

УДК 615.074: 615.21/.26: 615.451.35



РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ В СПРЕЕ НАЗАЛЬНОМ

М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения Высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет».

357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Получено 12.04.2021

Принята к печати 15.08.2021

Перспективным подходом к лечению аллергического ринита может стать интраназальное введение блокаторов H_1 -гистаминовых рецепторов. Ранее был разработан оригинальный состав спрея назального, содержащего фексофенадина гидрохлорид и аммония глицирризинат, демонстрирующий высокий уровень терапевтической эффективности.

Цель состояла в разработке и валидации методики количественного определения активных фармацевтических субстанций фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее для интраназального введения.

Материалы и методы. В ходе разработки и валидации методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее назальном применялся метод высокоэффективной жидкостной хроматографии: хроматограф с УФ детектором DionexUltimate 3000 с колонкой Luna C18 (2), содержащей в качестве сорбента октадецилсиликагель с зернением 5 мкм. Анализ и валидационные процедуры выполнялись в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

Результаты. Исследование показало, что для количественного определения при совместном присутствии фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината оптимальным является градиентный режим элюирования с составом подвижной фазы 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата и метанолом (45:55), который обеспечивал разделение компонентов смеси в интервале 20 минут. Валидационная оценка показала, что разработанная методика отвечает всем критериям валидности по показателям: правильность, прецизионность, специфичность и линейность в аналитической области.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиентном режиме элюирования с составом подвижной фазы 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата с метанолом (45:55) для количественного определения активных фармацевтических субстанций – фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в составе перспективного спрея назального для лечения аллергического ринита.

Ключевые слова: аллергический ринит; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; фексофенадина гидрохлорид; аммония глицирризинат

Список сокращений: АР – аллергический ринит; АФС – активная фармацевтическая субстанция; УФ – ультрафиолетовый; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации; х. ч. – химический чистый

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCES IN NASAL SPRAY

M.V. Larskiy, A.E. Pozdnyakova, Z.D. Khadzhieva, D.I. Pozdnyakov

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin Av., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Received 12 April 2021

Accepted 15 Aug 2021

Для цитирования: М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков. Разработка и валидация методики количественного определения активных фармацевтических субстанций в спрее назальном. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):266-277. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-266-277

© М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков, 2021

For citation: M.V. Larskiy, A.E. Pozdnyakova, Z.D. Khadzhieva, D.I. Pozdnyakov. Development and validation of methods for quantitative determination of active pharmaceutical substances in nasal spray. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):266-277. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-266-277

Intranasal administration of H_1 -histamine receptor blockers may be a promising approach to the treatment of allergic rhinitis. Earlier, an original composition of a nasal spray containing fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate and demonstrating a high level of therapeutic efficacy, was developed.

The aim of the study was to develop and validate a method of the quantitative determination of active pharmaceutical ingredients fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate in a spray for intranasal administration.

Materials and methods. During the development and validation of the method of the fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate quantitative determination in a nasal spray, the method of high performance liquid chromatography was used: a Dionex Ultimate 3000 UV chromatograph with a Luna C18 column (2) containing octadecylsilicagel with a 5 μ m grain size as a sorbent. The analysis and validation procedures were performed in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, the XIVth edition.

Results. The study showed that for the simultaneous quantitative determination of fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate, the optimal elution regime is a gradient mode with a mobile phase containing 50 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution with methanol (45:55), which ensured the separation of the components in the 20 minutes interval. The validation procedures showed that the developed methodology correspond to all the criteria of validity in terms of the following indicators: correctness, precision, specificity and linearity in the analytical area.

Conclusion. The obtained results indicate the possibility of using the method of high-performance liquid chromatography in a gradient elution mode with a mobile phase of the composition of a 50 mmol/L solution of potassium dihydrogen phosphate with methanol (45:55) for the simultaneous quantitative determination of active pharmaceutical ingredients – fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate as parts of a promising nasal spray for the allergic rhinitis treatment.

Keywords: allergic rhinitis; quantification; high performance liquid chromatography; fexofenadine hydrochloride; ammonium glycyrrhizinate

Abbreviations: AR – allergic rhinitis; API – active pharmaceutical ingredient; UV – ultraviolet; HPLC – high performance liquid chromatography; SPRF – State Pharmacopoeia of the Russian Federation

ВВЕДЕНИЕ

Аллергический ринит (АР) является наиболее распространенным заболеванием, возникающим в следствие гиперчувствительности организма к различного рода антигенам. АР занимает шестое место в мире среди наиболее распространенных atopических заболеваний, приводящих к снижению показателей качества жизни и ухудшению производительности труда, что негативно отражается на экономической составляющей деятельности человека и требует значительных финансовых вложений, как личных, так и со стороны системы здравоохранения [1, 2]. В тоже время, количество людей, у которых ежегодно диагностируют аллергический ринит, неуклонно возрастает, что делает разработку эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения и профилактики аллергического ринита актуальным, как для самих пациентов, так и для государства в целом [3].

Имеющиеся в настоящее время фармакологические подходы к терапии АР подразумевают устранение основных симптомов заболевания. С этой целью применяются как интраназальные, так и системные лекарственные препараты (ЛП). ЛП, вводимые интраназально, представлены глюкокортикостероидами, которые являются препаратами первой линии. Также возможно введение в носовую полость деконгестантов и антихолинэргических средств. Системно в лечении АР применяют H_1 -гистаминолитики, стабилизаторы мембран тучных клеток и антагонисты лейкотриеновых рецепторов [4]. Несмотря на достаточный уровень эффективности, применение интраназальных глюкокортикостероидов в ряде случаев не обеспечи-

вает необходимые требования фармакобезопасности, что ограничивает их повседневное использование [5]. В связи с этим принимались неоднократные попытки преодолеть существующие недостатки глюкокортикостероидов, в том числе путем создания рациональных комбинаций ЛП или их полная замена на средства альтернативной фармакотерапевтической группы. В последнем случае актуальным является интраназальное применение блокаторов H_1 -рецепторов гистамина, при этом с целью увеличения терапевтического эффекта возможна разработка синергетических комбинаций на основе неседативных гистаминоблокаторов и других антиаллергических средств [6]. Перспективным направлением в коррекции аллергического ринита можно считать применение комбинации H_1 -гистаминоблокатора последнего поколения – фексофенадина гидрохлорида и противоаллергического средства растительного происхождения – аммония глицирризината в составе разрабатываемого назального спрея [7].

