

Extraction of Alkaloids by the Micellar Phase of Sodium Dodecyl Sulfate for their Further Chromatographic Determination

V.S. Starova*, S.A. Kulichenko

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska 64, Kyiv, Ukraine, 01601; *e-mail: starova-v@ukr.net

Received: September 11, 2022; Accepted: July 26, 2023

DOI: 10.17721/moca.2023.81-86

The influence of the main parameters of hydrophobicity ($\log P$), structure (PSA), and protolytic properties (pK_a) of some alkaloids on their distribution into modified micellar extraction system based on sodium dodecyl sulfate (SDS- $\text{NaCl-H}_2\text{Sal}$) was established. The proposed prognostic regression $D = 941 - 4.09 \cdot \text{PSA} - 27.3 \cdot \log P - 44.5 \cdot pK_a$ is characterized by satisfactory indexes (R -squared 99.9, F -ratio 242, standard error 7.19, mean absolute error 2.38). The accuracy of the alkaloid distribution prediction by this regression is well correlated with accuracy of the measurement of the extraction parameters. The predicted D value for novocaine is 257 ($R=93\%$), and the experimentally found D value is 202 ($R=91\%$). For lidocaine, the predicted and experimental D values are practically the same and equal 386 ($R=95\%$) and 380 ($R=95\%$), respectively. The possibility of quantitative extraction of positively charged hydrophilic ($\log P < 0$) organic bases into the micellar phase of SDS is shown. The developed hybrid HPLC technique for determining papaverine in urine with its cationic form ($\text{pH}=2$) preconcentration by modified micellar SDS phase is characterized by sufficient sensitivity and accuracy ($\text{DL} = 0.01 \mu\text{g/ml}$, $\text{Sr} \leq 0.08$, $R > 99\%$, $K = 10$). Only alkaloids with $\log P > 1.4$ can be determined by this technique because otherwise, the chromatographic peaks of salicylic acid and alkaloid cannot separate.

Keywords: micellar extraction, sodium dodecyl sulfate, chromatography, alkaloids, papaverine

Екстракція алкалоїдів міцелярною фазою додецилсульфату натрію для їх подальшого хроматографічного визначення**

В.С. Старова*, С.А. Куліченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Володимирська 64, Київ, Україна, 01061;

*e-mail: starova-v@ukr.net

Надійшла: 11 вересня 2022 р.; Прийнята: 26 липня 2023 р

DOI: 10.17721/moca.2023.81-86

**За матеріалами "Київської конференції з аналітичної хімії: Сучасні тенденції 2022".

Встановлено вплив основних параметрів гідрофобності ($\log P$), будови (PSA) та протолітичних властивостей (pK_a) ряду алкалоїдів на їх розподіл у модифікованій міцелярно-екстракційній системі на основі додецилсульфату натрію (ДДСН- $\text{NaCl-H}_2\text{Sal}$). Показано, що врахування спільного впливу цих параметрів на значення коефіцієнту розподілу (D) забезпечує можливість кількісного прогнозування вилучення алкалоїдів у фазу ДДСН. Запропонована прогностична регресія $D = 941 - 4.09 \cdot \text{PSA} - 27.3 \cdot \log P - 44.5 \cdot pK_a$ характеризується задовільними метрологічними показниками (коефіцієнт лінійної кореляції 99.9, критерій Фішера 242, стандартна похибка 7.19, середня абсолютна похибка моделі 2.38). Точність прогнозу розподілу алкалоїдів за цією регресією знаходиться в межах точності вимірювання параметрів екстракції. Прогнозоване значення D для новокаїну становить 257 ($R=93\%$), а експериментально знайдене значення 202 ($R=91\%$). Для лідокаїну прогнозоване та експериментальне значення D практично однакові і становлять 386 ($R=95\%$) та 380 ($R=95\%$), відповідно. На прикладі теофіліну та теоброміну показана можливість кількісного вилучення у міцелярну фазу ДДСН позитивно заряджених гідрофільних ($\log P < 0$) органічних основ. Розроблена гібридна методика ВЕРХ визначення папаверину у сечі з попереднім концентруванням його катіонної форми ($\text{pH}=2$) модифікованою міцелярною фазою ДДСН характеризується достатньою чутливістю та точністю ($\text{MB}=0.01 \text{ мкг/мл}$, $\text{Sr} \leq 0.08$, $R > 99\%$, $K = 10$). За даною методикою можна визначати лише алкалоїди з $\log P > 1.4$, інакше хроматографічні піки саліцилової кислоти та алкалоїду не розділяться.

