ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ (UV) ΛΟΓΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΓΟΥΑΪΦΕΝΕΣΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΙΝΥΛΕΦΡΙΝΗ Ή ΠΥΡΥΛΑΜΙΝΗ

Ε. Ανδρίκου, Θ. Αυγερινός, Θ. Παπανικολάου, Αικ. Μαρκοπούλου

Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής , Σχολή επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

E-mail:amarkopo@pharm.auth.gr, site:markopoulou.gr

Περίληψη

Η ανάπτυξη εύχρηστων και συγχρόνως αξιόπιστων τεχνικών ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα αποτελεί διαχρονικό αντικείμενο ερευνητικής ενασχόλησης στις φαρμακοβιομηχανίες. Η τεχνική *UV παραγώγισης φασματικών λόγων* (UV derivative ratio) θεωρείται ως μια από αυτές και στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό δυαδικών μιγμάτων γουαϊφενεσίνης με φαινυλεφρίνη ή πυρυλαμίνη.

Η γουαϊφενεσίνη είναι αποχρεμπτικό φάρμακο που χορηγείται per os για την απόχρεμψη του φλέγματος από τους αεραγωγούς σε οξείες λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού. Η συγχορήγηση της με κάποιο αντισταμινικό (πυρυλαμίνη) ή συμπαθομιμητικό (φαινυλεφρίνη) θεωρείται ως λύση επιλογής για την θεραπεία του κοινού κρυολογήματος.

Η σταθερότητα των τριών φαρμάκων ελέγχθηκε σε όξινο (0.1N HCl), αλκαλικό (0.1N NaOH), υδατικό και μεθανολικό (100% MeOH) περιβάλλον για διάστημα 0-24hrs. Ως καταλληλότερο μέσο διάλυσης επιλέχθηκε το διάλυμα μεθανόλης 50% v/v, το οποίο διασφάλιζε τη σταθερότητα των δραστικών ουσιών για μεγάλες χρονικές περιόδους. Για την εφαρμογή της μεθόδου τα φάσματα μηδενικής τάξης των πρότυπων ουσιών διαιρούνται με την παρεμβάλλουσα ουσία και παραγωγίζονται. Οι τελικές συγκεντρώσεις των τριών δραστικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη χάραξη καμπύλης αναφοράς, με τη μέθοδο των *ελαχίστων τετραγώνων,* ήταν: 10.92-54.6μg/ml για την γουαϊφενεσίνη, 9.16-45.80 μg/ml για την φαινυλεφρίνη και 8.36-41.80 μg/ml για την πυρυλαμίνη αντίστοιχα. Ο έλεγχος αξιοπιστίας της μεθόδου έγινε με την παρασκευή μικτών διαλυμάτων, άγνωστης συγκέντρωσης, και τον επαναπροσδιορισμό τους. Οι ανακτήσεις τους κυμαίνονταν από 95.0-104.0%.

Η τεχνική *παραγώγισης φασματικών λόγων* προτείνεται σε αναλύσεις ρουτίνας διότι δεν είναι χρονοβόρα, έχει χαμηλό κόστος, ενώ παράλληλα διασφαλίζει την αξιόπιστη ανάλυση των σκευασμάτων.

Λέξεις κλειδιά: παραγώγιση φασματικών λόγων UV, γουαϊφενεσίνη, φαινυλεφρίνη, πυρυλαμίνη