Фексофенадин является активным метаболитом терфенадина – противоаллергического средства антигистаминного действия. Фексофенадин относится к блокаторам H_1 -гистаминовых рецепторов длительного действия последнего поколения, лишенных выраженного седативного эффекта. Фексофенадин имеет благоприятный профиль лекарственной безопасности, превосходящий таковой у антигистаминных препаратов первого поколения. Отсутствие седативного эффекта позволяет использовать препарат различным группам населения, в том числе в рабочее время, так как не нарушается концентрация внимания, моторные и когнитивные функции [8–12].

Аммония глицирризинат является одним из эф-

фективных лекарственных средств, получаемых из экстракта солодки голой. Аммонийная соль глицирризиновой кислоты обладает доказанной противовоспалительной, антиноцицептивной, противоаллергической, противовирусной, антиоксидантной, иммуностимулирующей и гепатопротекторной активностью [13–17].

В ранее проведенном исследовании, посвященном экспериментальной оценке фармакологической эффективности комбинации активных субстанций фексофенадина гидрохлорид + аммония глицирризинат (вспомогательные вещества: бензалкония хлорид, полиэтиленоксид – 400, пропиленгликоль) при АР у животных, было установлено, что интраназальное введение изучаемого состава по выраженности действия было сопоставимо с глюкокортикостероидами, что подразумевает актуальность дальнейшего исследования данной комбинации с позиции фармацевтического анализа [18].

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики количественного определения активных фармацевтических субстанций фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее для интраназального введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые объекты и материалы для проведения анализа

Основываясь на существующих в настоящее время тенденциях в области качественного и количественного анализа фармакологически активных соединений, а также на особенностях фармацевтического анализа соединений, схожих по структуре (терфенадин и глицирризиновая кислота соответственно) с целевыми – фексофенадина гидрохлоридом и аммония глицирризинатом в данном исследовании нами был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [19, 20]. В работе в качестве объектов были использованы: субстанция аммония глицирризината (содержание 99,4%, ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия); субстанция фексофенадина гидрохлорида (содержание 101,6%, Инд – Свифт Лабораториз Лимитед, Индия); стандартные образцы фексофенадина гидрохлорида (Sigma – Aldrich, США); стандартные образцы аммония глицирризината (Sigma – Aldrich, США); ацетонитрил; вода для хроматографии; метанол (квалификации UHPLC Grade; Panreac, Испания), калия дигидрофосфат х. ч. Разработку методики проводили при помощи оборудования: хроматограф DionexUltimate 3000 (Thermo Scientific, США), снабженный УФ-детектором UVD-3000, колонкой Luna C18 (2) размером 150 × 4,6 мм (зернение октадецилсиликагеля – 5 мкм) (Phenomenex, США); центрифуга ОПН – 3.02 (Россия); весы аналитические Сартогосм, ЛВ 210-а (Россия).

Температура исследуемых образцов составляла 20°C, температура хроматографической колонки –

30°C, поддерживалась термостатом. Объем пробы составлял 20 мкл, вводился с помощью автосамплера. Детектирование проводили спектрофотометрически при длине волны 234 нм.

Методы количественного анализа активных фармацевтических субстанций (АФС)

Количественный анализ АФС разрабатываемого спрея для интраназального введения проводили согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»¹.

Приготовление растворов стандартных образцов

Приготовление растворов стандартных образцов проводили следующим образом: точную навеску стандартного образца (около 30 мг для фексофенадина гидрохлорида и около 10 мг для аммония глицирризината) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляли около 5 мл смеси метанола и 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата (55:45), растворяли при перемешивании, после чего объем колбы доводили до метки. Переносили 2 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл, после чего доводили объем до метки тем же растворителем. Перед введением растворы фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (Phenomenex, США), отбрасывая первые порции фильтрата.

Приготовление испытуемого раствора

Приготовление испытуемого раствора: переносили 2 мл лекарственного средства в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли до метки смесь метанола и 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата (55:45), перемешивали и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (Phenomenex, США), отбрасывая первые порции фильтрата (испытуемый раствор).

Расчет содержания фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в лекарственном средстве в мг/мл проводили по формуле:

$$C_x = \frac{S_x \times a_{CT} \times P \times W_x \times V_{CT}}{S_{CT} \times V_x \times W_{CT} \times W_{CT2} \times 100}, \quad (1)$$

где: C_x – содержание определяемого компонента, мг/мл; S_x – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме испытуемого раствора, мАУ×мин; S_{CT} – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме стандартного раствора, мАУ×мин; V_x

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

– объем аликвоты лекарственного средства, мл; $V_{ст}$ – объем аликвоты раствора стандартного образца, мл; $a_{ст}$ – навеска стандартного образца, мг; P – содержание вещества в стандартном образце, %; W_x – объем мерной колбы, взятой для разведения лекарственного средства, мл; $W_{ст1}$, $W_{ст2}$ – объемы мерных колб, взятых для разведения раствора стандартного образца, мл.

Расчет содержания компонентов лекарственного средства относительно заявленного проводили по формуле:

$$X = \frac{C_x \times 100}{L}, \quad (2)$$

где: X – содержание определяемого вещества относительно заявленного, %; C_x – содержание определяемого вещества, мг/мл; L – заявленное содержание вещества в спрее назальном, мг/мл.

Приготовление растворов для валидационной оценки «линейность»

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 0,0300 г стандартного образца фексофенадина гидрохлорида, растворяли при перемешивании в 6 мл смеси метанола и 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата (55:45), после чего объем колбы доводили до метки той же смесью. Переносили в мерные колбы вместимостью 25 мл по 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8 мл полученного раствора, объем доводили до метки тем же растворителем.

Приготовление растворов для валидационной оценки по показателю «правильность» и «аналитическая область»

Модельная смесь была приготовлена с содержанием фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в 60% относительно заявленного в спрее (0,18 г фексофенадина гидрохлорида и 0,06 г аммония глицирризината на 100 мл лекарственного средства). Далее проводили анализ полученного раствора в соответствии с предлагаемой методикой. Параллельно помещали по 2 мл раствора полученной модельной смеси в мерные колбы вместимостью 25 мл и отдельно вносили добавки по 0,4; 0,8 и 1,2 мл 0,3% раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида и 0,1% раствора стандартного образца аммония глицирризината до получения уровней концентрации 80%; 100% и 120% относительно номинального. После этого объем колбы доводили до метки подвижной фазой с соотношением компонентов на начало анализа, каждое разведение повторяли трехкратно.