Ключові слова: міцелярна екстракція, додецилсульфат натрію, хроматографія, алкалоїди, папаверин

Алкалоїди – клас нітрогеновмісних основ, що набули широкого використання у фармацевтичній хімії. Для визначення мікрокількостей алкалоїдів у біологічних зразках необхідне попереднє концентрування. У розчині алкалоїди переважно знаходяться у формі катіонів, а у фазу неполярного органічного розчинника чи неіонної поверхнево-активної речовини найбільш повно вилучаються саме молекулярні форми органічних субстратів. Тому екстракція алкалоїдів дещо ускладнена і потребує введення додаткових реагентів або створення певної кислотності середовища [1,2]. Наприклад для ефективного вилучення молекул резерпіну із фізіологічних рідин у фазу неполярного органічного розчинника, їх переводять у незаряджену форму, створюючи лужне середовище ($pH > 9$), а одержану органічну фазу випаровують на водяній бані [3]. Така багата-стадійна пробопідготовка негативно позначається на експресності та точності методики визначення [4]. Іноді для вилучення заряджених форм органічних речовин використовують підкислений етиловий спирт як гідрофільний екстрагент. Однак використання такого підходу обмежене низькими параметрами екстракції та високою вірогідністю руйнування молекул аналіту у сильнокислому середовищі [4].

Зазначені методики концентрування не забезпечують повного вилучення як катіонних, так і молекулярних форм алкалоїдів. Таким чином, розробка нових ефективних методів концентрування алкалоїдів залишається актуальним завданням.

Міцелярна екстракція модифікованими фазами на основі аніонної ПАР, додецилсульфату натрію (ДДСН), вбачається перспективною для концентрування позитивно заряджених форм лікарських речовин [5]. При цьому поєднання хроматографічних методів визначення з міцелярно-екстракційним концентруванням може сприяти покращенню метрологічних параметрів існуючих методик [6].

Папаверин широко застосовують в медичній практиці як спазмолітик з гіпотензивною дією. Визначення папаверину у фармацевтичних препаратах проводять спектрофотометрично за власним поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектру [7], а також за поглинанням його забарвлених іонних асоціатів з хромотроповим 2В і 2R [8]. Також запропоновані методики ВЕРХ визначення папаверину з УФ детектуванням у фармацевтичних препаратах. При цьому межа виявлення становить 0.5 мкг/мл при $S_r \approx 3\%$ [9,10]. Відомо, що із організму людини папаверин виводиться у формі метаболітів, у незмінному вигляді не більше 1% [10]. Тому для кількісного визначення папаверину у біологічних зразках, як правило, використовують екстракцію органічними розчинниками. Так, для визначення папаверину

у зразках крові та шкіри спектрофотометричним методом проводили екстракцію його молекулярної форми ($pH=10$) в органічну фазу хлороформ-гексан (2:3) [8]. При цьому ступінь вилучення папаверину з крові становить 92%, а зі шкіри – 87%. Разом з цим для кількісного визначення папаверину в сечі хемілюмінесцентними методами використовували екстракцію його молекулярних форм у хлороформ ($pH=9$, $R \approx 98\%$, $MB = 0.034$ мкг/мл, $S_r \sim 2\%$) [9–12]. Сьогодні визначення мікрокількостей папаверину безпосередньо у фізіологічних рідинах залишається проблематичним та потребує вдосконалення процедури вилучення та концентрування. Міцелярно-екстракційне концентрування цього алкалоїду фазою ДДСН виступає раціональною альтернативою екстракції органічними розчинниками.