Abstract

The development of convenient and reliable analytical techniques for the quantitation of active substances in pharmaceutical preparations, is enduring commitment to pharmaceutical research. The derivatization technique (UV derivative ratio) is considered as one of them and in the present experimental procedure was used for quantification the binary mixtures of guaifenesin with phenylephrine and/or pyrilamine.
Guaifenesin is administered per os for the expectoration of sputum, in the airways in acute respiratory tract infections. The co-administration with an antihistamine (pyrilamine) or with a sympathomimetic (phenylephrine) is considered as a solution of choice for the treatment of common cold.
The stability of the three drugs was tested in acid (0.1N HCl), alkaline (0.1N NaOH), aqueous or methanolic (100% MeOH) solutions for up to 24 hrs. As the most appropriate dissolution medium was chosen the methanol solution 50% v / v, which ensure the stability of the active substances for long periods. According to the method, the zero-order spectra of the substances were divided by the intercalating agent and then were derivatized. The final concentrations of the three analytes, used for the calibration curve, were: 10.92-54.6mg / ml for guaifenesin, 9.16-45.80 for phenylephrine and 8.36-41.80 for pyrylamine respectively. The reliability of the method was verified by preparing mixed solutions with unknown concentration, and then their re-quantitation. Their recoveries ranged from 95.0-104.0%.
The technique is recommended for routine analysis because is not time consuming, has a low cost while ensuring a reliable analysis.

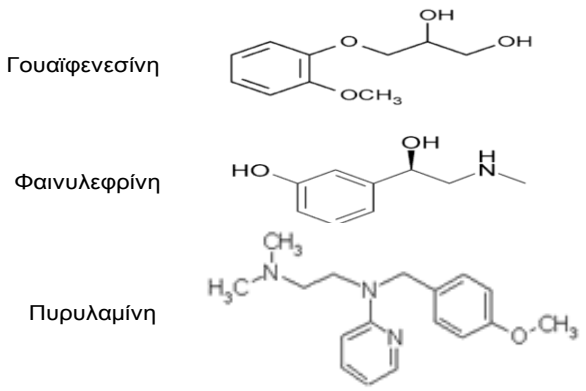
Keywords: UV derivative ratio, guaifenesin, phenylephrine, propylamine

1. Εισαγωγή

Η Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους αποτελεί μία από τις πλέον εφαρμοζόμενες αναλυτικές μεθόδους για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαρμακευτικών ή άλλων ουσιών. Έτσι, τα φασματοφωτόμετρα UV λόγω του χαμηλού κόστους και της εύκολης χρήσης τους ανήκουν στους βασικότερους εξοπλισμούς ενός σύγχρονου εργαστηρίου. Η χαμηλή εκλεκτικότητα, που οφείλεται στις παρεμβολές συστατικών του προς ανάλυση δείγματος, είναι το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου το οποίο εν μέρει μπορεί να απαλειφθεί με την εφαρμογή διαφόρων χημειομετρικών τεχνικών. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την απομάκρυνση των παρεμβολών από το φάσμα και αυτό σα συνέπεια οδηγεί στην αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Η τεχνική UV παραγώγισης φασματικών λόγων (*UV derivative ratio*) θεωρείται ως μια από αυτές και στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό δυαδικών μιγμάτων γουαϊφενεσίνης με φαινυλεφρίνη ή πυρυλαμίνη.
Η γουαϊφενεσίνη είναι αποχρεμπτικό φάρμακο που χορηγείται per os για την απόχρεμψη του φλέγματος από τους αεραγωγούς σε οξείες λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού. Η συγχορήγηση της με κάποιο αντισταμινικό (πυρυλαμίνη) η συμπαθομιμητικό (φαινυλεφρίνη) θεωρείται ως λύση επιλογής για την θεραπεία του κοινού κρυολογήματος (®Lysonex, ®Lusair, ®Mucus Relief, ®Crantex). Ο προσδιορισμός των τριών δραστικών

σε φαρμακευτικά σκευάσματα σε απλή μορφή ή σε δυαδικά συστήματα έχει επιτευχθεί με διάφορες αναλυτικές μεθόδους με επικρατέστερη αυτή της υγρής ή αέριας χρωματογραφίας (Amer et al. 2008, Dewania et al. 2014, Harsono et al 2015, Louhaichi et al 2009, Renu et al 2013).

Οι τεχνικές αυτές είναι αξιόπιστες αλλά χρονοβόρες και σχετικά υψηλού κόστους, γεγονός που επιβεβαιώνει την χρηστικότητα της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους ως μέθοδο επιλογής για αναλύσεις ρουτίνας.