Статистическая обработка данных

Результаты исследований обрабатывали статистическими методами, используя программный пакет Microsoft Excel v 13.0 с расширенными возможностями статистического анализа данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината при совместном присутствии в спрее назальном

Нашей задачей явилась разработка ВЭЖХ-методики количественного определения активных фармацевтических субстанций в спрее назальном. В литературе отсутствует методика ВЭЖХ-анализа при совместном присутствии фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината, однако описаны способы их индивидуального определения [21–24].

Предварительные исследования по разработке и оптимизации методики количественного определения АФС спреями назального противоаллергического действия, позволили установить, что оптимальным водным компонентом подвижной фазы, дополнительно подавляющего ионизацию, является раствор калия дигидрофосфата в концентрации 0,05–0,1 моль/л с рН 4,5–4,8. Наблюдали отсутствие выраженной разницы при использовании 0,05 М – 0,1 М раствора калия дигидрофосфата, а также с целью минимизации потенциально негативных факторов, связанных с использованием солевых буферных растворов, в дальнейшем использовали 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата.

Экспериментальное изучение хроматографического поведения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в смесях 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата с метанолом позволили сделать вывод о том, что метанол и его смеси с водой легко растворяли компоненты лекарственного препарата². Дрейф базовой линии, свойственный градиентному элюированию, не оказывал влияния на учет результатов разделения. Для сокращения времени анализа, улучшения разделения и уменьшения вязкости подвижной фазы, температура хроматографической колонки была повышена до 30°C. Оптимизированные условия хроматографического определения представлены в таблице 1.

Типичная хроматограмма спреями назального представлена на рисунке 1.

Параллельно проводили хроматографирование растворов стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида, аммония глицирризината, а также растворов вспомогательных веществ в составе спреями назального (бензалкония хлорида, полиэтиленоксида – 400, пропиленгликоля) и подвижной фазы. В предлагаемых условиях хроматографического определения осуществляется достоверное разделение компонентов в пределах 20 минут при некотором дрейфе базовой линии, свойственном градиентному режиму элюирования.

² Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

Таблица 1 – Условия хроматографического определения

| Время, мин | Режим элюирования | |
|------------|-------------------|--|
| | Метанол, % | 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата, % |
| 0 | 55 | 45 |
| 10 | 55 | 45 |
| 30 | 95 | 5 |

Таблица 2 – Характеристики пиков АФС на хроматограммах спрея назального

| Компонент спрея | Хроматографические характеристики | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|--|
| | Время удерживания (t_R), мин | Фактор асимметрии (A_s) | Разрешение (R_s) | Эффективность (число теоретических тарелок, N) |
| Фексофенадина гидрохлорид | 6,2±0,2 | не более 1,2 | не менее 1,5 | 2800 |
| Аммония глицирризинат | 16,4±0,2 | не более 1,4 | не менее 1,5 | 30000 |

Таблица 3 – Характеристики пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината на хроматограммах растворов стандартных образцов

| Компонент спрея | Хроматографические характеристики | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------|--|
| | Время удерживания (t_R), мин | Фактор асимметрии (A_s) | Разрешение (R_s) | Эффективность (число теоретических тарелок, N) |
| Фексофенадина гидрохлорид | 6,2±0,2 | не более 1,4 | не менее 1,5 | 2900 |
| Аммония глицирризинат | 16,4±0,2 | не более 1,3 | не менее 1,5 | 31000 |

Таблица 4 – Оценка воспроизводимости площадей пиков на хроматограммах стандартных растворов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината

| Определяемый компонент | Повторность инъекции, n | Площадь пика, мАУ×мин | Расчет RSD, % |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|---|
| | | | |
| Фексофенадина гидрохлорид | 1 | 33,12 | $\bar{X} = 33,16$ $S^2 = 0,005667$ $SD = 0,07528$ $RSD = 1,25\%$ |
| | 2 | 33,26 | |
| | 3 | 33,08 | |
| | 4 | 33,24 | |
| | 5 | 33,18 | |
| | 6 | 33,10 | |
| Аммония глицирризинат | 1 | 8,13 | $\bar{X} = 8,12$ $S^2 = 0,002417$ $SD = 0,04916$ $RSD = 0,82\%$ |
| | 2 | 8,04 | |
| | 3 | 8,12 | |
| | 4 | 8,18 | |
| | 5 | 8,16 | |
| | 6 | 8,10 | |

Таблица 5 – Исходные данные для оценки линейности методики в отношении фексофенадина гидрохлорида

| № п/п | Концентрация раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида, % | Площадь пика, мАУ×мин (среднее значение из трех последовательных инъекций) |
|-------|--|--|
| 1 | 0,0144 | 19,90 |
| 2 | 0,0192 | 28,10 |
| 3 | 0,0240 | 33,16 |
| 4 | 0,0288 | 39,98 |
| 5 | 0,0336 | 48,26 |

Таблица 6 – Исходные данные для оценки линейности методики в отношении аммония глицирризината

| № п/п | Концентрация раствора стандартного образца аммония глицирризината, % | Площадь пика, mAU×мин (среднее значение из трех последовательных инъекций) |
|-------|--|--|
| 1 | 0,0048 | 5,01 |
| 2 | 0,0064 | 6,18 |
| 3 | 0,0080 | 8,12 |
| 4 | 0,0096 | 9,04 |
| 5 | 0,0112 | 10,45 |

