

**“НЕЙРОРУБИН” ТАРИЛГЫН ЭМЭНД ПИРИДОКСИНЫ ГИДРОХЛОРИД
ТОДОРХОЙЛОХ ӨНДӨР ИДЭВХТ ШИНГЭНИЙ ХРОМАТОГРАФИЙН АРГЫН**

БАТАЛГААЖИЛТ

*Ц.Халиунсарнай, Б.Баттулга, С.Бадамцэцэг, А.Баянмөнх, С.Цэцэгмаа, Л.Лхагва
Л. Хүрэлбаатар*

Эм Судлалын Хүрээлэн

khaliunsarnai@monos.mn

**METHOD VALIDATION OF PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE IN NEURORUBIN BY HIGH PER-
FORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

*Khaliunsarnai Ts. Battulga B, Badamtsetseg S, Bayanmunkh A, Tsetsegmaa S,
Lkhagva L, Khurelbaatar L*

Drug Research Institute

khaliunsarnai@monos.mn

Abstract

Introduction

Pyridoxine hydrochloride is least expensive supplement named as a vitamin 6¹. Pyridoxal kinase is the enzyme that produces pyridoxal phosphate which known as pyridoxine hydrochloride that occurs in the human body. Diabetes, age and neurodegenerative diseases complications can be reduced by pyridoxine hydrochloride^{2,3}. Quantification of pyridoxine hydrochloride in neurorubin as an injection form was developed by high performance liquid chromatography (HPLC) method. Further, the proposed method was validated for linearity, precision (system precision, method precision, intermediate or inter-day precision), and accuracy, stability in analytical solution, system suitability and roughness. The developed method exhibited the best results in terms of the aforesaid validation parameters. The method was found to be selective, simple, economical, accurate, reproducible, rapid and reliable for routine estimation purpose of pyridoxine hydrochloride in injection.

Goal

The aim of this study was to develop the validation method of pyridoxine hydrochloride in injection.s

Material and Methods

I) *Test Article*. As a test article neurorubin injection was produced by Tsombo Farm LLC. The standard pyridoxine hydrochloride was supplied from Sigma Aldrich Co.

II) *Reagents and Equipment*. The reagents were HPLC grade acetonitrile methanol, and purified water. Balance, and micropipette used as equipment. Shimadzu HPLC (LC20AD) was used as the analytical instrument and the analysis conditions were as follows (Table 1).

Results

The calibration curves for pyridoxine hydrochloride were made by plotting the peak area versus the concentration for each analyte using regression analysis. Each calibration curve was obtained using six levels of concentrations in the range 12.5-100 µg/mL. The linear correlation coefficient (R²) for all calibration curves was higher than 0.995 for all analytes. The LOD and LOQ for pyridoxine hydrochloride were in 15.29 µg/mL and 46.33 µg/mL, respectively.

Accuracy and precision were assessed by analyzing five sets of samples, independently prepared at low, middle and high concentrations. The RSD values of both repeatability and intermediate precision were below 1.669 % and 1.678 % the accuracy remaining between 95.25 to 102.775 %. The resulting accuracy data were satisfactory for the quantitative analysis of pyridoxine hydrochloride in neurorubin injection.

The results of summarized in table 2, 3, 4. This article presents a simple, accurate, reproducible, and thoroughly validated HPLC-based method for qualitative and quantitative analysis of pyridoxine hydrochloride, as part of the quality assessment of products containing in injection.

Key-words: Pyridoxine hydrochloride, High performance liquid chromatography, method validation

Түлхүүр үг: Пиридоксины гидрохлорид, өндөр идэвхт шингэний хроматографи, тарилга бэлдмэл, аргын баталгаажилт

