

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «РЕГИДРЕЙД ЦИНК»**

Холтураева Гулноза Миркамоловна

докторант 3 курса кафедры фармацевтической химии

Ташкентский фармацевтический институт

Республика Узбекистан, г. Ташкент

Email: s.gulin87@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0009-2312-1044>

Ганиева Хилола Гайратовна

д-р. фарм. наук., доцент,

Ташкентский фармацевтический институт

Республика Узбекистан, г. Ташкент

Старший технический консультант USP/PQM+

regulatoryuzb@gmail.com

Убайдуллаев Кудратилла Асадуллаевич

кан. хим. наук., профессор,

Ташкентский фармацевтический институт

Республика Узбекистан, г. Ташкент

Аннотация. Разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количественного определения активных веществ в многокомпонентном лекарственном препарате «Регидрейд Цинк» содержащий в своем составе глюкозу, натрия цитрат дигидрата и хлориды. Изучено влияние температурного режима хроматографической колонки, подвижной фазы, а также определена длина волны обеспечивающие разделение глюкозы, натрия цитрата и ионов хлоридов при их совместном присутствии. Разработанные условия хроматографирования для метода ВЭЖХ позволяет обеспечить оптимальное разделение активных веществ при их совместном присутствии в растворе, идентифицировать и провести оценку их количественного содержания в лекарственном препарате «Регидрейд Цинк».

Ключевые слова: регидратационный раствор, высокоэффективная жидкостная хроматография, одностадийный метод, устойчивость, подвижная фаза, контроль качества.

Введение

По данным ВОЗ (2024 г), диарея являются третьей по значимости причиной смерти детей и ежегодно уносят жизни около 443 832 детей в возрасте до пяти лет. Ежегодно во всем мире регистрируется около 1,7 миллиарда случаев диареи у детей. Диарея обычно является симптомом инфекции в кишечном тракте,

которая может быть вызвана различными бактериальными, вирусными и паразитарными организмами. Самая серьезная угроза, которую представляет диарея — это обезвоживание. Диарею следует лечить с помощью раствора для пероральной регидратации. Оральные регидратационные растворы и цинк всасывается в тонком кишечнике и восполняет воду и электролиты, сокращает продолжительность эпизода диареи на 25% и способствуют уменьшению объема стула на 30% [1,2,3].

Создание высокоэффективных многокомпонентных лекарств является одной из основных практических задач современной фармации, поэтому важна проблема контроля, связанная с точной оценкой качественного и количественного состава препаратов. Анализ многокомпонентных лекарственных средств, в состав которых входят субстанции различной природы, обычно сопряжен с определенными трудностями. В настоящее время метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является одним из основных для анализа лекарственных препаратов сложного состава [4,5].

В литературе отсутствуют методики проведения одностадийного ВЭЖХ-анализа при совместном присутствии глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов в регидратационных растворах, однако описаны способы их индивидуального определения в той или иной лекарственной форме [6].

Известно, что глюкозу в лекарственных препаратах количественно определяют методом поляриметрии [7]. Разница углов вращения испытуемого и контрольного растворов составляет угол вращения глюкоза в растворе препарата. Количественное определение натрия цитрата дигидрата в лекарственных препаратах проводят методом титрования и ВЭЖХ [8], а хлориды аргентометрическим методом анализа [9]. Недостатками данных методик является их многостадийность и, как следствие, трудоемкость, длительность и неудовлетворительная точность определения количества фармацевтических активных субстанций лекарственных средств.

Как отмечено выше, в литературе отсутствуют какие-либо известные одностадийные способы проведения ВЭЖХ-анализа регидратационных растворов при совместном определении глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов.

Целью настоящей работы является разработка одностадийной методики количественного определения активных фармацевтических субстанций многокомпонентного раствора регидратационного действия «Регидрейд Цинк» методом ВЭЖХ с обеспечением полного разделения пиков глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов.

Материалы и методы

Приготовление раствора испытуемого образца (РИО): 50 мл раствора

препарата «Регидрейд Цинк» помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм, первые 5 мл фильтрата отбрасывают.