Таблица 7 – Результаты оценки прецизионности методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината (уровень повторяемости)

| Компонент | S пика, mAU × мин | Найдено, мг/мл | Метрологические характеристики |
|---------------------------|-------------------|----------------|---|
| Фексофенадина гидрохлорид | 32,91 | 2,98 | $\bar{x} = 2,92$ |
| | 31,86 | 2,88 | $S^2 = 0,00188$ |
| | 32,13 | 2,91 | $SD = 0,04336$ |
| | 31,76 | 2,87 | $RSD = 1,48\%$ |
| | 32,27 | 2,92 | $\Delta\bar{x} = \pm 0,05$ |
| | 32,76 | 2,96 | $\varepsilon = \pm 1,56\%$ |
| | | | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 2,92 \pm 0,05$ мг/мл |
| Аммония глицирризинат | 8,36 | 1,03 | $\bar{x} = 1,00$ |
| | 8,02 | 0,99 | $S^2 = 0,002657$ |
| | 7,44 | 0,92 | $SD = 0,05154$ |
| | 8,52 | 1,05 | $RSD = 5,14\%$ |
| | 7,86 | 0,97 | $\Delta\bar{x} = \pm 0,05$ |
| | 8,56 | 1,05 | $\varepsilon = \pm 5,40\%$ |
| | | | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1,00 \pm 0,05$ мг/мл |

Примечание: Площадь пика раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида = 33,16 mAU×сек; площадь пика раствора стандартного образца аммония глицирризината = 8,12 mAU×сек

Таблица 8 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината

| Фексофенадина гидрохлорид | | | | | |
|--|----------------|-------------------|----------------|---|---|
| Аналитик 1 | | Аналитик 2 | | Метрологические характеристики | |
| S пика, mAU × мин | Найдено, мг/мл | S пика, mAU × мин | Найдено, мг/мл | Аналитик 1 | Аналитик 2 |
| 32,91 | 2,98 | 32,64 | 2,96 | | |
| 31,86 | 2,88 | 33,42 | 3,03 | $\bar{x} = 2,92$ | $\bar{x} = 2,98$ |
| 32,13 | 2,91 | 33,04 | 3,00 | $S^2 = 0,00188$ | $S^2 = 0,001987$ |
| 31,76 | 2,87 | 32,08 | 2,91 | $SD = 0,04336$ | $SD = 0,04457$ |
| 32,27 | 2,92 | 33,12 | 3,01 | $RSD = 1,48\%$ | $RSD = 1,49\%$ |
| 32,76 | 2,96 | 32,54 | 2,95 | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 2,92 \pm 0,05$ мг/мл | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 2,98 \pm 0,05$ мг/мл |
| $t_{\text{выч}} = 2,04 < t(95\%; 10)$; $F_{\text{выч}} = 1,06 < F(95\%; 5; 5)$ – различия между полученными результатами случайны | | | | | |
| Аммония глицирризинат | | | | | |
| Аналитик 1 | | Аналитик 2 | | Аналитик 1 | |
| S пика, mAU × мин | Найдено, мг/мл | S пика, mAU × мин | Найдено, мг/мл | Аналитик 2 | Аналитик 1 |
| 8,36 | 1,03 | 8,84 | 1,08 | | |
| 8,02 | 0,99 | 8,56 | 1,04 | $\bar{x} = 1,00$ | $\bar{x} = 1,02$ |
| 7,44 | 0,92 | 8,12 | 0,99 | $S^2 = 0,002657$ | $S^2 = 0,003107$ |
| 8,52 | 1,05 | 8,92 | 1,09 | $SD = 0,05154$ | $SD = 0,055737$ |
| 7,86 | 0,97 | 7,49 | 0,91 | $RSD = 5,15\%$ | $RSD = 5,45\%$ |
| 8,56 | 1,05 | 7,84 | 0,95 | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1,00 \pm 0,05$ мг/мл | $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1,02 \pm 0,06$ мг/мл |
| $t_{\text{выч}} = 0,64 < t(95\%; 10)$; $F_{\text{выч}} = 1,17 < F(95\%; 5; 5)$ – различия между полученными результатами случайны | | | | | |

Примечание: Аналитик 1: площадь пика раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида = 33,16 mAU×сек; площадь пика раствора стандартного образца аммония глицирризината = 8,12 mAU×сек; Аналитик 2: площадь пика раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида = 33,04 mAU×сек; площадь пика раствора стандартного образца аммония глицирризината = 8,21 mAU×сек.

Таблица 9 – Схема приготовления растворов модельной смеси с добавками растворов стандартных образцов АФС

| Определяемый компонент | Внесено в виде модельной смеси, мг | Внесено добавки стандартного образца, мг | Суммарное расчетное содержание компонента после разведения мг/мл | Уровень концентрации относительно номинального, % |
|---------------------------|------------------------------------|--|--|---|
| Фексофенадина гидрохлорид | 3,6 | 1,2 | 0,192 | 80 |
| | 3,6 | 2,4 | 0,240 | 100 |
| | 3,6 | 3,6 | 0,288 | 120 |
| Аммония глицирризинат | 1,2 | 0,4 | 0,064 | 80 |
| | 1,2 | 0,8 | 0,080 | 100 |
| | 1,2 | 1,2 | 0,096 | 120 |

Таблица 10 – Результаты оценки правильности методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината

| Внесено добавки, мг | Найдено добавки, мг | Открываемость, % | Характеристики, рассчитанные по значению открываемости |
|---------------------------|---------------------|------------------|--|
| Фексофенадина гидрохлорид | | | |
| 1,20 | 1,26 | 104,84 | $\bar{x} = 100,52\%$ SD = 3,76 RSD = 3,74% |
| 1,20 | 1,15 | 95,74 | |
| 1,20 | 1,18 | 98,07 | |
| 2,40 | 2,29 | 95,39 | |
| 2,40 | 2,44 | 101,69 | |
| 2,40 | 2,52 | 104,95 | |
| 3,60 | 3,69 | 102,54 | |
| 3,60 | 3,53 | 98,07 | |
| 3,60 | 3,72 | 103,36 | |
| Аммония глицирризинат | | | |
| 0,4 | 0,36 | 90,00 | $\bar{x} = 95,79\%$ SD = 7,51 RSD = 7,84% |
| 0,4 | 0,34 | 85,00 | |
| 0,4 | 0,36 | 90,00 | |
| 0,8 | 0,82 | 102,50 | |
| 0,8 | 0,85 | 106,25 | |
| 0,8 | 0,78 | 97,50 | |
| 1,2 | 1,14 | 95,00 | |
| 1,2 | 1,09 | 90,83 | |
| 1,2 | 1,26 | 105,00 | |