Үндэслэл: Пиридоксал ба пиридоксамин нь ургамлын гаралтай бөгөөд амьтны эдэд агуулагддаг бүтээгдэхүүнд тооцогддог ^{4,5}. Пиридоксин гидрохлорид буюу витамин В₆ нь хамгийн бага үнэтэй нэмэлт бүтээгдэхүүн юм ¹. Пиридоксины гидрохлорид нь хүний биед пиридоксал киназа ферментийн тусламжтай пиридоксаль фосфат хэлбэрээр үүсгэгддэг нэгдэл бөгөөд амин хүчил, нүүрс ус, өөх тосны 100 гаруй ферментатив бодисын солилцооны урвалд коэнзим хэлбэрээр оролцдог ⁶. Чихрийн шижин, нас болон түүнээс хамааралтай мэдрэлийн өвчний үед хэрэгдэгддэг эмийн хүндрэлийг пиридоксин гидрохлоридоор бууруулж болдог^{2,3}. Нейрорубин тарилган эмэнд пиридоксин гидрохлорид нь үйлдвэрлэгчээс хамааран тодорхой хэмжээнд агуулагддаг бөгөөд манай оронд импортоор орж ирдэг бүтээгдэхүүн юм. Манай оронд импортын бүтээгдэхүүн цөөнгүй байдаг боловч тэдгээрийн идэвхт бодисыг тодорхойлох баталгаажсан химийн шинжилгээний арга байхгүй байна. Иймд бид цаашид пиридоксин гидрохлорид агуулсан бүтээгдэхүүнд олон улсын жишигт нийцсэн аргын баталгаажилт хийх шаардлагатай байна.

Зорилго

Бид энэхүү судалгааны хүрээнд Пиридоксины гидрохлорид тодорхойлох ӨИШХ-ийн аргыг боловсруулж, олон улсад хүлээн зөвшөөрөгдөхүйц шинжилгээний аргыг практикт нэвтрүүлэхийг зорив.

Материал, арга зүй

Цомбо фарм ХХК эмийн үйлдвэрт бэлтгэсэн тарилга бэлдмэлийг ашигласан. Стандарт бодис пиридоксины гидрохлорид -г Sigma Aldrich компаниас худалдан авч хэрэглэсэн. HPLC техник үзүүлэлтүүдийг хүснэгт 1 өгөв. Бүтээгдэхүүний найрлага дахь Пиридоксины гидрохлоридийг ӨИШХ-ийн дараах аргаар тодорхойлов.

Table 1.

Analytical conditions of pyridoxine hydrochloride using HPLC	
Mobile phase	Methanol : Potassium dihydrogen phosphate (pH = 4.6) /45:55/
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	20 µl
Column	Supelco inertsil C ₁₈ , 250 x 4.6 mm, 5 µm
Column oven temperature	40°C
Detector wavelength (PDA)	290 nm
Run time	10 min

Пиридоксины гидрохлорид тодорхойлох ӨИШХ-ийн арга:

Стандарт уусмал бэлтгэх: Стандарт

Пиридоксины гидрохлоридоос 0.05 г-ыг жинлэн авч, 100 мл-ийн хэмжээст колбонд хийгээд, хэмжээс хүртэл хөдөлгөөнт фазаар

сулруулна. Уг уусмалаас 1 мл-ийг хэмжин авч, 10 мл хэмжээст колбонд хийж, колбоны хэмжээс хүртэл хөдөлгөөнт фазаар сулруулна. Уусмалыг 0.45 мкм мембран шүүлтүүр (органик уусгагч шүүх зориулалттай)-ээр шүүнэ.

Дээж уусмал бэлтгэх: Нейрорубин тарилгын эмээс 1.1 мл авч, 100 мл-ийн хэмжээст колбонд хийгээд, хэмжээс хүртэл хөдөлгөөнт фазаар сулруулна. Уг уусмалаас 1 мл авч, 10 мл –ийн хэмжээст колбонд хийж хэмжээс хүртэл хөдөлгөөнт фазаар дахин сулруулна. Уусмалыг 0.45 мкм мембран шүүлтүүр (органик уусгагч шүүх зориулалттай)-ээр шүүнэ.

Аргын баталгаажилт

Үнэмшилт чанар (Accuracy) –ыг тодорхойлохдоо арга зүйд заасан дээжийн концентрацийг 100% гэж үзэн, түүнээс 50-150%-ийн ялгаатай гурван дээж уусмал бэлтгэн (50%, 100%, 150%) шинжилгээг хийсэн.