Σχήμα 1: Χημικές δομές των δραστικών ουσιών

1.1.Θεωρεία της μεθόδου «παραγώγιση φασματικών λόγων»

Όταν το υπό μελέτη δείγμα αποτελείται από δύο ουσίες, Χ και Ψ, οι οποίες απορροφούν στην ίδια περιοχή απορρόφησης στο υπεριώδες, η απορρόφηση του δείγματος θα είναι ίση με το άθροισμα των απορροφήσεων καθεμίας ουσίας ξεχωριστά (Beer's Lambert):

$A_{\lambda i} = \alpha_{\chi,\lambda i} C_X + \beta_{\Psi,\lambda i} C_\Psi$ (1)

Οπου $A_{\lambda i}$ είναι η απορρόφηση του μίγματος σε μήκος κύματος λi, και $\alpha_{\chi,\lambda i}$, $\beta_{\Psi,\lambda i}$ είναι η απορροφητικότητα (absortptivity) των Χ, Ψ αντίστοιχα.

Διαιρώντας όλα τα μέλη της εξίσωσης με τον όρο $\alpha_{\chi,\lambda i} C^o_X$, προκύπτει η εξίσωση (2):

$$\frac{A_{\lambda_i}}{a_{X\lambda i} C_X^0} = \frac{A_{\lambda_i}}{a_{X\lambda i} C_X^0} * \frac{C_\Psi}{C_X^0} \quad (2)$$

η οποία μετά από παραγώγιση παίρνει την μορφή της εξίσωσης (3):

$$\frac{d}{d\lambda}\left[\frac{A_{\lambda_i}}{a_{X\lambda}C_X^0}\right]=\frac{d}{d\lambda}\left[\frac{\beta_{\Psi\lambda}}{a_{X,\lambda_i}}\right]\frac{C_\Psi}{C_X^0} \quad (3)$$

Η εξίσωση (3) είναι η θεμελιώδης μαθηματική εξίσωση για ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης καθενός από τα συστατικά του μίγματος στο διάλυμα χωρίς την παρεμβολή των υπολοίπων, καθώς μέσω αυτής καταλήγουμε σε μια γραμμική εξίσωση της μορφής y=ax+b από την οποία είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός.

2. Οργανολογία

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των υπό μελέτη διαλυμάτων έγινε με την τεχνική της Φασμοτοφωτομετρίας Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis). Συγκεκριμένα, η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις κατά την ανάπτυξη της εν λόγω μεθόδου είχε ως εξής:

- Φασματοφωτόμετρο Schimadzu UV- VIS διπλής δέσμης, τύπου UV – 2501 PC
- Πηγή εκπομπής της ακτινοβολίας λάμπα 50Watt Αλογόνου και Δευτερίου
- Υπολογιστής τύπου Pentium 3, εξοπλισμένος με το πρόγραμμα UV-PC Personal Spectroscopy Software

Οι ιδανικές συνθήκες λειτουργίας του οργάνου για την λήψη των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων και την μετέπειτα εφαρμογή της μεθόδου "derivative ratio" με την χρήση της D^1 παραγώγου ήταν:

- Ταχύτητα σάρωσης: 210 nm/min,
- Εύρος σχισμής μονοχρωμάτορα: 1.0 nm
- Διάστημα δειγματοληψίας: 0.1 nm

Στα φάσματα που λήφθηκαν εκ των μετρήσεων εφαρμόστηκε η διαδικασία της εξομάλυνσης του θορύβου (smoothing), με 17 πειραματικά σημεία, διαίρεση όλων των φασμάτων χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαιρέτη για κάθε ουσία και τέλος παραγώγισή τους, με χρήση της D^1 παραγώγου και επιλογή των παραμέτρων dλ. (Delta Wavelength) = 4 nm και scaling factor = 1.0.