Приготовление рабочего стандартного образца (PCO) глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов: взвешивают 0,6750 г глюкозы (безводного), 0,1450 г натрия цитрата дигидрата и 0,2206 г натрия хлорида (точные навески) и переносят в мерную колбу объемом 100 мл. Добавляют 70 мл воды и встряхивают для растворения. Полученный раствор доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 и первые 5 мл фильтрата отбрасывают.

Приготовление подвижной фазы (ПФ): в отдельных колбах растворяют 1,0 г ортофосфорной кислоты или 1,0 г перхлорной кислоты в 1000 мл воды для инъекции. Полученные растворы по отдельности фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

По 10,0 мкл РИО и PCO последовательно хроматографируют на жидкостном хроматографе «LC-40 Prominence» (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором и колонкой 8,0×300 мм заполненным сорбентом ShimPack SCR-102H с размером частиц 7 мкм, с использованием в качестве ПФ систему 0,1% раствора ортофосфорной кислоты или 0,1% перхлорной кислоты [12]. Получают не менее 5 хроматограмм каждого раствора.

Содержание глюкоза (X), в 1 мл препарата, в граммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{B_2 \times m \times 100 \times P}{B_1 \times 100 \times 50 \times 100}$$

где:

B₂ – площадь пика глюкоза на хроматограмме РИО;

B₁ – площадь пика глюкоза на хроматограмме PCO;

P – количество глюкозы в исходной субстанции, в (%);

m – масса взятого стандартного образца для анализа, в граммах;

Содержание хлоридов (X), в 1 мл препарата, в граммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_2 \times m \times 100 \times P \times 0,6067}{A_1 \times 100 \times 50 \times 100}$$

где:

A₂ – площадь пика хлоридов на хроматограмме РИО;

A₁ – площадь пика хлоридов на хроматограмме PCO;

P – количество хлоридов в исходной субстанции, в %;

m – масса взятого стандартного образца для анализа, в граммах;

Содержание натрия цитрата дигидрата (X), в 1 мл препарата, в граммах,

вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C_2 \times m \times 100 \times P}{C_1 \times 100 \times 50 \times 100}$$

где:

C_2 – площадь пика натрия цитрата дигидрата на хроматограмме РИО;

C_1 – площадь пика натрия цитрата дигидрата на хроматограмме РСО;

P – количество натрия цитрата дигидрата в исходной субстанции, в %;

m – масса взятого стандартного образца для анализа, в граммах.

Результаты и обсуждение

Проведение ВЭЖХ-анализа на хроматографе «LC-20» Shimadzu и колонке ShimPack SCR-102 H, 8,0x300 мм, 7 мкм, катионообменный H форме, позволяет получить эффективное разделение глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов. Меньший внутренний диаметр колонки позволяет уменьшить расход подвижной фазы (ПФ).

Предварительные исследования по разработке способа количественного определения АФС раствора регидратационного действия позволили установить, что оптимальными компонентами ПФ (элюент) является система, 0,1% раствора ортофосфорной кислоты, при скорости подачи потока подвижной фазы 0,6 мл/мин. Установлено, что такое ПФ обеспечивает оптимальное разделение глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов. С целью минимизации потенциально негативных факторов, связанных с использованием кислотных растворов: ортофосфорной, перхлорной, трифлуорацетатной, сульфатной кислоты, в составе ПФ был использован 0,5% раствор калия дигидрофосфата. Кроме того, использованная в заявлении способе ПФ позволяет достигнуть высокой симметрии и остроты пиков глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов.

Проведение ВЭЖХ-анализа при температуре хроматографической колонки 35⁰С, 40⁰С и 50⁰С в течение 20 мин и длине волны 190 нм, 195 нм, 200 нм, 210 нм, 240 нм обеспечивают оптимальное разделение глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов, а именно при длине волны 195 нм достигается максимальный фактор отклика между аналитическим сигналом и количеством АФС, и при 50⁰С количество теоретических тарелок хроматографии (теоретическая ступень разделения) глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлоридов достигается максимальное разделение АФС.

