipine and atorvastatin in their quinary mixture with acidic degradation products // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016. T. 154. C. 58-66.

50. Tawakkol S. M., El-Zeiny M. B., Hemdan A. Full spectrum and selected spectrum based chemometric methods for the simultaneous determination of Cinnarizine and Dimenhydrinate in laboratory prepared mixtures and pharmaceutical dosage form // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. T. 173. C. 892-896.

51. El-Zaher A. A., Elkady E. F., Elwy H. M., Saleh M. A. E. M. Simultaneous spectrophotometric determination of glimepiride and pioglitazone in binary mixture and combined dosage form using chemometric-assisted techniques

// *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. T. 182. C. 175-182.

52. Hegazy M. A., Lotfy H. M., Rez, M. R., Omran Y. R. Novel spectrophotometric determination of chloramphenicol and dexamethasone in the presence of non labeled interfering substances using univariate methods and multivariate regression model updating // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015. T. 140. C. 600-613.

53. Albayrak M., Demirkaya-Miloglu F., Senol O., Polatdemir E. Design, optimization, and validation of chemometrics-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of etodolac and thiocolchicoside in pharmaceuticals // *Journal of Analytical Science and Technology*. 2019. T. 10. №. 1. C. 1-8.

54. Uddin M. N., Mondol A., Karim M. M., Jahan R. A., Rana A. A. Chemometrics assisted spectrophotometric method for simultaneous determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations // *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*. 2019. T. 54. №. 3. C. 215-222.

55. Darbandi A., Sohrabi M. R., Bahmaei M. Development of a chemometric-assisted spectrophotometric method for quantitative simultaneous determination of Amlodipine and Valsartan in commercial tablet // *Optik*. 2020. T. 218. C. 165110.

56. Mofavvaz S., Sohrabi M. R., Heydari A. Application of UV/Vis spectrophotometry based on using least squares support vector machine and continuous wavelet transform methods for the simultaneous analysis of antibiotics drugs in tablet formulation: Comparison with HPLC method // *Optik*. 2020. T. 220. C. 165246.

57. Magdy R., Hemdan A., Fares N. V., Farouk M Univariate calibrations with or without chemometric assistance for determination of drugs lacking peak maxima in their zero-order profiles // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019. T. 206. C. 207-215.

58. Arabzadeh V., Sohrabi M. R., Goudarzi N., Davallo M. Using artificial neural network and multivariate calibration methods for simultaneous spectrophotometric analysis of Emtricitabine and Tenofovir alafenamide fumarate in pharmaceutical formulation of HIV drug // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019. T. 215. C. 266-275.
59. Soudi A. T., Hussein O. G., Elzanfaly E. S., Zaazaa H. E., Abdelkawy M. Simultaneous determination of phenazopyridine HCl and trimethoprim in presence of phenazopyridine HCl impurity by univariate and multivariate spectrophotometric methods-Quantification of phenazopyridine HCl impurity by univariate methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. T. 239. C. 118516.
60. Naguib I. A., Abdelaleem E. A., Hassan E. S., Ali N. W., Gamal M. Partial least squares and linear support vector regression chemometric models for analysis of Norfloxacin and Tinidazole with Tinidazole impurity // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. T. 239. C. 118513.
61. Kamal A. H., Marie A. A., Hammad S. F. Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of nebivolol hydrochloride and valsartan in their tablet // *Microchemical Journal*. 2020. T. 155. C. 104741.
62. Fayez Y. M., Tawakkol S. M., Fahmy N. M., Lotfy H. M., Shehata M. A. A. Comparative study of the efficiency of computed univariate and multivariate methods for the estimation of the binary mixture of clotrimazole and dexamethasone using two different spectral regions // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018. T. 194. C. 126-135.
63. Mansour M. F., El-Kady E. F., El-Guindi N. M., El-Moghazy S. M., Van Schepdael A., Adams E. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Imipramine Hydrochloride with Chlordiazepoxide and Nortriptyline Hydrochloride with Fluphenazine Hydrochloride // *Analytical Letters*. 2017. T. 50. №. 11. C. 1778-1802.

64. Fawzy M. G., Saleh H., Reda A., Bahgat E. A green spectrophotometric method for the simultaneous determination of nasal binary mixture used in respiratory diseases: Applying isosbestic point and chemometric approaches as a resolving tool, greenness evaluation // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022. T. 283. C. 121585.