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1.Μελέτη σταθερότητας

Η σταθερότητα των τριών φαρμάκων ελέγχθηκε σε όξινο (0.1N HCl), αλκαλικό (0.1N NaOH), υδατικό και μεθανολικό (100% MeOH) περιβάλλον σε τρεις διαδοχικούς χρόνους t_1=0h, t_2=6h και t_3=24h. Ως καταλληλότερο μέσο διάλυσης επιλέχθηκε το διάλυμα μεθανόλης 50% v/v, το οποίο διασφάλιζε τη σταθερότητα των δραστικών ουσιών για μεγάλες χρονικές περιόδους.

Αναλυτικότερα, από τα φάσματα απορρόφησης των ουσιών πυρυλαμίνη (Pyrilamine), φαινυλεφρίνη (Phenylephrine) και γουαϊφενεσίνη (Guaifenesin), φαίνεται ότι μόνο αυτό της pyrilamine εμφανίζει σταθερότητα στους τέσσερεις διαλύτες. Αντίθετα, η guaifenesin

μετά τις 6 ώρες παρουσιάζει αστάθεια στο υδατικό διάλυμα και το φάσμα της phenylephrine στο αλκαλικό περιβάλλον είναι σταθερό μόνο σε μήκη κύματος λ>230 nm. Από άποψη δομής και συμπεριφοράς, η pyrilamine δίνει ταινία απορρόφησης με μέγιστα λ_{max}= 248nm, και λ=313 σε MetOH, NaOH και H_2O, ενώ παρουσιάζει ελαφρύ υπερχρωμισμό στο HCl και μικρή διαφοροποίηση της ταινίας απορρόφησης.
Η φαινυλεφρίνη δίνει το κλασικό φάσμα των φαινολών (λ_{max}=213 και 273nm) σε όξινο περιβάλλον και περαιτέρω βαθυχρωμική μετατόπιση σε αλκαλικό (λ_{max}=238 και 291nm). Τέλος, το φάσμα της guaifenesin, εμφανίζει ταινία απορρόφησης με μέγιστα στα 225 και 273 nm.

3.2.Καμπύλες αναφοράς μηδενικής τάξης

Για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς (μηδενικής τάξης) των προσδιοριζόμενων ουσιών εφαρμόσθηκε η μέθοδος γραμμικής παλινδρόμησης 'Regression Analysis' και οι ευθείες χαράχτηκαν βάση της αρχής των ελαχίστων τετραγώνων (Πίνακας 1). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ακριβής καθώς το standard error ήταν <0,03 και γραμμική με R^2>0,9999.

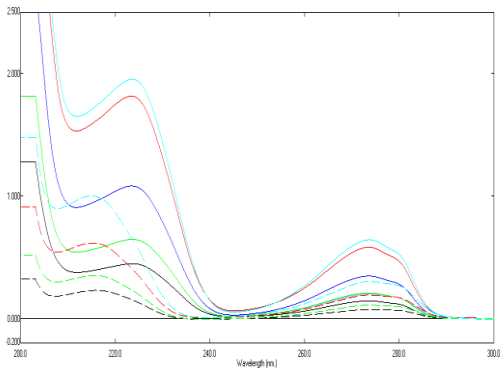
Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων δραστικών ουσιών

Guaifenesin		Phenylephrine		Pyrilamine	
y=0.0121x+0.0112 R^2*=0.9999*		*y=0.0282x+0.0313* R^2*=0.9999*		*y=0.0343x+0.0168* R^2*=0.9999*	
Απορρόφηση	Συγκέντρωση (μg/mL)	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (μg/mL)	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (μg/mL)
0.1439	10.9	0.2303	9.2	0.2681	8.4
0.2093	16.4	0.3515	13.7	0.4086	12.5
0.3472	27.3	0.6159	22.9	0.7085	20.9
0.5623	43.7	1.0034	36.6	1.1677	33.4
0.6590	54.6	1.26	45.8	1.3828	41.8

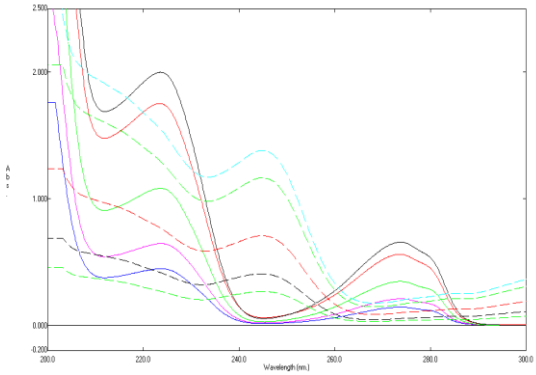
Με τη χρήση καμπύλης αναφοράς μηδενικής τάξης οι εν λόγω ουσίες δύναται να προσδιοριστούν σε σκευάσματα μόνο όταν δεν συνυπάρχουν με άλλες δραστικές ουσίες ή έκδοχα που διαθέτουν χρωμοφόρες ομάδες.

3.3. Προσδιορισμός δυαδικών μιγμάτων

Από τα φάσματα των δυαδικών δειγμάτων guaifenesin-pyrilamine και guaifenesin-phenylephrine (Σχήμα 2) είναι φανερό ότι με τη χρήση των συμβατικών μεθόδων δεν δύναται να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των ουσιών λόγω συναπορρόφησης. Για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος επιλέχθηκε η χρήση της χημειομετρικής μεθόδου «παραγώγισης φασματικών λόγων», (first derivative ratio) (Dinç et al. 2002, Markopoulou et al. 2004).



A



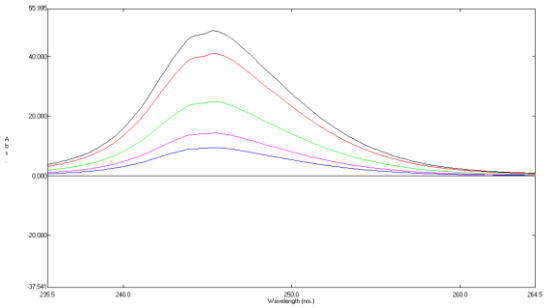
B

Σχήμα 2. Φάσματα απορρόφησης α)Guaifenesin-Phenylephrine και Β) Guaifenesin-Pyrilamine

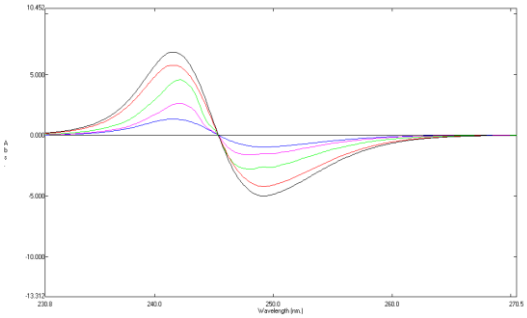
3.3.1 Ταυτόχρονος προσδιορισμός pyrilamine με guaifenesin

Για τον προσδιορισμό των δυαδικών μιγμάτων με την χρήση της μεθόδου First derivative ratio, αρχικά ελήφθησαν τα φάσματα των πρότυπων διαλυμάτων της κάθε ουσίας στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία εξομάλυνσης θορύβου (smoothing). Ακολούθησε διαίρεση του εξομαλυμένου φασμάτος της προς προσδιορισμό ουσίας με το εξομαλυμένο φάσμα της παρεμβάλλουσας. Μετά την εφαρμογή της πρώτης παραγώγου τα προκύπτοντα από την διαίρεση φάσματα συσχετίζονται (σε συγκεκριμένο λ) με τις συγκεντρώσεις των ουσιών και αναπτύσσονται καμπύλες αναφοράς.

Α. Προσδιορισμός Pyrilamine παρουσία Guaifenesin



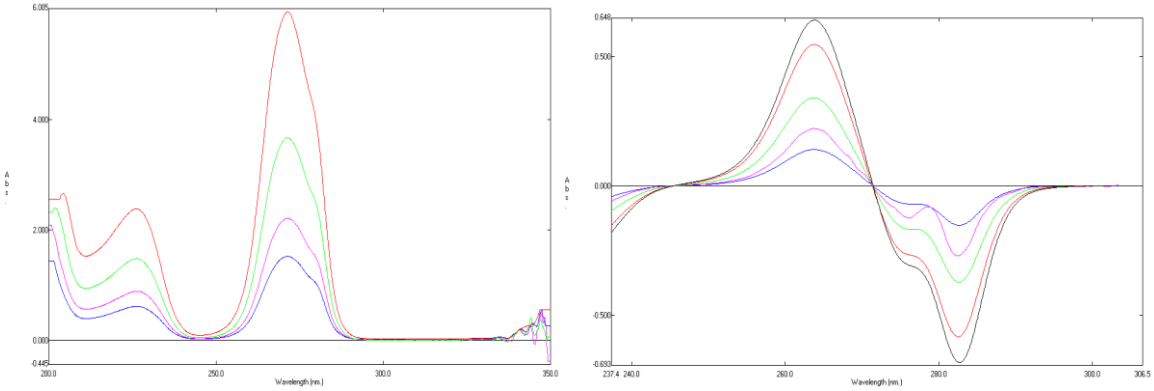
A



B

Σχήμα 3: a). Φάσματα διαιρεμένων διαλυμάτων Pyrilamine με πρότυπο διάλυμα Guaifenesin συγκέντρωσης 27.3 μg/ml b) Φάσματα πρώτης παραγώγου του διαιρεμένου φάσματος της Pyrilamine με Guaifenesin.

Β. Προσδιορισμός Guaifenesin παρουσία Pyrilamine



A B

Σχήμα 4: a) Φάσματα διαιρεμένων διαλυμάτων Guaifenesin με διάλυμα Pyrilamine συγκέντρωσης 20.9 μg/ml b)Φάσματα πρώτης παραγώγου των διαιρεμένων φασμάτων Guaifenesin

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου παρασκευάστηκαν δυαδικά μίγματα γνωστής συγκέντρωσης των δυο ουσιών και στη συνέχεια επαναπροσδιορίστηκαν (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Εκατοστιαία ανάκτηση δυαδικών δειγμάτων Guaifenesin-Pyrilamine

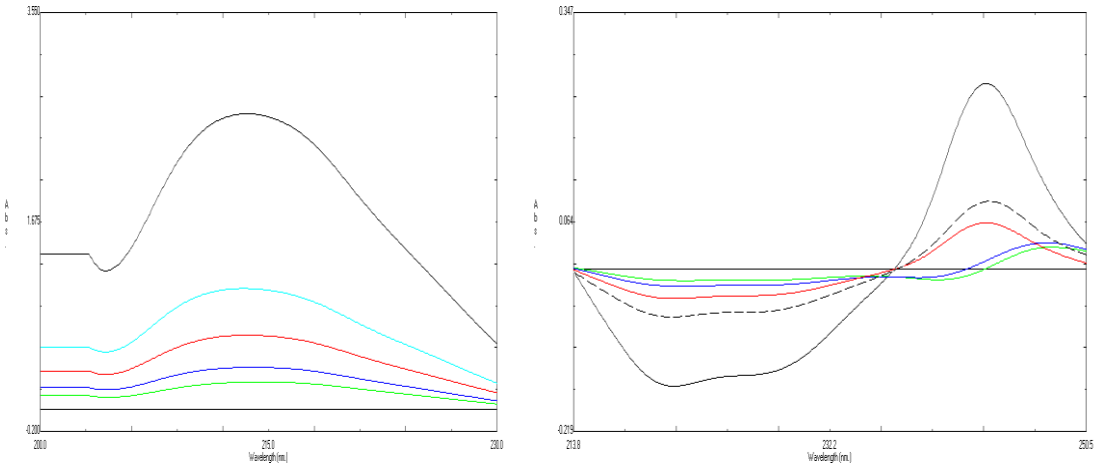
*Sample	$C_{Guaifenesin}$ (μg/mL)	C_{Real} Pyrilamine (μg/mL)	$C_{predicted}$ Pyrilamine (μg/mL)	%Recovery
Pyr2Gua2	10.92	8.4	8.2	98.2
Pyr3Gua3	16.38	12.5	12.2	97.2
Pyr2Gua5	27.3	8.36	21.0	100.5
Pyr5Gua5	27.3	20.9	21.4	102.4
Pyr10Gua2	10.92	41.8	40.0	95.7
Pyr10Gua10	54.6	41.8	40.0	95.6

*Sample	$C_{Pyrilamine}$ (μg/mL)	C_{Real} Guaifenesin (μg/mL)	$C_{predicted}$ Guaifenesin (μg/mL)	%Recovery
Pyr2Gua2	8.4	10.9	11.2	102.3
Pyr3Gua3	12.5	16.4	15.5	94.7
Pyr5Gua5	20.9	27.3	28.4	104.0
Pyr8Gua8	33.4	43.7	45.4	103.9
Pyr10Gua2	41.8	10.9	10.5	96.6
Pyr10Gua10	41.8	54.6	53.8	98.5

* Όπου Pyr: pyrilamine και Gua: guafenesin

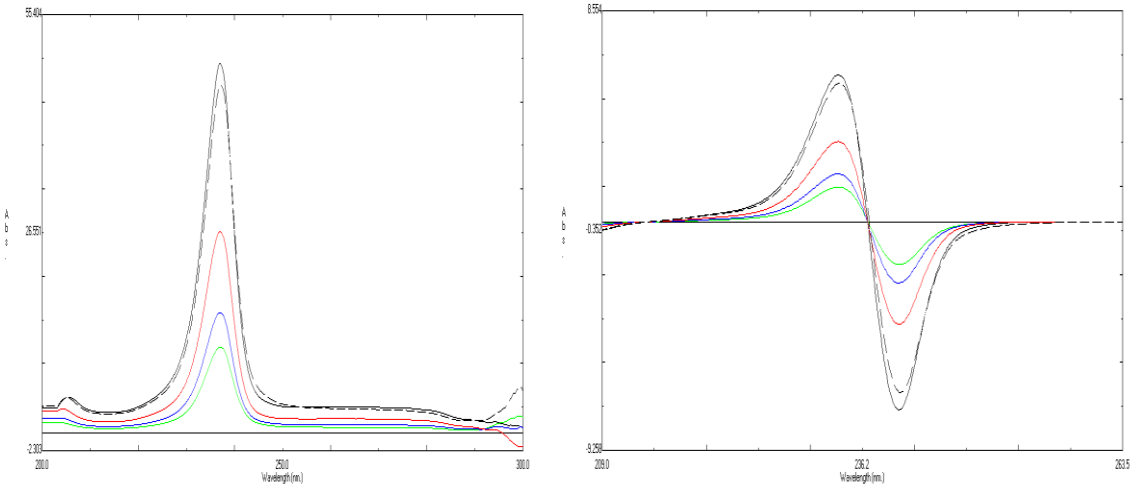
3.3.2 Ταυτόχρονος προσδιορισμός Phenylephrine με Guaifenesin

Α. Προσδιορισμός Phenylephrine παρουσία Guaifenesin



Σχήμα 5: a). Φάσματα διαιρεμένων διαλυμάτων Phenylephrine με πρότυπο διάλυμα Guaifenesin συγκέντρωσης 27.3 μg/ml b)Φάσματα πρώτης παραγώγου των διαιρεμένων φασμάτων της Phenylephrine με Guaifenesin.

Β. Προσδιορισμός Guaifenesin παρουσία Phenylephrine



Σχήμα 6: a). Φάσματα διαιρεμένων διαλυμάτων Guaifenesin με διάλυμα Phenylephrine συγκέντρωσης 22.9 μg/ml b)Φάσματα πρώτης παραγώγου των διαιρεμένων φασμάτων Guaifenesin

Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σε μικτά άγνωστα δείγματα Guaifenesin με Phenylephrine και η μέτρηση των ανακτήσεων για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Εκατοστιαία ανάκτηση δυαδικών δειγμάτων Guaifenesin-Phenylephrine

*Sample	$C_{Guaifenesin}$ (μg/mL)	C_{Real} Phenylephrine (μg/mL)	$C_{predicted}$ Phenylephrine (μg/mL)	%Recovery
Phe2Gua2	10.92	9.2	8.7	95.0
Phe3Gua3	16.38	13.7	13.1	95.3
Phe2Gua5	27.3	9.2	9.0	98.3
Phe5Gua5	27.3	22.9	23.2	101.2
Phe10Gua2	10.92	45.8	9.0	98.3
Phe10Gua10	54.6	45.8	43.5	95.1

*Sample	$C_{Phenylephrine}$ (μg/mL)	C_{Real} Guaifenesin (μg/mL)	$C_{predicted}$ Guaifenesin (μg/mL)	%Recovery
Phe2Gua2	9.2	10.92	10.6	97.5
Phe3Gua3	13.7	16.38	15.9	97.5
Phe2Gua5	9.2	27.3	26.2	95.8
Phe5Gua5	22.9	27.3	44.9	102.9
Phe10Gua2	45.8	10.92	10.6	97.5
Phe10Gua10	45.8	54.6	54.9	99.5

*Οπου Phe: phenylephrine και Gua: guafenesin

4. Συμπέρασμα

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανεύρεση μιας αξιόπιστης και εύχρηστης αναλυτικής μεθόδου προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των δραστικών ουσιών στα δυαδικά μίγματα γουαϊφενεσίνης-φαινυλεφρίνης και γουαϊφενεσίνης-πυρυλαμίνης. Η αδυναμία προσδιορισμού τους με τις συμβατικές μεθόδους φασματοφωτομετρίας οδήγησε στην εφαρμογή της χημειομετρίας και την ανάπτυξη της τεχνικής «παραγώγιση φασματικών λόγων». Κατά την εφαρμογή της μεθόδου διαπιστώθηκε ότι είναι ακριβής, επαναλήψιμη και εύχρηστη ώστε να θεωρηθεί κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας.

5. Βιβλιογραφία

Amer S. M. , Abbas S. S., Shehata M. A., and Ali N. M., “Simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, and chlorpheniramine maleate in cough syrup by gradient liquid chromatography,” Journal of AOAC International, vol. 91, no. 2, pp. 276–284, 2008.

Dewania A.P., Barika B.B. , Chipadeb V.D., Bakalb R.L., Chandewarb A.V., and Kanungoc S.K., “RP-HPLC-DAD method for the determination of phenylepherine,

paracetamol, caffeine and chlorpheniramine in bulk and marketed formulation", Arabian Journal of Chemistry, vol. 7, Issue 5, pp. 811–816, 2014.

Dinç E., Yücesoy C. , and Onur F., "Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and chemometric methods", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 28, no. 6, pp. 1091–1100, 2002.

Harsono T., Yuwono M. , and Indrayanto G., "Simultaneous determination of some active ingredients in cough and cold preparations by gas chromatography, and method validation," Journal of AOAC International, vol. 88, no. 4, pp. 1093–1098, 2005.

Louhaichi M.R., Jebali S., Loueslati M.H., Adhoum N., and Monser L., "Simultaneous determination of pseudoephdrine, pheniramine, guaifenisin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography", Talanta, vol. 78, no. 3, pp. 991-997, 2009.

Markopoulou CK., Malliou ET. , and Koundourellis J.E., "Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets", Farmaco, vol. 59, no. 8, pp. 627-636, 2004.

Renu S., Mamt K., Mukesha M., and Sunil K., "Simultaneous Determination of Chlorpheniramine Maleate, Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride in Tablet Dosage Form by High Performance Liquid Chromatography", International Journal of Drug Development and Research, vol. 5, no. 1, pp. 258- 263, 2013.