Дундаж утгын нарийвчлал (intermediate precision)-ыг давтагдах чанар ба дундаж утгын нарийвчлалаар үнэлж тодорхойлов.

Аргын нарийвчлал буюу давтагдах чанар (repeatability or method precision)-ыг тодорхойлохдоо бэлдмэлээс хоорондоо ижил концентрацитай 10 дээж бэлтгэн тооны агууламжийг тодорхойлж, дундаж утга болон тус бүрт харьцангуй стандарт хазайлтыг 1,2-т харуулав.

тооцоолов. Дундаж утгын нарийвчлалыг тодорхойлохдоо хоёр өөр эм шинжлэгч ижил багажаар өөр өөр өдөрт тооны шинжилгээг 6 давталттайгаар хийж, дундаж утга болон тус бүрт харьцангуй стандарт хазайлтыг тооцоолов.

Шугаман чанар (Linearity) –ыг ажлын стандарт уусмалын концентраци (12.5 мкг/мл)-аас 25%-200%-ийн ялгаатай 6 уусмал (25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%) бэлтгэн тус бүрийн хроматограммын пикийн талбайг концентрациас хамаарсан шулуун байгуулж, корреляцийн тогтмол (R^2)-ыг тодорхойлсон. Мөн жиших муруйд регрессийн анализ хийж, шулууны тэгшитгэлийг ашиглан уг аргын тодорхойлох хязгаар, илрүүлэх хязгаарыг тогтоов ^{7,8}.

Үр дүн, хэлцэмж

Бид судалгаандаа Америкийн Нэгдсэн улсын фармакопейн (USP 32 page 112) аргад үндэслэн хө дөлгөөнт фазын системийг сонгон тохиромжтой харьцааг олж, ӨИШХ-ийн багажны нөхцөлүүдийг өөрчлөн туршиж, туршилтын арга зүйг гарган авсан. Уг гарган авсан аргаар стандарт пиридоксины гидрохлорид болон Цомбо ХХК үйлдвэрээс гарган авсан бэлдмэлийг ӨИШХ-ийн багажинд гүйлгэсэн гүйлгэлтийн хроматограммыг зураг

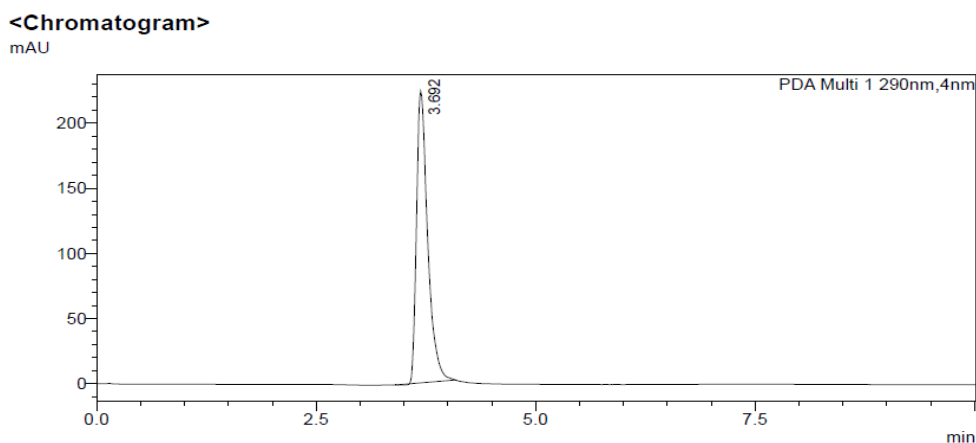
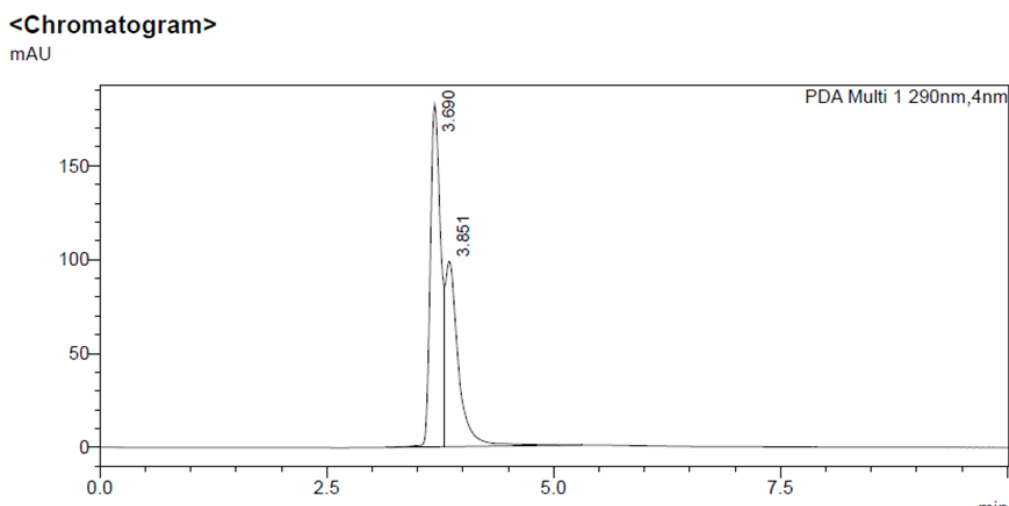