65. Monakhova Y. B., Mushtakova S. P., Kolesnikova S. S. Determination of vitamins in mixtures of various composition by spectrophotometry with self-modeling curve resolution // *Journal of Analytical Chemistry*. 2010. T. 65. C. 588-595.

66. Singh V. D., Daharwal S. J. Development and validation of multivariate calibration methods for simultaneous estimation of Paracetamol, Enalapril maleate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. T. 171. C. 369-375.

67. El-Gindy A., Emara S., Shaaban H. Validation and application of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for simultaneous determination of two ternary mixtures containing drotaverine hydrochloride // *Journal of AOAC international*. 2010. T. 93. №. 2. C. 536-548.

68. Ali N. W., Hegazy M. A., Abdelkawy M., Abdelfatah R. M. Simultaneous determination of naphazoline hydrochloride, chlorpheniramine maleate and methylene blue in their ternary mixture // *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. T. 26. №. 3.

69. Taghizade M., Ebrahimi M., Fooladi E., Yoosefian M. Simultaneous spectrophotometric determination of the residual of ciprofloxacin, famotidine, and tramadol using magnetic solid phase extraction coupled with multivariate calibration methods // *Microchemical Journal*. 2021. T. 160. C. 105627.

70. Abdel-Ghany M. F., Hussein L. A., Ayad M. F., Youssef M. M. Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture //

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017. T. 171. C. 236-245

71. Toubar S. S., Hegazy M. A., Elshahed M. S., Helmy M. I. Novel pure component contribution, mean centering of ratio spectra and factor based algorithms for simultaneous resolution and quantification of overlapped spectral signals: An application to recently co-formulated tablets of chlorzoxazone, aceclofenac and paracetamol // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2016. T. 163. C. 89-95.

72. Moustafa A. A., Salem H., Hegazy M., Ali O. Evaluating the efficiency of spectral resolution of univariate methods manipulating ratio spectra and comparing to multivariate methods: An application to ternary mixture in common cold preparation // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2015. T. 137. C. 1363-1373.

73. Darwish H. W., Hassan S. A., Salem M. Y., El-Zeany B. A. Different approaches in partial least squares and artificial neural network models applied for the analysis of a ternary mixture of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014. T. 122. C. 744-750.

74. Lotfy H. M., Saleh S. S., Hassan N. Y., Salem H. A comparative study of novel spectrophotometric methods based on isosbestic points; application on a pharmaceutical ternary mixture // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014. T. 126. C. 112-121.

75. Darwish H. W., Hassan S. A., Salem M. Y., El-Zeany B. A. Comparative study between derivative spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools applied for the simultaneous quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013. T. 113. C. 215-223.

76. Nagavalli D., Vaidhyalingam V., Santha A., Sankar A., Divya O. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine

besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods // *Acta Pharmaceutica*. 2010. T. 60. №. 2. C. 141.

77. Serag A. Hasan M. A., Tolba E. H., Abdelzaher A. M., Elmaaty, A. A. Analysis of the ternary antiretroviral therapy dolutegravir, lamivudine and abacavir using UV spectrophotometry and chemometric tools // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022. T. 264. C. 120334.

78. Hegazy M. A., Abdelwahab N. S., Fayed A. S. A novel spectral resolution and simultaneous determination of multicomponent mixture of Vitamins B1, B6, B12, Benfotiamine and Diclofenac in tablets and capsules by derivative and MCR–ALS // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015. T. 140. C. 524-533.

79. Zidan D. W., Hassan W. S., El-Masry M. S., Shalaby A. A. Novel spectrophotometric and factor-based multivariate calibration-prediction techniques for determination of two inhibitors of hepatitis C-virus and hepatocellular carcinoma in pure, human urine, and human plasma // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019. T. 213. C. 288-300.

80. Elsonbaty A., Serag A., Abdulwahab S., Hassan W. S., Eissa M. S. Analysis of quinary therapy target ing multiple cardiovascular diseases using UV spectrophotometry and chemometric tools // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. T. 238. C. 118415

81. Hassan S. A., Nashat N. W., Elghobashy M. R., Abbas S. S., Moustafa A. A. Advanced chemometric methods as powerful tools for impurity profiling of drug substances and drug products: Application on bisoprolol and perindopril binary mixture // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022. T. 267. C. 120576.

82. Marcellos L., Faria A., Souza M., Almeida M., Sabin G., Poppi R., Oliveira M. Simultaneous analysis of first-line anti-tuberculosis drugs in tablets by UV spectrophotometry compared to capillary zone electrophoresis // *Open Chemistry*. 2012. T. 10. №. 6. C. 1808-1816.

83. Ioele G., De Luca M., Dinc E., Oliverio F., Ragno G. Artificial neural network combined with principal component analysis for resolution of complex pharmaceutical formulations // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2011. Т. 59. №. 1. С. 35-40.
84. Moustafa A. A., Hegazy M. A., Mohame, D., Ali O. Evaluation of multivariate calibration models with different pre-processing and processing algorithms for a novel resolution and quantitation of spectrally overlapped quaternary mixture in syrup // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016. Т. 154. С. 76-83.
85. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Л.: Химия, 1986. 432 с.
86. Власова И. В., Вершинин В. И., Цюпко Т. Г.. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений, проблема неаддитивности светопоглощения // *Журнал аналитической химии*. 2011. Т. 66. №. 1. С. 25-33.
87. Шестопалова Н. Б., Петрович М. В., Чернова Р. К. - Определение синтетических пищевых красителей E102 и E110 при совместном присутствии // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*. 2016. Т. 16. №. 3. С. 247-253.
88. Власова И.В., Шилова А.В., Фокина Ю.С. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2011. Т. 77. №. 1. С. 21-28.
89. Lopez-de-Alba P.L., Lopez-Martinez L., Michelini-Rodriguez L. I., Wróbel K., Amador-Hernández J. Extraction of sunset yellow and tartrazine by ion-pair formation with Adogen-464 and their simultaneous determination by bivariate calibration and derivative spectrophotometry // *Analyst*. 1997. Т. 122. №. 12. С. 1575-1579.
90. Sayar S., Özdemir Y. First-derivative spectrophotometric determination of Ponceau 4R, Sunset Yellow and Tartrazine in confectionery products // *Food Chemistry*. 1998. Т. 61. №. 3. С. 367-372.

91. Üstün Özgür M., Alpdoğan G., Koyuncu İ. Zero-crossing derivative spectrophotometric determination of mixtures of sunset yellow and erythrosine in pure form and in tablets // *Analytical letters*. 2002. T. 35. №. 4. C. 721-732.
92. Nevado J.J.B., Flore J.R., Lerena M. J.V. Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow by derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative // *Talanta*. 1993. T. 40. №. 9. C. 1391-1396.
93. Özgür M. Ü. A rapid spectrophotometric method to resolve a binary mixture of food colorants (Riboflavine and Sunset Yellow) // *Turkish Journal of Chemistry*. 2004. T. 28. №. 3. C. 325-334.
94. Capitan-Vallvey L. F., Valencia M. C., Nicolás E. A. Flow injection analysis with on-line solid phase extraction for spectrophotometric determination of Ponceau 4R and its subsidiary unsulfonated dye in sweets and cosmetic products // *Microchimica Acta*. 2002. T. 138. C. 69-76.
95. Joseph-Charles J., Langlois M.H., Montagut M., Boyer C., Dubost J.P. Simultaneous Determination of Two Synthetic Dyes Erythrosine and Sunset Yellow in a Pharmaceutical Syrup By First Derivative Visible Spectrophotometry // *Analytical Letters*. 2000. T. 33. №. 8. C. 1567-1575.
96. Vidotti E. C., Cancino J. C., Oliveira C. C., Rollemberg M. do C. E. Simultaneous determination of food dyes by first derivative spectrophotometry with sorption onto polyurethane foam // *Analytical sciences*. 2005. T. 21. №. 2. C. 149-153.
97. Özdemir Y., Akkan A. A. Determination of Patent Blue V and Carmoisine in gelatine desserts by derivative spectrophotometry // *Turkish Journal of Chemistry*. 1999. T. 23. №. 2. C. 221-230.
98. Fahimirad B., Asghari A., Rajabi M. Photo-degradation of basic green 1 and basic red 46 dyes in their binary solution by La₂O₃-Al₂O₃nanocomposite using first-order derivative spectra and experimental design methodology // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. T. 179. C. 58-65.

99. Tehrani M. S., Zare-Dorabei R. Competitive removal of hazardous dyes from aqueous solution by MIL-68 (Al): derivative spectrophotometric method and response surface methodology approach // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016. T. 160. C. 8-18.