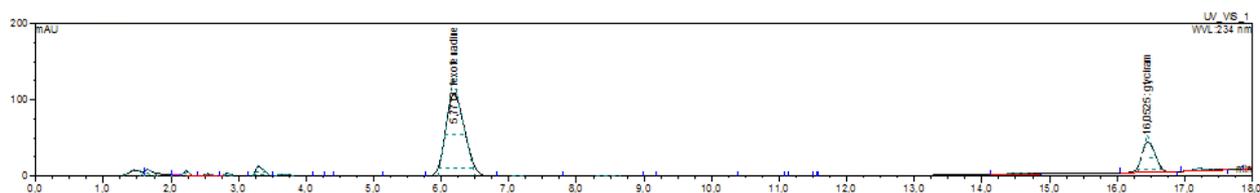


Рисунок 1 – Хроматограмма испытуемого раствора

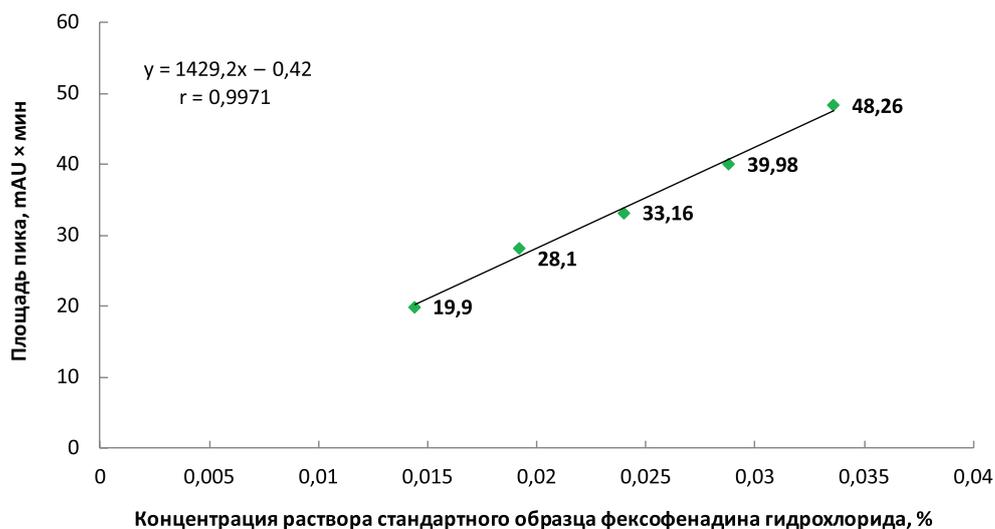


Рисунок 2 – График зависимости площади пика фексофенадина гидрохлорида от его концентрации

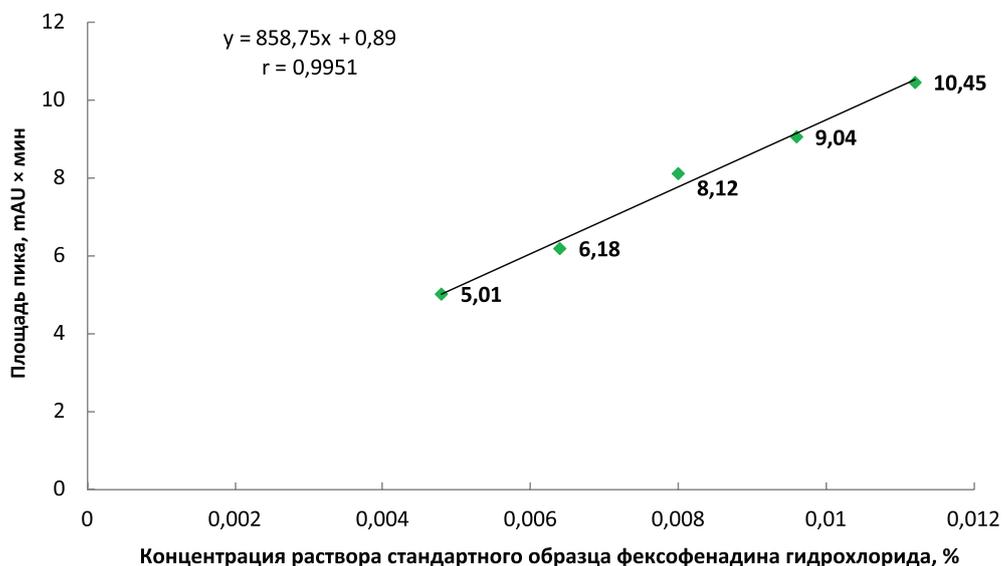


Рисунок 3 – График зависимости площади пика аммония глицирризината от его концентрации

Для оценки пригодности хроматографической системы последовательно анализировали в шестикратной повторности растворы спрея назального и стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината, определяя время удерживания, факторы асимметрии, разрешение и эффективность хроматографической системы.

Основные характеристики пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината на хроматограммах раствора спрея назального и растворов стандартных образцов представлены в таблицах 2 и 3.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что времена удерживания двух основных пиков на хроматограмме раствора спрея назального совпадают с таковыми для пиков на хроматограммах растворов стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината.

По площадям пиков, полученных при анализе шести последовательных инъекций растворов

стандартных образцов, проводили расчёт величины относительного стандартного отклонения (RSD). Результаты представлены в таблице 4.

Как следует из представленных результатов, относительное стандартное отклонение площадей пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината, полученных при повторных введениях одних и тех же стандартных растворов, не превышает 2%, что отвечает критериям пригодности хроматографической системы.

Таким образом, характеристики пиков на хроматограммах как раствора спрея назального, так и растворов стандартных образцов отвечают общепринятым параметрам пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам определяемых веществ – не ниже 2000 теоретических тарелок, факторы асимметрии пиков находятся в пределах от 0,8 до 1,5; относительное стандартное отклонение площадей пиков определяемых веществ не превышает 2%.

Валидационная оценка разработанной методики

Критерием оценки аналитической методики служит ее валидационная оценка. Валидацию методики ВЭЖХ – анализа для количественного определения компонентов спрея назального проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания для решения практических вопросов осуществления валидационных процедур руководствовались литературными данными³.

Специфичность методики определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее назальном подтверждалась соответствием времен удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора и пиков растворов стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината. Анализ модельной смеси, состоящей из вспомогательных веществ спрея назального, подтвердил отсутствие посторонних хроматографических пиков в областях выхода пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината⁴.

Линейность в отношении фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината устанавливали с использованием растворов стандартных образцов. Диапазон концентраций растворов включал предполагаемую аналитическую область методики – от 80 до 120% каждого компонента⁵.