Figure 1. Chromatogram of standard pyridoxine hydrochloride (98%)



1 - Pyridoxine hydrochloride

Figure 2. Chromatogram of preparation pyridoxine hydrochloride

Стандарт пиридоксина гидрохлорид болон дээж уусмалын пикийн баригдах хугацаа 3.692-3.690 минут байгаа нь системийн таарц сайн байгааг харуулж байна. Иймд уг ӨИШХ-ийн туршилтын аргыг тохиромжтой гэж үзэн аргын баталгаажилтыг хийв. Аргын баталгаажилтыг үнэмшилт чанар, нарийвчлал, шугаман чанарыг үнэлэх арга зүйг ашиглан баталгаажуулав.

Үнэмшилт чанар (Accuracy):
Аргын үнэмшилт чанарыг тодорхойлохдоо ажлын дээж уусмалаас 50-150%-ийн ялгаатай гурван өөр концентрацитай дээжийг тус бүр гурван давталттай бэлтгэн шинжилгээг хийв. Үнэмшилт чанар тодорхойлсон үр дүнг хүснэгт 1-ээр үзүүллээ.

Table 2.

Preparation accuracy

Sample concentration, mg/ml	Result, mg/ml	Recovery, %	Mean value, %	Qualified	R.S.D %	Qualified	
50%	27.5	26.7694	97.34326	95.25602	YES	1.976	YES
	27.5	26.0525	94.73636				
	27.5	25.76432	93.68843				
	Permissible amount		90-110 %			2.00%	
100%	55	52.14995	94.81809	95.41928	YES	0.663	YES
	55	52.4483	95.36055				
	55	52.84357	96.07921				
	Permissible amount		90-110 %			2.00%	
150%	82.5	84.23119	102.0984	102.7751	YES	0.628	YES
	82.5	84.84593	102.8436				
	82.5	85.29115	103.3832				
	Permissible amount		90-110 %			2.00%	

Дээжийн шинжилгээний дүнгийн харьцангуй стандарт хазайлт (ХСХ%) 0.628%-1.97% гарч байгаа нь 2.0%-иас бага гарч байгаа учир шаардлага хангаж байна.

Нарийвчлал (Precision): Бэлдмэлд агуулагдах пиридоксины гидрохлоридны тооны

анализын нарийвчлалыг тодорхойлохдоо давтагдах чанар, дундаж утгын нарийвчлал зэрэг үзүүлэлтээр тодорхойлсон ба үр дүнг хүснэгт 2, хүснэгт 3 –т үзүүллээ.

Table 3.