Метою роботи було дослідити вплив гідрофобності, будови та протолітичних властивостей низки алкалоїдів на їх розподіл у міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН, а також показати можливість розробки нових гібридних методик ВЕРХ визначення алкалоїдів з їх попереднім концентруванням у модифіковану міцелярну фазу ДДСН.

Матеріали та методика досліджень

Робочий розчин аніонної ПАР готували розчиненням відповідної наважки ДДСН ("Merck", вміст основної речовини $> 99.5\%$) у дистильованій воді. Модифікатори саліцилова кислота та хлорид натрію були кваліфікації "ч.д.а.". Робочий розчин хлориду натрію готували розчиненням точної наважки у дистильованій воді, а розчин саліцилової кислоти – у 0.1 моль/л розчині ДДСН.

Методика одержання міцелярної фази-коллектора: 10 мл водного розчину ДДСН ($C_{\text{ДДСН}} = 0.05$ моль/л), що містив добавки саліцилової кислоти та хлориду натрію ($C_{\text{NaCl}} = 1.0$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0.02$ моль/л, $pH=2$), поміщали у каліброванімірні циліндри об'ємом 10 мл, закріплювали на штативі і занурювали у водяну баню. Для гомогенізації системи розчини спочатку нагрівали до $\sim 30^\circ\text{C}$ і перемішували, потім поступово охолоджували до кімнатної температури. Температуру розчинів контролювали за допомогою термометрів, занурених у циліндри та безпосередньо у водяну баню. Сформована фаза ДДСН збиралась на дні циліндру. Після повного фазового розшарування фіксували об'єм міцелярної фази ДДСН та відокремлювали водну фазу декантацією.

Дослідження розподілу алкалоїдів у міцелярно-екстракційній системі на основі ДДСН. При дослідженні екстракції алкалоїдів у фазу ДДСН використовували фармацевтичні субстанції із вмістом основної речовини 99.5%. Розчини гідрофільних алкалоїдів готували розчиненням відповідних наважок у дистильованій воді, а гідрофобних – у 0.1 моль/л ДДСН. Розподіл

алкалоїдів контролювали спектрофотометричним методом за власним поглинанням в ультрафіолетовій ділянці за довжин хвиль, що відповідають максимуму поглинання їх водно-міцелярних розчинів до та після розшарування фаз.

Для виявлення основних чинників, що впливають на розподіл алкалоїдів, розраховували регресії, які пов'язують коефіцієнт розподілу між водною та міцелярною фазами (D) з дескрипторами гідрофобності, будови та протолітичних властивостей субстратів. Як параметр гідрофобності використовували коефіцієнт розподілу молекулярної форми субстрату у системі "вода–н-октанол" ($\log P$). Значення константи дисоціації у воді (pK_a) використовували як дескриптор протолітичних властивостей субстрату. Для параметрів pK_a і $\log P$ обирали затабульовані у літературі значення [13]. Дескрипторами будови субстрату виступали площа полярної поверхні молекули (PSA), її об'єм (V), а також індекс молекулярного зв'язування першого порядку ($^1\chi$). Значення $^1\chi$ розраховували за формулою: $^1\chi = \sum (\delta_i \cdot \delta_j)^{0.5}$, де i та j – безпосередньо зв'язані між собою атоми, δ – число надане кожному атому молекули, що відповідає кількості зв'язаних з ним атомів (крім атомів водню). Площу та об'єм молекули визначили за допомогою програми Molinspiration. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statgraphics Plus 3.0. Якість регресії оцінювали за допомогою значень коефіцієнту лінійної кореляції (r^2), критерію Фішера (F), стандартної похибки (S) та середньої абсолютної похибки моделі (M).

Кислотність розчинів встановлювали за допомогою розчинів HCl та NaOH. Робочі розчини гідроксиду натрію готували розчиненням наважки у звільненій від CO_2 дистильованій воді та подальшим визначенням їх точної концентрації

шляхом титрування стандартним розчином HCl. Робочий розчин HCl з концентрацією 0.1 моль/л готували за фіксаналом.

Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра UNICO UV/VIS 2800. Кислотність розчинів контролювали рН-метром «рН 340» зі скляним електродом ЭСЛ-43-07. Для визначення мікрокількостей папаверину за розробленою гібридною методикою застосовували рідинний хроматограф Dionex UltiMate 3000 з діодно-матричним детектором, RP колонкою Hypersyl ODS діаметром 4.6 мм та довжиною 150 мм (розмір частинок сорбенту – 5 мкм, розмір пор частинок сорбенту – 175 Å).

Результати досліджень та їх обговорення

Для дослідження розподілу алкалоїдів між водною та модифікованою міцелярною фазою ДДСН-NaCl-H₂Sal обрали ряд субстратів, що максимально відрізняються за будовою, гідрофобністю та протолітичними властивостями, табл. 1.

Дані таблиці 1 свідчать, що найбільш повно у міцелярну фазу ДДСН вилучаються позитивно заряджені гідрофільні алкалоїди. Розрахунком множинних регресій показано, що серед усіх параметрів будови алкалоїдів найбільший вплив на їх розподіл у даній міцелярно-екстракційній системі здійснює площа полярної поверхні молекули, табл.2. Тому для подальших розрахунків та прогнозування вилучення алкалоїду у фазу ДДСН доцільно використовувати саме цей параметр. Параметр гідрофобності на розподіл алкалоїдів впливає мало (табл.2, рівняння 5 та 7), але врахування спільного впливу дескрипторів гідрофобності, будови і протолітичних властивостей значно поліпшує метрологічні показники регресії (таблиця 2, рівняння 8).

Таблиця 1. Значення параметрів екстракції алкалоїдів у модифіковану фазу ДДСН залежно від їх будови, гідрофобності та протолітичних властивостей ($C_{\text{алкалоїду}} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{ДДСН}} = 0.05$ моль/л, $C_{\text{NaCl}} = 1.0$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0.02$ моль/л, pH= 2, $V_0 = 10$ мл, $V_{\text{мф}} = 0.5$ мл, $K=20$).

Субстрат	$\log P$	pK_a	$^1\chi$	PSA, Å ²	V, Å ³	R, %	D
Теобромін	-0.78	9.90	6.11	67.2	151	>99	-
Кофеїн	-0.07	10.4	6.15	58.4	168	83	244
Теофілін	-0.02	8.81	6.20	69.3	515	>99	-
Морфін	0.89	8.21	10.1	52.9	257	87	335
Атропін	1.83	9.43	10.2	49.8	279	84	262
Резерпін	3.32	6.60	21.4	117.8	549	61	78
Хінідін	3.44	8.56	12.0	45.6	311	85	283
Папаверин	3.08	6.03	12.3	49.8	314	>99	-

Таблиця 2. Коефіцієнт розподілу алкалоїдів залежно від дескрипторів їх будови, гідрофобності, та протолітичних властивостей.

Рівняння	R ²	F	S	M
1 D = 437 – 3.04·PSA	88.0	22.0	38.8	23.3
2 D = 404 – 13.6· χ	63.6	5.25	67.5	45.2
3 D = 414 – 0.554·V	66.4	5.94	64.9	43.2
4 D = -92.0 + 38.5·pK _a	31.8	1.40	92.5	62.7
5 D = 295 – 28.9·logP	20.7	0.782	99.7	69.5
6 D = 636 – 3.67·PSA – 18.2·pK _a	91.3	10.5	40.4	21.8
7 D = 442 – 2.92·PSA – 6.71·logP	89.0	8.05	45.6	21.6
8 D = 941 – 4.09·PSA – 27.3·logP – 44.5·pK _a	99.9	242	7.19	2.38

Для перевірки якості запропонованої регресії як модельні субстрати використали дитерпеновий алкалоїд лідокаїн ($\log P=2.44$; $PSA=32.34$; $pK_a=8.01$) та синтетичну похідну кокаїну новокаїн ($\log P=2.14$; $PSA=55.57$; $pK_a=8.96$). Вибір даних сполук був зумовлений неповним їх вилученням у фазу ДДСН, що забезпечує коректність оцінки результатів. Встановлено, що для лідокаїну розрахований згідно рівняння 8 коефіцієнт розподілу становить 386 ($R=95\%$), а для новокаїну прогнозоване значення D дорівнює 257 ($R=93\%$). При цьому експериментально знайдені значення коефіцієнтів їх розподілу у міцелярно-екстракційній системі становили 380 ($R=95\%$) та 202 ($R=91\%$). Точність прогнозу розподілу алкалоїдів за рівнянням 8 знаходиться в межах точності вимірювання параметрів екстракції.

Для перевірки можливості поєднання запропонованої міцелярно-екстракційної системи ДДСН-NaCl-H₂Sal з ВЕРХ методом визначення алкалоїдів розроблено методику ВЕРХ визначення модельного субстрату папаверину з попереднім його концентруванням у модифіковану фазу ДДСН.

При пошуку оптимальних умов хроматографування встановлено, що якісне розділення

пиків папаверину та компонентів міцелярної фази відбувається при застосуванні колонки C₁₈ як нерухомої фази, суміші вода/ацетонітрил у співвідношенні 50:50 – як рухомої фази, швидкості потоку 1 мл/хв та УФ-детектуванні за довжини хвилі 240 нм, рис. 1.

Методика ВЕРХ визначення папаверину з попереднім міцелярно-екстракційним концентруванням у модифіковану фазу ДДСН. В мірні циліндри ємністю 10 мл додавали розчин папаверину відомої концентрації та 1 мл 0.2 моль/л розчину саліцилової кислоти, приготованого в 0.5 моль/л розчині ДДСН. За допомогою розчину HCl встановлювали pH 2 та додавали 2 мл 30% розчину NaCl. Для гомогенізації системи циліндри поміщали у водяну баню, нагрівали до ~30 °C та перемішували. Одержані розчини поступово охолоджували до кімнатної температури. Після повного фазового розшарування водну фазу відокремлювали декантацією, а міцелярну фазу ($V_{\text{мф}}=0.5$ мл) розбавляли ацетонітрилом до 1 мл (pH~5) і проводили ВЕРХ визначення папаверину. Як аналітичний сигнал використовували площу під хроматографічним піком (рис. 2).

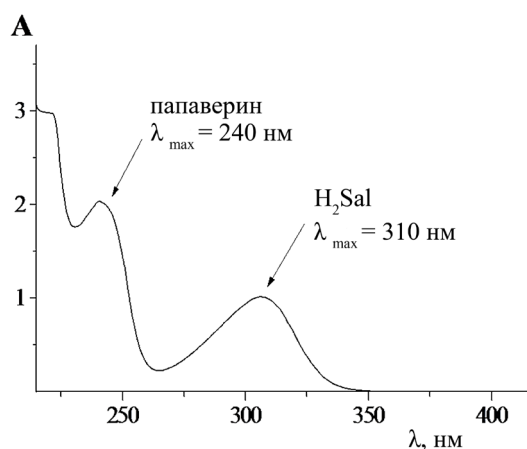


Рис.1. Спектр поглинання папаверину у модифікованій фазі ДДСН. $C_{\text{ДДСН}} = 0.05$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0.02$ моль/л, $C_{\text{NaCl}} = 1.0$ моль/л, $C_{\text{алкалоїду}} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