Растворы хроматографировали в вышеописанных условиях в трехкратной повторности, результаты представлены в таблице 5.

Полученные данные использовали для построения графика зависимости площади пика от концентрации фексофенадина гидрохлорида (рисунок 2).

Линейный регрессионный анализ полученных результатов методом наименьших квадратов позволил установить, что зависимость площади пика фексофенадина гидрохлорида от его концентрации линейна и описывается уравнением $y = 1429(\pm 264,2) \times x - 0,42$; коэффициент корреляции составляет 0,9971, а свободный член уравнения является статистически незначимым, что имеет важное значение для подтверждения правильности методики.

Линейность методики в отношении аммония глицирризината проводили аналогичным образом. Растворы для хроматографирования получали разбавлением исходного 0,1% раствора стандартного образца аммония глицирризината. Результаты определения представлены в таблице 6.

Калибровочный график, построенный по полученным данным, представлен на рисунке 3.

Анализ полученной зависимости показал, что она описывается линейным уравнением вида $y = b \times$

$x + a$, где $b = 858,75 \pm 204,59$. Свободный член уравнения равен 0,89, однако его статистическая значимость отсутствует. Коэффициент корреляции равен 0,9951, что соответствует предъявляемым требованиям ($\geq 0,98$)⁶.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной линейности методики определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината.

Прецизионность методики оценивали путем анализа образца спрея назального в шестикратной повторности (уровень повторяемости). Для оценки внутрилабораторной прецизионности анализ испытуемого образца проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования. Результаты оценки прецизионности представлены в таблицах 7 и 8.

Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной прецизионности предлагаемой методики количественного определения компонентов разрабатываемого спрея назального на уровнях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности.

Установлено, что среднее содержание фексофенадина гидрохлорида в исследуемом образце спрея назального составляет $2,92 \pm 0,05$ мг/мл (97% от заявленного; относительная погрешность определения $\pm 1,56\%$); аммония глицирризината $1,00 \pm 0,05$ мг/мл (100% от заявленного; относительная погрешность определения $\pm 5,4\%$).

Учитывая то, что спрей назальный является многокомпонентным, правильность методики проверяли с использованием метода добавок⁷.

Схема получения растворов с добавками представлена в таблице 9.

Результаты определения правильности методики представлены в таблице 10.

Как следует из полученных результатов, открываемость внесенных добавок фексофенадина гидрохлорида находилась в интервале от 95 до 105%, аммония глицирризината – от 85 до 106,25% при величине RSD не более $\pm 3,74\%$ и $\pm 7,84\%$ соответственно, что соответствует предъявляемым требованиям⁸. Таким образом, предлагаемая методика характеризуется удовлетворительной правильностью.

Аналитический диапазон методики относительно номинальной концентрации определяемых веществ в спрее назальном составил от 80% до 120%.

Известно, что метод высокоэффективной жид-

³ Валидация аналитических методик для производителей лекарств / Под ред. В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.

⁴ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁵ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁶ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁷ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁸ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

костной хроматографии наряду с другими методами, все чаще используется при проведении как качественного, так и количественного анализа активных фармацевтических субстанций. Особую актуальность данный метод приобретает в ходе анализа комбинаций фармакологически активных соединений, представленных в одной лекарственной форме. Как указывает Ibrahim F. A., et al. (2019), используя высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ-детектированием можно успешно проводить идентификацию и количественное определение активных компонентов в комбинациях моксифлоксацина (синтетическое антибактериальное средство группы фторхинолонов) с глюкокортикостероидами, предназначенными для системного применения – дексаметазоном и преднизолоном. Причем в данном исследовании авторами использовался оригинальный подход из области «зеленой химии» без использования токсичных органических растворителей: в качестве элюента в изократическом режиме определения использовалась смесь этанол:вода в соотношении 90:10 [25].

В другом исследовании, проведенном авторским коллективом Al-Sanea M. M. et al (2021), показано, что метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет успешно количественно определять активные субстанции в широко распространенных комбинациях антигипертензивных препаратов: гидрохлоротиазид+олмесартана; медоксомил и гидрохлоротиазид+фозиноприл-натрий. Стоит отметить, что в данной работе изократический режим определения с подвижной фазой дигидрофосфат калия + ортофосфорная кислота (pH=3) с добавлением ацетонитрила и метанола позволял не только качественно и количественно определять целевые соединения, но и идентифицировать ряд специфических примесей, например, хлоротиазид, который является продуктом реакции дегидрирования гидрохлоротиазида [26].

Учитывая широкую распространенность метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также его высокие аналитические характеристики, неудивительно, что высокоэффективная жидкостная хроматография распространена в фармацевтическом анализе лекарственных препаратов противоаллергического действия и их комбинаций. Так, Shamshad H., et al., (2021), показано, что возможна успешная идентификация и количественное определение цетиризина в присутствии хлорохина и пириметамина, с применением изократического режима элюирования смесью метанол:вода (70:30) и УФ-детекцией [27]. Аналогично, Shamshad & Mirza (2021), продемонстрировали возможность определения цетиризина в присутствии диклофенака натрия [28]. Лоратадин может быть успешно идентифицирован в комбинации с псевдоэфедрином при использовании в качестве элюента смеси метанол:вода (90:10) в изократическом режиме [29].

Кроме того, высокоэффективная жидкостная

хроматография позволяет разделять вещества, обладающие противоаллергическими свойствами от их метаболитов (в том числе проявляющих фармакологическую активность), что было показано Sebaity & Ziedan (2019). В данной работе авторы идентифицировали и определили количественно лоратадин и его активный метаболит дезлоратадин (который также является антиаллергическим препаратом, блокирующим H₁-рецепторы гистамина) при элюировании смесью метанол + ортофосфорная кислота (85:15) в изократическом режиме и детекцией УФ-спектрофотометрическим блоком [30].

Известны методики качественного и количественного определения фексофенадина гидрохлорида в одной лекарственной форме с монтелукастом натрия и амброксола гидрохлоридом в изократическом режиме элюирования смесью метанол:вода (70:30) и УФ-детекцией [31].