Result of repeatability

Injection Number	Retention time (minute)	Peak area	Peak height
Replicate 1	3.636	1154946	155297
Replicate 2	3.683	1147635	154484
Replicate 3	3.683	1157981	157883
Replicate 4	3.698	1157979	161232
Replicate 5	3.687	1149899	160469
Replicate 6	3.691	1183888	161191
Replicate 7	3.681	1175578	162900
Replicate 8	3.683	1191777	163651
Replicate 9	3.676	1201183	160730
Replicate 10	3.681	1189903	160659
Mean (n=10)	3.6799	1171076.9	159849.6
STDEV	0.0165	19649.618	3030.644
RSD %	0.4506	1.678	1.896
Permissible amount	Not more than 2.0%		
Qualified	Yes		

Table 4.

Result of intermediate precision

№	Sample	Pyridoxine hydrochloride, mg/ml	
		First analyzer/day 1	Second analyzer/day 2
1	Preparation 1	46.392	47.555
2	Preparation 2	46.098	47.221
3	Preparation 3	46.514	47.871
4	Preparation 4	46.514	48.249
5	Preparation 5	46.189	47.796
7	Mean (n = 5)	46.341	47.738
8	RSD % (n = 10)	1.669	
9	Permissible amount (n = 10)	Not more than 2.0%	
10	Qualified	Yes	

Пиридоксины гидрохлоридийн тооны анализын давтагдах чанарыг бэлдмэлд 10 удаагийн давталттай хэмжилт хийж тодорхойлоход харьцангуй стандарт хазайлт

1.669% гарсан нь шаардлага хангасан. Мөн дундаж утгын нарийвчлалыг тодорхойлоход баригдах хугацааны харьцангуй стандарт хазайлт 0.4506%, пикийн өндрийн харьцангуй

стандарт хазайлт 1.896%, пикийн талбайн харьцангуй стандарт хазайлт 1.678% гарч шаардлага хангасан.

Шугаман чанар (Linearity): Пиридоксины гидрохлоридийн тооны анализын шугаман чанарыг ажлын стандарт

уусмалын концентраци (12.5 мкг/мл) -аас 25% - 200% ялгаатай уусмалууд бэлтгэн тус бүрийн пикийн талбайг хэмжин тодорхойллоо. Шугаман чанар тодорхойлсон үр дүнг хүснэгт 4, зураг 3 –т тус тус үзүүллээ.

Table 5.

Linearity of Standard pyridoxine hydrochloride

No	Nominal concentration of standard, µg/ml	Real concentration of standard, µg/ml	Peak area, mAU	Recovery, %
1	12.5	12.42	2579808	99.335
2	25	24.75	5274085	98.992
3	37.5	34.94	7500409	93.166
4	50	52.71	11384525	105.427
5	75	77.18	16730960	102.910
6	100	98.08	21296820	98.079
Mean (n=6)				99.652
SD				4.220
Slope				218497
Intercept				130412
SE of intercept				413262.2
SD of intercept				1012281.63

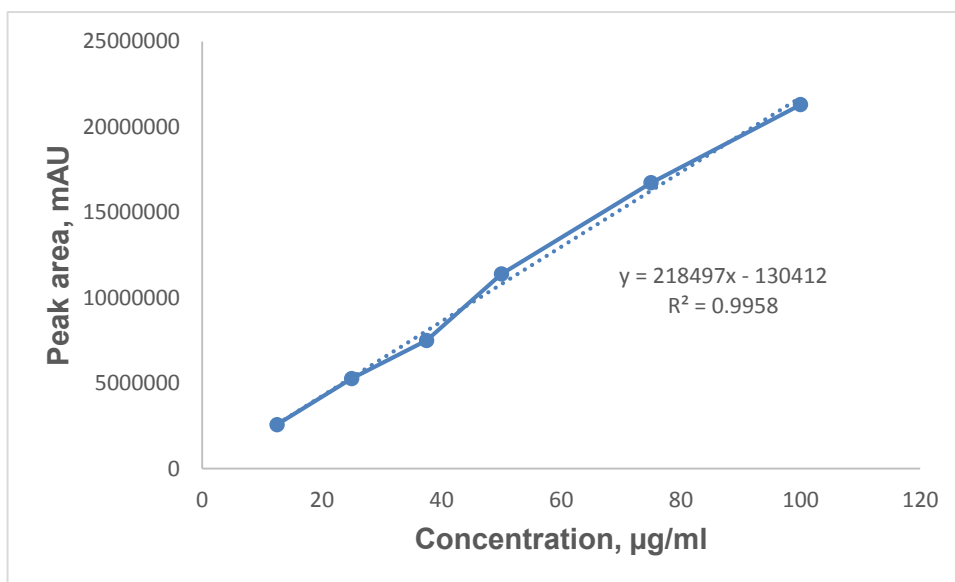


Figure 3. linearity of Standard pyridoxine hydrochloride

Дээрх үр дүнгээс харахад жиших муруйн корреляцийн коэффициент $R^2=0.9958$ байсан нь шугаман хамааралтай байгааг баталж байна. Бэлдмэлд агуулагдах Пиридоксины

гидрохлоридийн тооны тодорхойлолтонд дээрх арга зүйгээр шинжилгээ хийхэд тохиромжтой болохыг 3 үзүүлэлтээр баталлаа. Мөн илрүүлэх хязгаар (LOD) болон тодорхойлогдох

хязгаар (LOQ)-ыг жиших муруйн үр дүнгээс регрессийн анализын аргаар тооцов. Үр дүнг доорх томъёогоор үзүүлэв.

$$LOD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{S} \Rightarrow \frac{3.3 \cdot 1012281.63}{218497} = 15.29 \text{ мкг/мл}$$

Энд: – SD of intercept ; – Налуу (Slope)

Илрүүлэх хязгаарыг жиших муруйн шулууны тэгшитгэл ашиглан тооцоолж, хамгийн бага илрүүлэх концентраци 15.29 мкг/мл болохыг тогтоолоо.

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \Rightarrow \frac{10 \cdot 1012281.63}{218497} = 46.33 \text{ мкг/мл}$$

Тодорхойлогдох хязгаарыг жиших муруйн шулууны тэгшитгэл ашиглан тооцоолж, хамгийн бага тодорхойлох концентраци 46.33 мкг/мл болохыг тогтоолоо.

Дүгнэлт

Нейрорубин тарилга хэлбэрийн эмэнд пиридоксины гидрохлоридийг (Shimadzu CMB-20 A, Diode array detector Shimadzu SPD-20A) загварын өндөр идэвхт шингэний хроматографийн багажинд тохируулан United States Pharmacopeia 32 -с гаргасан зааврын дагуу аргын баталгаажилт хийв. Уг ажлын хүрээнд хийгдсэн үнэмшилт чанар, дундаж утгын нарийвчлал, давтагдах чанар, шугаман чанарын тус, харьцангуй стандарт хазайлт нь шаардлага хангасан. Үүнээс үзэхэд тухайн арга нь Нейрорубин тарилга хэлбэрийн эмэнд пиридоксины гидрохлоридийг тодорхойлох боломжтой нь батлагдав.

Ном зүй

1. Haas EM, Staying Healthy With Nutrition, . 21st Century Edition: The Complete Guide to Diet & Nutritiona Medicine. Random House LLC. 2006.
2. Insel P, Tuner R.E. & Ross, D.,. Water-soluble vitamins. *Nutrition Research*. 2002;3:422-455.
3. Lambrecht G, Braun, K., Damer, S., Ganso,

M., Hildebrandt, C., Ullmann, H & Nickel, P Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Current pharmaceutical design*. 2002;8(26):2371-2399.

4. Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a bio-marker in neurodegenerative diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Mar 2011;49(3):435-441.
5. Sampson DA, Oconnor DK. Analysis of B-6 Vitamers and Pyridoxic Acid in Plasma, Tissues and Urine Using High-Performance Liquid-Chromatography. *Nutrition Research*. Mar 1989;9(3):259-272.
6. Toney MD. Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Jan 2005;433(1):279-287.
7. Register UFF. Text on Validation of Analytical Procedures. *Definitions and Terminology*. 1995;60.
8. Register UFF. International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures. *Methodology*. 1997;62.

Уншин танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
ЭЗУ-ын доктор, дэд профессор
Б.Цэрэндолгор