100. Pooralhossini J. Ghaedi, M., Zanjanchi, M. A., Asfaram A. Ultrasonically assisted removal of Congo Red, Phloxine B and Fast green FCF in ternary mixture using novel nanocomposite following their simultaneous analysis by derivative spectrophotometry // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017. T. 37. C. 452-463.

101. Власова И.В., Вершинин В.И., Шелпакова А.С. Хемометрические алгоритмы в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей органических веществ // *Вестник Омского университета*. 2010. №. 2. С. 14-24

102. Altmöz S., Toptan S. Determination of Tartrazine and Ponceau-4R in various food samples by Vierordt's method and ratio spectra first-order derivative UV spectrophotometry // *Journal of food composition and analysis*. 2002. T. 15. №. 6. C. 667-683.

103. Altmöz S., Toptan S. Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003. T. 16. №. 4. C. 517-530.

104. El-Sheikh A. H., Al-Degs Y. S. Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices // *Dyes and Pigments*. 2013. T. 97. №. 2. C. 330-339.

105. Ni Y., Wang Y., Kokot S. Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics // *Talanta*. 2009. T. 78. №. 2. C. 432-441.

106. Berzas J. J., Flores J. R., Llerena M. V., Farinas N. R. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in commercial products // *Analytica Chimica Acta*. 1999. T. 391. №. 3. C. 353-364.

107. Llamas N. E., Garrido M., Di Nezio M. S., Band B. S. F. Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares // *Analytica chimica acta*. 2009. T. 655. №. 1-2. С. 38-42.

108. Asadollahi S., Sohrabi M. R., Mofavvaz S. Rapid simultaneous spectrophotometric determination of food dyes in soft drink using continuous wavelet transform and multivariate calibration methods // *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2022. T. 41. №. 5. С. 1682-1693.

109. Matsui H., Yamasaki T. Simultaneous determination of five triarylmethane colorants in syrup by applying multivariate curve resolution to second-derivative visible absorption spectra // *Analytical Sciences*. 2023. T. 39. №. 1. С. 77-85.

110. Hassan E. M., Haggа M. E. M., Al Johar H. I. Determination of cisapride in pharmaceutical preparations using derivative spectrophotometry // *Journal of pharmaceutical and biomedical Analysis*. 2001. T. 24. №. 4. С. 659-665.

111. Atul A. Shirkhedkar and Sanjay J. Surana. UV-Spectrophotometry and first order derivative spectrophotometry methods for determination of rabeprazole sodium in bulk and tablets // *Oriental Journal of Chemistry*. 2008. T. 24. №. 1. С. 243.

112. Шорманов В. К., Андреева Ю. В., Герасимов Д. А. Применение производной спектрофотометрии для определения флутамида в таблетках // *Актуальные проблемы медицины*. 2014. Т. 28. №. 24 (195). С. 231-234.

113. Волокитина Д. С., Лазарян Д. С., Волокитин С. В. Применение производной спектрофотометрии для определения нового биологически активного соединения производного хиназолина в таблетках // *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2017. Т. 19. №. 9. С. 215-218.

114. Шорманов В. К., Щербаков Д. П. Применение производных спектров второго порядка для оценки содержания мебедазола в таблетках // *Человек и его здоровье*. 2017. №. 4. С. 120-124.

115. Radhakrishna T., Satyanarayana J., Satyanarayana A. Determination of zafirlukast by stability indicating LC and derivative spectrophotometry // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2002. Т. 30. №. 3. С. 695-703.

116. Егунова О. Р., Решетникова И. С., Герман С. В., Казимирова К. О., Хабибуллин В. Р., Желобицкая Е. А., Штыков С. Н. Сорбционно-флуориметрическое определение энрофлоксацина с применением наночастиц магнетита, модифицированных полиэтиленгликолем // Изв. Саратовского университета. Нов. сер. Сер.Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 1. С. 48-52.

117. Померанцев А. Л. Хемометрика в Excel: учебное пособие. Томск: Издательство Томского политехнического университета. 2014. 435 с

118. Полянских Е. И. и др. Методика контроля содержания синтетических красителей в пищевой продукции // Химическая безопасность. 2019. Т. 3. №. 1. С. 166-181.

119. Брынских Г. Т. и др. Качественное и количественное определение содержания пищевых красителей в газированных напитках // Ульяновский медико-биологический журнал. 2014. №. 4. С. 72-75.

120. Эллер К. И., Пименова В. В. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище // Москва. – 2004. – С. 16-23.