Таким образом, на основании литературных данных в настоящем исследовании для качественного и количественного определения активных субстанций фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. В ходе работы было показано, что в силу различной растворимости целевых субстанций, изократический режим элюирования не позволяет достичь оптимального разделения компонентов при продолжительности анализа менее 30 минут, что определило использование градиентного режима. Стоит отметить, что подобные обстоятельства замены режима анализа были описаны в литературе. Так Leistner & Holzgrabe (2021) при анализе примесей к субстанции баклофена использовали градиентный режим, поскольку существующие примеси для данного вещества представлены труднорастворимыми цвиттер-ионами [32]. Аналогично анализировались 11 примесей субстанции ивабрадина [33] и комбинации фармакологически активных соединений парацетамола и метионина [34].

Дальнейший ход исследования показал, что разработанная методика анализа является воспроизводимой и отвечает всем требованиям валидности, что особенно важно в анализе комбинаций лекарственных средств. Как указывает Narula & Pal (2021), валидационная оценка методик анализа является необходимым шагом в создании рациональных методов анализа лекарственных препаратов и занимает одно из ведущих мест в ходе их разработки [35]. Известны случаи, когда оптимальные методики анализа (диазепам, метформин) не отвечали требованиям валидности и, соответственно, не могли быть использованы для практического применения [36]. В этой связи разработанная методика совместного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее назальном противоаллергического действия является пригодным аналитическим инструментом фармацевтического анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществлен подбор оптимальных условий и разработана методика определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината с помощью ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования. Результаты валидационной оценки показали, что разработанная методика соответствует всем валидационным параметрам – является правильной, прецизионной, специфичной и линейной в аналитической области, что подтверждает ее применимость

для подтверждения количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в лекарственном средстве. Экспериментально установлено, что при ВЭЖХ – анализе среднее содержание фексофенадина гидрохлорида в разработанном спрее назальном противоаллергического действия составляет $2,92 \pm 0,05$ мг/мл (относительная погрешность определения $\pm 1,56\%$), аммония глицирризината – $1,00 \pm 0,05$ мг/мл (относительная погрешность определения $\pm 5,40\%$).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках проекта, поддержанного Стипендиальной программой Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (конкурс СП-1044.2019.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Ларский – проведение экспериментальной части работы, подготовка предварительного варианта рукописи; А.Е. Позднякова – обзор литературных источников по теме исследования, проведение экспериментальной части работы, подготовка предварительного варианта рукописи; З.Д. Хаджиева – разработка концепции исследования, утверждение окончательного варианта рукописи; Д.И. Поздняков – статистическая обработка полученных результатов, подготовка предварительного варианта рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Zuberbier T., Lotvall J., Simoens S., Subramanian S.V., Church M.K. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA (2) LEN review // *Allergy*. – 2014. – Vol. 69. – No.10. P. 1275–1279. DOI: 10.1111/all.12470.
- Gulhane C. A., Khadabadi S. S., Atram S. C. Analytical method development and validation for simultaneous estimation of some drugs in pharmaceutical dosage form // *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2019. – Vol. 9, No.3. – P. 107–112. DOI: 10.5958/2231-5675.2019.00020.6.
- Sakalgaonkar A.A., Mirgane S.R., Pawar R.P. Validated LC Method, with a Chiral Mobile Phase, for Separation of the Isomers of Fexofenadine Hydrochloride // *Chromatographia*. – 2008. – Vol. 68. – P. 143–146. DOI: 10.1365/s10337-008-0667-6.
- Sur D.K., Plesa M.L. Treatment of Allergic Rhinitis. *AmFamPhysician* // 2015. – Vol. 92, No.11. – P. 985–92.
- Vatti R.R., Ali F., Teuber S., Chang C., Gershwin M.E. Hypersensitivity reactions to corticosteroids // *Clin Rev Allergy Immunol*. – 2014. – Vol. 47, No.1. – P. 26–37. DOI: 10.1007/s12016-013-8365-z.
- Kakli H.A., Riley T.D. Allergic Rhinitis // *Prim Care*. 2016. – Vol. 43, No.3. – P. 465–75. DOI: 10.1016/j.pop.2016.04.009.
- Smith S.M., Gums J.G. Fexofenadine: biochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and its unique role in allergic disorders // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. – 2009. – Vol. 5, No. 7. – P. 813–22. DOI: 10.1517/17425250903044967.
- Huang C.Z., Jiang Z.H., Wang J., Luo Y., Peng H. Antihistamine effects and safety of fexofenadine: a systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials. // *BMC pharmacology & toxicology*. – 2019. – Vol. 20, No.1. – P. 72. DOI: 10.1186/s40360-019-0363-1.
- Iriarte Sotés P., Armisén M., Usero-Bárcena T. Efficacy and Safety of Up-dosing Antihistamines in Chronic Spontaneous Urticaria: A Systematic Review of the Literature // *J Investig Allergol Clin Immunol*. – 2021. – Vol. 31, No.4. – P. 282–291. DOI: 10.18176/jiaci.0649.
- Phinyo P., Koompawichit P., Nochaiwong S., Tovanabuttra N., Chiewchanvit S., Chuamanochan M. Comparative Efficacy and Acceptability of Licensed Dose Second-Generation Antihistamines in Chronic Spontaneous Urticaria: A Network Meta-Analysis // *J Allergy Clin Immunol Pract*. – 2021. – Vol. 9, No.2. – P. 956–970.e57. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.08.055.
- Ellis A.K., Murrieta-Aguttes M., Furey S., Picard P., Carlsten C. Effect of fexofenadine hydrochloride on allergic rhinitis aggravated by air pollutants // *ERJ Open Res*. – 2021. – Vol. 7, No.2. – P. 00806–2020. DOI: 10.1183/23120541.00806-2020.
- Everardo P.G., Magdalena G.S., Maria Elena G.P., Vanessa C.M., Gabriela S.C. Bioavailability assessment of fexofenadine and montelukast in a fixed-dose combination tablet versus the components administered simultaneously // *Allergol Immunopathol (Madr)*. – 2021. – Vol. 49, No.4. – P. 15–25. DOI: 10.15586/aei.v49i4.89.
- Schröfelbauer B. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling // *The Biochemical journal*. – 2009. – Vol. 421, No.3. – P. 473–82. DOI: 10.1042/BJ20082416.
- Murray M.T. Glycyrrhiza glabra (Licorice) // *Textbook of Natural Medicine*. – 2020. – P. 641.
- Langer D., Czarczynska-Goslinska B., Goslinski T. Glycyrrhetic acid and its derivatives in infectious diseases // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 29, No.3. – P. 118–123. DOI: 10.1515/cipms-2016-0024.
- Maione F., Minosi P., di Giannuario A. Long-lasting