В результате экспериментальных исследований по определению АФС методом ВЭЖХ-анализа установлены оптимальные условия хроматографирования:

Колонка

ShimPack SCR-102 H, 8,0x300 мм, 7 мкм

ПФ	0,1% раствора ортофосфорной кислоты
Длина волны	195 нм (УФ-детектор)
Температура колонки	50 ⁰ C
Скорость потока	0,6 мл/мин
Объем введения	10 мкл
Время анализа	20 мин

По результатам проведенной хроматографии фиксируют время удерживания пика для хлоридов и натрия цитрата дигидрата около 9,6 мин и для глюкозы 12,7 мин. Стоит отметить, что время удерживания может варьироваться от системы к системе, от колонки к колонке. С скорость потока составил до 0,6 мл/мин.

Результаты хроматограммы указан ниже на рисунках 1, 2, 3 и 4.

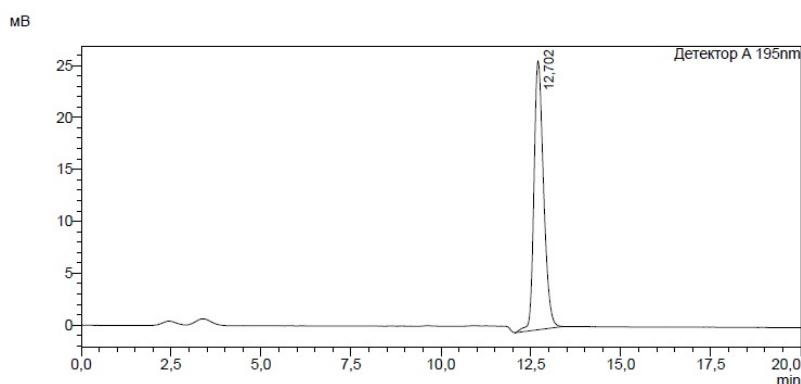


Рисунок 1. Хроматограмма раствора РСО глюкозы

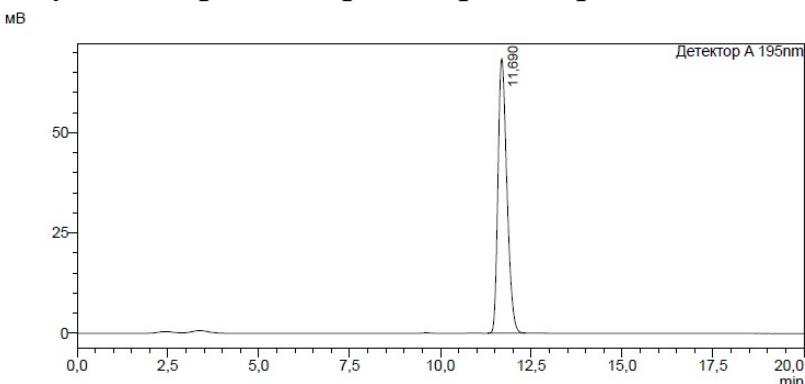


Рисунок 2. Хроматограмма раствора РСО натрия цитрата дигидрата

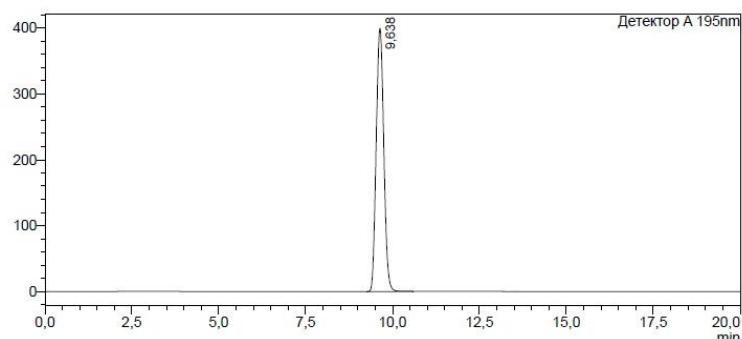


Рисунок 3. Хроматограмма раствора РСО хлоридов

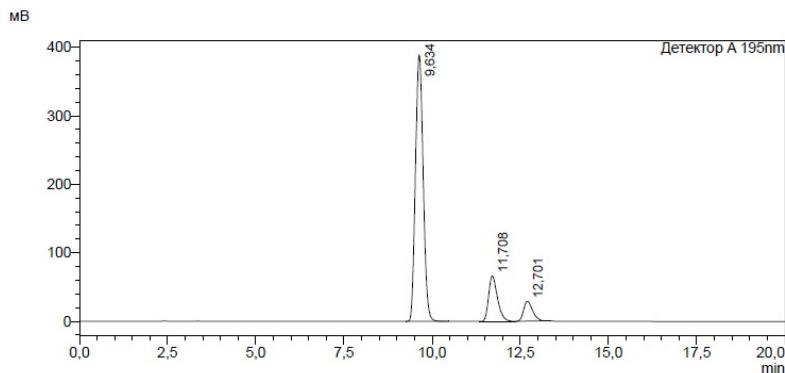


Рисунок 4. Хроматограмма раствора испытуемого образца (РИО) «Регидрейд Цинк»

Из рисунков 1-4 видно что, время удерживания пиков составляет для хлоридов и натрия цитрата дигидрата около 9,6 мин и для глюкозы 12,7 мин. Пики полученные на хроматограмме РИО «Регидрейд Цинк» совпадают со временем удерживания пиков раствора РСО глюкозы, хлоридов и дигитрат натрия цитрата.

Статистическую обработку результатов проводили согласно ГФ XV [10]. Точность методик оценивали с помощью критерия Стьюдента по результатам 5 измерений.

Таблица 1.
Метрологические характеристики результатов количественного определения активных веществ «Регидрейд Цинк»
 $(P=95\%, t(P, f)=2,78)$

Заявленные количества	13,5 мг/мл	2,9 мг/мл	2,68 мг/мл
Название образца	Глюкоза (мг/мл)	Натрия цитрата дигидрата (мг/мл)	Хлориды (мг/мл)
1	13,71	2,91	2,70
2	13,58	2,90	2,70
3	13,73	2,89	2,69
4	13,74	2,89	2,70
5	13,71	2,89	2,70
Среднее значение	13,69	2,89	2,69
Относительное стандартное отклонение (%)	0.4	0.3	0.1

Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что содержание глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлориды в препарате составляет в среднем 13,69 мг/мл, 2,89 мг/мл, 2,69 мг/мл. Относительная ошибка среднего определения глюкозы, натрия цитрата дигидрата и хлориды в препарате

составляет 0,4 %, 0,3 %, 0,1 %.

Надежность метода оценивалась путем преднамеренных изменений условий метода, как указано ниже:

- Обычные условия
- Изменение скорости потока - (скорость потока 0,55 мл/мин и 0,65 мл/мин)
- Изменение температуры колонки - (45°C и 55°C)

Критерии приемлемости:

1. Коэффициент симметрии пика (tailing factor) для глюкозы, натрия цитрат дигидрат и хлориды от первой инъекции стандартного стандартного раствора-1 должен быть в пределах 0,8–1,8.

2. Количество теоретических тарелок глюкоза, натрия цитрат дигидрат и хлориды после первой инъекции стандартного раствора должно быть не менее 2000.

3. Относительное стандартное отклонение для площади пика глюкоза, натрия цитрат дигидрат и хлориды из пяти повторных инъекций стандартного раствора должно составлять не более 2,0 % [11].

Результаты, полученные для эксперимента по устойчивости, представлены ниже в таблице 2.

Таблица 2.
Результаты исследования устойчивости метода ВЭЖХ

Параметры	Коэффициент симметрии пика (tailing factor)			Количество теоретических тарелок			Относительное стандартное отклонение		
	Глюкоза	Натрия цитрат дигидрат	Хлориды	Глюкоза	Натрия цитрат дигидрат	Хлориды	Глюкоза	Натрия цитрат дигидрат	Хлориды
При обычных условиях (специфичность)	1,314	1,339	1,103	11231	10180	8867	0,52	1,63	0,13
Низкая скорость потока (0,55 мл/мин)	1,323	1,350	1,088	11625	10729	8720	0,53	0,48	0,23
Высокая скорость потока (0,65 мл/мин)	1,327	1,353	1,118	11277	10314	8727	0,06	0,27	0,07
Низкая	1,301	1,322	1,119	11717	10545	9164	0,27	0,81	0,20

температура (45°C)									
Высокая температура (55°C)	1,326	1,346	1,090	11686	10776	8692	0,07	0,65	0,05

Было обнаружено, коэффициент симметрии пика для глюкозы, натрия цитрат дигидрат и хлориды от первой инъекции стандартного раствора составляет от 1,301 до 1,327 для глюкозы, 1,322 до 1,353 для натрия цитрат дигидрат и от 1,088 до 1,119 для хлоридов. Было обнаружено, количество теоретических тарелок пиков глюкоза, натрия цитрат дигидрат и хлориды от первой инъекции стандартного раствора составляет от 11231 до 11717 для глюкоза, 10180 до 10776 для натрия цитрат дигидрат и от 8692 до 9164 для хлориды было обнаружено, что (RSD, %) относительное стандартное отклонение для площади пика глюкоза, натрия цитрат дигидрат и хлориды из пяти повторных инъекций стандартного раствора составляет от 0,06% до 0,53% для глюкоза, 0,27 % до 1,63 % для натрия цитрат дигидрат и от 0,05 % до 0,23 % для хлориды.

Заключение.

Разработан способ количественного определения глюкозы, натрия цитрат дигидрата и ионов хлорида в пероральном регидратационном растворе «Регидрейд цинк». Разработанные условия хроматографирования позволяют провести сквозной анализ активных веществ по качественным и количественным показателям единовременно. ВЭЖХ метод анализа глюкоза, натрия цитрат дигидрат и хлориды соответствует критериям приемлемости в исследовании надежности, метод можно считать устойчивым к испытанным условиям.

Список литературы:

1. Diarrhoeal disease. WHO, 07.03.2024 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>).
2. Redkar M, Spegel C, Tesado C, Thakor P, Chatterjee A, Shinde U, Suyawanshi D. Wide variability in osmolality of reconstituted powered oral rehydratation salts due to9 disparity in the method of preparation among Indian consumers // J Appl pharm Sci, 2022; 12(06):224-229.
3. Диарея. По материалам ВОЗ // Журнал «Педиатрическая фармакология». 2013. -Т.10, -№3, -С.98-107.
4. Пшеничнов Е.А., Кондрашева К.В. Разработка и валидация методики определения подлинности и количественного содержания эноксипарина натрия в инъекционных препаратах методом ВЭЖХ//Разработка и регистрация лекарственных средств, 2023. -Т.12, -№1, -С.76-83.

5. Deshmukhe P.M., Charde M.S., Chakole R.D. A review on HPLC method development and validation //IJPPR, 2021. Vol.21, -№4. -C.66-82.
6. Патент на полезную модель. № FAP 2551, 2024 г.
7. Проект ФСП 42Уз-23832192-4514-2022 «Регидрейд Цинк» раствор для приёма внутрь.
8. Проект ФСП 42Уз-29399767-4169-2020 «Орокс» раствор для внутреннего применение 250 мл.
9. Проект ФСП 42Уз-23832192-4593-2021 «Регидрейд Цинк» раствор для приёма внутрь.
10. Государственная фармакопея РФ XV издания. 2023.
11. WHO Expert Committee on Specifications for pharmaceutical preparations. Annex 3: Guidelines on validation. Geneva, 2019: (Accessed 24 June 2023).
12. Холтураева Г.М., Ганиева Х.Г., Убайдуллаев К.А. Разработка метода ВЭЖХ в анализе многокомпонентного лекарственного препарата «Регидрейд Цинк» // Universum: медицина и фармакология : электрон. научн. журн. 2024. 12(117). URL: <https://7universum.com/ru/med/archive/item/18853> (дата обращения: 11.12.2024)