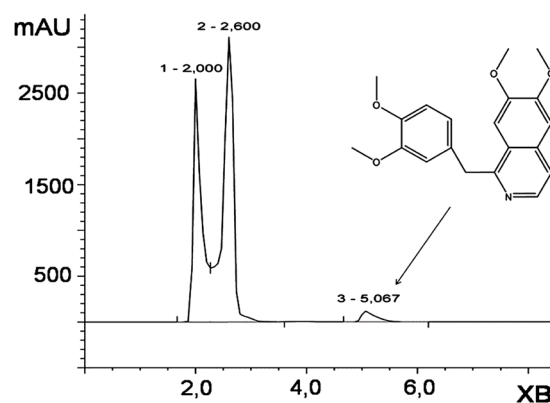


Рис.2. Хроматограма міцелярного екстракту папаверину. $C_{\text{алкалоїду}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ДДСН}} = 0.05$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{Sal}} = 0.02$ моль/л, $C_{\text{NaCl}} = 1.0$ моль/л.

На одержаній хроматограмі час виходу папаверину становить ~5.1 хв. В умовах проведення експерименту (рН~5) саліцилова кислота одночасно знаходиться у іонній та молекулярній формах, тому на хроматограмі спостерігається розділення піка, і час виходу саліцилової кислоти становить 2.0 та 2.6 хв, відповідно. Відсутність хроматографічних піків ацетонітрилу та ДДСН обумовлено тим, що при 240 нм ці речовини не поглинають.

Вміст папаверину в пробі визначали за допомогою градуовальної залежності: $S = 0.48 + 0.54 \cdot C_{\text{алкалоїду}} \cdot 10^{-5}$ моль/л ($r^2 = 0.999$). Для його побудови готували серію розчинів з відомим вмістом субстрату згідно зазначеної вище методики. Методика була перевірена методом "введено-знайдено" при визначенні вмісту папаверину у модельних розчинах, табл.3. Дані таблиці 3 свідчать про достатню правильність та відтворюваність розробленої методики визначення папаверину: загальна тривалість аналізу проби становить 30–40 хвилин. Порівняно з відомими у літературі методиками аналізу розроблена гібридна методика визначення папаверину характеризується більш високою чутливістю (МВ=0.01 мкг/мл, коефіцієнт абсолютного концентрування $K = 10$ з 10 мл проби, $R > 99\%$).

Таблиця 3. Результати ВЕРХ визначення папаверину в модельних водних розчинах та у сечі після попереднього міцелярно-екстракційного концентрування модифікованою фазою ДДСН.

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	S_r
у водному розчині (n=4, P=0.95)		
6.8	6.2±0.6	0.050
13.6	12.5±1.2	0.051
у сечі (n=3, P=0.95)		
6.8	6.0±0.8	0.071
13.6	12.0±1.7	0.076

Розроблену методику застосували для визначення добавок папаверину у сечі. З метою усунення небажаного розбавлення всі компоненти міцелярно-екстракційної системи вводили в пробу безпосередньо розчиненням їх точних наважок.

Література

1. Cantwell, F.F.; Losier, M. Liquid-liquid extraction. *Comprehensive Anal. Chem.* **2002**, 37, 297–340.
2. Petruczynik, A. Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods. *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, 10(3), 802–835.
3. Singh, D.K.; Srivastava, B.; Sahu, A. Spectro-

Методика ВЕРХ визначення папаверину у сечі. В 10 мл центрифугованої проби сечі розчиняли 0.14 г ДДСН, 0.03 г саліцилової кислоти, відому добавку папаверину та перемішували до повного розчинення реагентів. За допомогою розчину НСІ встановлювали рН 2.0, додавали 0.6 г хлориду натрію, нагрівали до ~30 °С та перемішували. Після охолодження водну фазу відокремлювали декантацією, а сформовану міцелярну фазу ($V_{\text{мф}} = 0.5$ мл) розбавляли ацетонітрилом до 1.0 мл та проводили ВЕРХ визначення папаверину. Запропоновані умови забезпечують ~10ти кратне концентрування субстрату (з врахуванням розбавлення перед хроматографуванням проби).

Дані табл.3 свідчать про достатню точність запропонованої гібридної методики визначення папаверину в пробах сечі невеликого об'єму. Чутливість запропонованої ВЕРХ методики достатня для визначення вмісту алкалоїдів у реальних пробах фізіологічних рідин. Так, з урахуванням фармакокінетичних властивостей препаратів та середніх доз застосування, вміст папаверину у сечі становить ~6.0 мкг/мл.

Однак таку методику ВЕРХ визначення алкалоїдів з попереднім їх міцелярно-екстракційним концентруванням модифікованими фазами ДДСН доцільно застосовувати для субстратів із $\log P > \log P_{\text{H}_2\text{Sal}} > 1.4$. Так, при проведенні ВЕРХ визначення атропіну ($\log P = 1.89$) спостерігалось не повне розділення хроматографічних піків саліцилової кислоти та визначуваного компонента ($R_s < 1 = 0.8$).

Висновки

Таким чином, для низки алкалоїдів зафіксовано істотний вплив полярної площі поверхні молекул субстратів на параметри їх вилучення в міцелярну фазу ДДСН. При цьому врахування спільного впливу дескрипторів гідрофобності, будови та протолітичних властивостей субстрату забезпечує можливість кількісного прогнозування вилучення алкалоїдів. Показано можливість використання модифікованої міцелярної фази ДДСН для кількісного вилучення позитивно заряджених гідрофільних органічних основ ($\log P < 0$). Доведено перспективність поєднання методики ВЕРХ визначення мікрокількостей алкалоїдів з попереднім їх міцелярно-екстракційним концентруванням фазами на основі ДДСН.

photometric determination of Rauwolfia alkaloids: estimation of reserpine in pharmaceuticals. *Anal. Sci. Published by: Japan Society for Analytical Chemistry.* **2004**, 20(3), P. 571–573.

4. Ke, L.; Xiaojian, D.; Dafang, Z.; Xiaoyan, C. Quantitative determination of ondansetron in human plasma by enantioselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal.*

Technol. Biomed. Life Sci. **2006**, 864(1–2), P. 129–136.

5. Starova, V.S.; Scherbyna, M.G.; Baziluk, Ya.V.; Kulichenko, S.A. Micellar extraction of cationic forms of pharmaceuticals in modified phase based on sodium dodecyl sulfate. *Ukr. Chem. J.* **2010**, 76(12), 106–113.

6. Merino, F.; Rubio, S.; Perez-Bendito, D. Acid-induced cloud point extraction and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples. *J. Chromatogr. A.* **2002**, 962, 1–8.

7. Tang, Y.; Luan, J.; Wang, Q. Determination of papaverine hydrochloride in skin and blood and the drug contents in pig skin. *Acta Acad. Med. Sin.* **2002**, 24(4), 413–417.

8. Abdel-Ghani, N.T.; Shoukry, A.F.; Issa, Y.M.; Wahdan, O.A. Spectrophotometric determination of meclozine HCl and papaverine HCl in their pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 28(2), 373–378.

9. Kasperek, R. Determination of diclofenac sodium and papaverine hydrochloride in tablets by HPLC method. *Acta Pol. Pharm.* **2008**, 65(4), 403–408.

10. El-Gindy, A. HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride. *Farmaco.* **2005**, 60(9), 745–753.

11. Si Chun, Z.; Ya Feng, Z.; Huang, X.J. Flow-injection chemiluminescence determination of papaverine using cerium(IV)-sulfite system. *Anal. Lett.* **2004**, 37(1), P.143–155.

12. Zhuang, Y.F.; Zhang, S.C.; Yu, J.S.; Ju, H.X. Flow injection determination of papaverine based on its sensitizing effect on the chemiluminescence reaction of permanganate-sulfite. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375(2), 281–286.

13. Database for drug and drug tagert info. [Electronic resource], URL: <http://www.drugbank.ca>