- anti-inflammatory and antinociceptive effects of acute ammonium glycyrrhizinate administration: pharmacological, biochemical, and docking studies // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No.13. – P. 2453. DOI: 10.3390/molecules24132453.
17. Yang R., Yuan B.C., Ma Y.S., Zhou S., Liu, Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb // *Pharmaceutical biology*. – 2017. – Vol. 55, No.1. – P. 5–18. DOI: 10.1080/13880209.2016.1225775.
 18. Pozdnyakov D.I., Khadzиеva Z.D., Pozdnyakova A.E., Zagorskaya N.S. Antiallergic effect of new combined nasal aerodisperse system in the conditions of experimental allergic rhinitis // *Biomedical and Pharmacology Journal*. – 2019. – Vol. 12, No.1. – P. 453–461. DOI: 10.13005/bpj/1660.
 19. Liu Y., Wang X., Yu J., Guo X. Chiral separation and molecular simulation study of six antihistamine agents on a coated cellulose tri-(3, 5-dimethylphenylcarbamate) column (Chiralcel OD-RH) and its recognition mechanisms // *Electrophoresis*. 2021. – Vol. 1, No.14–15. – P. 1461–1472. DOI: 0.1002/elps.202100033.
 20. Cai S. H., Zhao H. C., Jia M., Zhao X. L., et.al. Quality evaluation of fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* pieces by HPLC fingerprint and multicomponent quantitative analysis // *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2021. – Vol. 46, No.1. – P. 118–124. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20201022.306.
 21. Maher H. M., Sultan M. A., Olah I. V. Development of validated stability-indicating chromatographic method for the determination of fexofenadine hydrochloride and its related impurities in pharmaceutical tablets // *Chemistry Central journal*. – 2011. – Vol. 5, No.1. – P. 76. DOI: 10.1186/1752-153X-5-76.
 22. Хаджиева З.Д., Чумакова В.А., Губанова Л.Б. Разработка методики количественного определения фексофенадина в геле с использованием метода ВЭЖХ // *Вестник Росздравнадзора*. – 2016. – № 2. – С. 67–71.
 23. Хаджиева З.Д. Определение глицирризиновой кислоты в сырье и препаратах солодки голой методом ВЭЖХ // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2006. – Т. 13, №3. – С. 188–190.
 24. Хаджиева З.Д., Чумакова В.А., Губанова Л.Б. Разработка методики количественного определения фексофенадина в субстанции спектрофотометрическим методом // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. – 2015. – № 22, №219. – С. 158–163.
 25. Ibrahim F. A., Elmansi H., Fathy M. E. Green RP-HPLC method for simultaneous determination of moxifloxacin combinations: investigation of the greenness for the proposed method // *Microchemical Journal*. – 2019. – Vol. 148. – P. 151–161. DOI: 10.1016/j.microc.2019.04.074.
 26. Al-Sanea M.M., Abdelgawad M.A., Alharbi K.S., Adly S.M., et al. Simultaneous analysis of several antihypertensive drugs in different combinations: Application for determination of drug degradation products and process impurities // *Microchemical Journal*. – 2021. – Vol. 166. – P. 106203. DOI: 10.2174/1573412914666180716161557
 27. Shamshad H., Sayqal A., Zeb J., Mirza A. Z Simultaneous determination of chloroquine and pyrimethamine with cetirizine in an active form and human serum by RP-HPLC // *Journal of Chromatographic Science*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 18. DOI: 10.1093/chromsci/bmab018.
 28. Shamshad H., Mirza A.Z. Application of RP-HPLC method for the simultaneous determination of cetirizine in the presence of quinolones // *Futur J Pharm Sci*. – 2021. – Vol. 7. – P. 117. DOI: 10.1186/s43094-021-00270-y.
 29. Reid I.O.A., Gadkariem E.A. Simultaneous determination of pseudoephedrine and loratadine in syrups by HPLC using cation exchange column and experimental design optimization // *The Pharma Innovation*. – 2017. – Vol. 6, No.3. – P. 244.
 30. Sebai M.M., Ziedan N.I. Developing a High-performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Loratadine and its Metabolite Desloratadine in Human Plasma // *Current drug metabolism*. – 2019. – Vol. 20, No.13. – P. 1053–1059. DOI: 10.2174/1389200220666191125095648.
 31. Sharma K., Bhatia R., Anghore D., Singh V., et al. Development and validation of UV-spectrophotometric and RP-HPLC methods for simultaneous estimation of fexofenadine hydrochloride, montelukast sodium and ambroxol hydrochloride in tablet dosage form // *Analytical Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 8, No.6. – P. 829–843. DOI: 10.1080/22297928.2018.1465470.
 32. Leistner A., Holzgrabe, U. Impurity Profiling of Baclofen Using Gradient HPLC–UV Method // *Chromatographia*. – 2021. DOI: 10.1007/s10337-021-04079-y.
 33. Tomić J., Djajić N., Agbaba D., Otašević B., et al. Robust optimization of gradient RP HPLC method for simultaneous determination of ivabradine and its eleven related substances by AQbD approach // *Acta Chromatographica*. – 2021. DOI: 10.1556/1326.2021.00885.
 34. Ibrahim H.H., Merey A.M., Saad, A.S. Dual-mode gradient HPLC and TLC densitometry methods for the simultaneous determination of paracetamol and methionine in the presence of paracetamol impurities // *Journal of AOAC International*. – 2021. DOI:10.1556/1326.2021.00885.
 35. Narula P., Pal B. A comprehensive review of method development by HPLC // *World Journal of Pharmaceutical Research*. – 2021. – Vol. 10, No.6. – P. 1839–1858. DOI: 10.20959/wjpr20216-20698.
 36. Singh R. HPLC method development and validation—an overview // *Journal of Pharmaceutical Education & Research*. – 2013. – Vol. 4, No.1. – P. 26–33.

АВТОРЫ

Ларский Михаил Владимирович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. E-mail: larsky.mikhail@gmail.com

Позднякова Анастасия Евгеньевна – аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. E-mail: techno.nastya2015@yandex.ru

Хаджиева Зара Джамалеевна – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0001-9724-1799. E-mail: Zara-farm@mail.ru

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0002-5595-8182. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru