Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

J Chem Good Trad Med, Volume 4, Issue 1, 2025 Chemistry of Goods

YUSSX-USULIDA INSULIN PREPARATI TARKIBIDAGI M-KREZOLNI ANIQLASH

Mohira Uygunbek qizi Otabekova
Andijon davlat tibbiyot instituti Farmatsevtika fakulteti talabasi
https://orcid.org/0009-0007-8758-9215

Marufjon Jumanazarovich Jalilov
Qo'qond Universiteti Andijon Filiali Tibbiy va biologik kimyo kafedrasi dotsenti, PhD
https://orcid.org/0000-0003-1128-497X

Mashkhura Usmanovna Atabekova
Qo'qond Universiteti Andijon Filiali Tibbiy va biologik kimyo kafedrasi Assistenti
https://orcid.org/0009-0002-0014-9916
E-mail: atabekovamashxuraxon@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol4.iss1.2025.407

Kalit so'zlar:
xromatografiya, kolonka, m-krezol, insulin

Annotatsiya

Mazkur maqolada insulin preparatidagi *m*-krezolni tahlil qilish uchun YuSSX usulidan foydalanish jarayoni ko'rib chiqiladi. *M*-krezolni aniqlashda optimal erituvchilar va sharoitlar, masalan, C_{18} kolonkasida pH 2-3 bo‘lgan eritmalar tanlandi. Tajribalar natijalari eng samarali elyuent sifatida H_3PO_4 va asetonnitrilning 0,1% eritmasini ko'rsatdi.

Havola uchun

Otabekova, M. U. qizi, Jalilov, M. J., & Atabekova M. U. YuSSX-USULIDA INSULIN PREPARATI TARKIBIDAGI M-KREZOLNI ANIQLASH. Tovarlar Kimyosi Va Xalq Tabobati Jurnali, 4(1). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol4.iss1.2025.407

Kirish. Xromatografiya XX asrning eng buyuk ilmiy kashfiyotlaridan biri hisoblanadi va kimyo, sanoat, tibbiyot, ekologiya, atom energiyasi va farmatsevtika sohalarining rivojlanishiga sezilarli ta'sir ko'rsatdi. Ushbu usul yordamida moddalarni ajratish va tahlil qilish imkoniyatlari sezilarli darajada kengaydi, bu esa turli sohalarda ilmiy-tekshirish va ishlab chiqarish jarayonlarini yaxshilashga imkon berdi. Xromatografik usullar rivojlanishda davom etmoqda, va bugungi kunda olimlar ham an'anaviy, ham yangi usullarni takomillashtirib, innovatsion texnologik yechimlarni yaratmoqdalar. Ushbu maqolada muallif ikkita o'zaro bog'liq vazifani qo'yadi. Bir tomondan, M.J. Jalilov tomonidan taklif etilgan m-krezolni insulin preparatida aniqlash uchun yuqori samarali suyuq xromatografiya (YuSSX) usulining ishlab chiqilishi. Ikkinchi tomondan, xromatografiyaning rivojlanishini keng yoritishga urinish qilingan, yangi innovatsion yo'nalishlar va yechimlar, shuningdek, o'z ahamiyatiga qaramay, hozirda cheklangan qo'llanilayotgan an'anaviy usullarni ta'kidlab o'tishgan.

Gaz xromatografiyasi m-krezolning aniq va nozik tahlilini amalga oshirishda keng qo‘llaniladi. Ushbu metodda, namuna gazli fazaga aylantirilgach, xromatografik kolonka orqali ajratiladi va detektor yordamida tahlil qilinadi. Kolonkada mavjud bo‘lgan statik faza namuna komponentlarini turli tezliklarda ajratib, ularning tarkibidagi moddalarning konsentratsiyasini aniqlashga yordam beradi. Gazli xromatografiya metodining asosiy afzalliklari yuqori sezgirlik va tezlikda tahlil qilish imkoniyatidir. Biroq, bu metodning ba'zi kamchiliklari ham mavjud. Masalan, namuna tayyorlash jarayoni ba'zida murakkab bo‘lib, maxsus usullarni talab qilishi mumkin. Shuningdek, ba'zi moddalarning xromatografik kolonka orqali ajratilishi qiyin bo‘lishi mumkin, bu esa tahlil natijalarining aniqligiga ta'sir qilishi mumkin.

Biroq, m-krezolni aniq dorilarda, masalan, insulin preparatida tahlil qilish usullari haqida gap ketganda, an'anaviy metodlar, masalan, yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (YuSSX), ham muhim rol o'ynaydi [6,7,8,9]. M-krezolni bunday preparatlarda tahlil qilish usulini ishlab chiqishda teskari fazali YuSSX variantini ishlatish taklif qilingan, chunki m-krezol past qutbli modda bo'lib, bu esa qutbli erituvchilarni ishlatishni talab qiladi. Ajratishni optimallashtirish uchun C18 kolonkalari va pH 2-3 bo'lgan erituvchilar ishlatish tanlangan, bu esa m-krezol va boshqa shunga o'xshash analitlarni ajratish uchun ideal sharoitlarni yaratadi. Shunday qilib, SSX va YuSSX har biri o'zining afzalliklari va qo'llanilish sohalari bilan m-krezolni tahlil qilish uchun turli yondashuvlarni taklif etadi. YuSSX, issiqlik ta’sirida buziluvchi birikmalar va murakkab aralashmalar bilan ishlashda yuqori sezgirlikni ta'minlasa, YuSSX farmatsevtika preparatlarida m-krezolni tahlil qilishda ishonchli natijalar taqdim etadi. Ajratish samaradorligini maksimal darajada ta’minlash uchun 1 ml/min oqim tezligi optimal deb topildi. M-krezolni tahlil qilish usulini ishlab chiqishda konservantlarni aniqlash uchun xromatografik rejim va tahlil sharoitlarini tanlashda mos eluentni tanlashdan boshlandi. Qutbliligini oshirish uchun, H_3PO_4, Na_3PO_4, Na_2SO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4 va boshqa turli xil qutblik eluent eritmalari ishlatildi. Shu bilan birga, asetonnitril kabi qutbsiz erituvchi ishlatildi, chunki u kam zaharli bo'lib, YuSSX qurilmalari bilan ishlatiladigan eng keng tarqalgan erituvchilardan biridir. Harakatlanadigan faza qutbli va qutbsiz erituvchilardan iborat aralashmani 30% va 70% hajm nisbatida tayyorlandi. Olingan natija 1-jadvalda keltirilgan.

Jadval 1. Optimal qutbli erituvchi tanlash
(Kolonka C18 250 x 4,6 mm 5 mkm, tezlik: 1 ml/min, 273 nm)

№	Qutbli erituvchilar	Eritma konsentratsiyasi	m-krezolning ch’oqqilarni ushlab turish vaqti, min	m-krezolning ch’oqqilarini ajratish vaqti, min
1	Na_3PO_4	0,2 M	6,50	1,14
2	Na_2SO_4	0,2 M	7,34	2,2
3	H_3PO_4	0,1 %	4,62	1,62
4	Na_2HPO_4	0,2 M	6,1	1,2
5	NaH_2PO_4	0,2 M	5,8	1,4

Yuqoridagi 1-jadvaldagi ma'lumotlarga asoslanib, shuni ta'kidlash mumkinki, turli xil eluentlar ishlatilganda, m-krezolning ch’oqqilarini eng yaxshi ajratish va ch’oqqilarning chiqish vaqti 0,1% H_3PO_4 eritmasi ishlatilganda olinadi. Shu bilan birga, metall tuzlari vaqt o'tishi bilan kapillyarlar va qurilmaning boshqa qismlari bilan bog'langan joylarda to'planishini hisobga olib, biz elyuent sifatida 0,1% H_3PO_4 eritmasini tanladik.

Qutbli erituvchilar va ularni ishlatish natijalari nisbatini optimallashtirish bo'yicha ma'lumotlar 2-jadvalda keltirilgan.

Jadval 2. Qutbli va qutbsiz erituvchilarni optimal nisbatini tanlash
(Kolonka C18 250 x 4,6 mm 5 mkm, tezlik: 1 ml/min, 273 nm)

№	0,1% H_3PO_4 eritmasi, hajm bo'yicha %	Asetonnitril, hajm bo'yicha %	m-krezolning ch’oqqilarni ushlab turish vaqti, min	m-krezolning ch’oqqilarni ajratish vaqti, min
1	10	90	1,34	0,29

2	30	70	2,31	0,50
3	50	50	3,11	0,97
4	70	30	4,62	1,62
5	90	10	7,87	2,26

Jadval ma'lumotlaridan ko'rinib turibdiki, ch'oqqilar orasidagi ajratish xususiyatlari asetonnitril konsentratsiyasi kamaygan sari oshadi va oxirgi ch'oqqini ushlab turish vaqti kamayadi. Optimal bufer eritmasi (0,1% H_3PO_4) va asetonnitrilning nisbatlari 70%:30% ni tashkil etadi, chunki yuqori konsentratsiyalarda №1-2 sinovlarida m-krezol ch'oqqilarining o'zaro yopishishi kuzatiladi, №5 sinovida esa xromatografiyaning umumiy vaqti oshadi.

Kolonkada optimal temperaturani o'rnatish maqsadida xromatografik tahlil xona haroratida, 30 °C va 40 °C da o'tkazildi. Xromatografik tahlil jarayonida kolonka harorati optimal tarzda 40 °C deb belgilandi, sababi bu harorat tizimning bosimini eng past darajaga tushiradi, bu esa ajratish jarayonining samaradorligini oshiradi. 40 °C haroratida xromatografik ajratish samarali amalga oshiriladi, negaki yuqori haroratda moddalarning ajralish jarayoni yomonlashishi yoki natijalarning noaniq bo'lishi mumkin. Shuningdek, bu harorat termolabil birikmalarni aniqlashda ham optimal hisoblanadi, chunki ular yuqori haroratda parchalanmaydi va ajratish jarayonida to'g'ri tahlil qilinadi. Biroq, yuqori haroratda tahlil qilishning afzalligi shundaki, tizimning barqarorligi va yuqori sifatli natijalar taqdim etiladi, bu esa xromatografik usulning takrorlanishini va aniqligini yaxshilaydi[10].

Usulning to‘g‘riligi. M-krezolning to‘g‘rilik parametri bo‘yicha validatsiyasini baholash uchun turli konsentratsiyadagi sinov eritmalari tayyorlandi va tahlil qilindi. M-krezolning konsentratsiyasi 80 % dan boshlab 100 % dan 20 % ko‘p bo‘lgan oraliqlarda o‘lchov ishlari olib borildi: 80 % konsentratsiyadagi konservantlardan 3 ta eritma, 90 % konsentratsiyadagi m-krezoldan 3 ta eritma, 100 % konsentratsiyadagi konservantlardan 3 ta, 100 % dan 10 % ko‘p konsentratsiyadagi eritmalardan 3 ta hamda 100 % dan 20 % ko‘p konsentratsiyadagi eritmalardan 3 ta. Validatsiya natijalari 3-jadvalda keltirilgan. M-krezolning RSO (referens standart namunasi) og‘irligi – 31,97 mg, m-krezol RSO eritmasi cho’qqi yuzasi – 232,07943.

Jadval 3. M-krezol uchun to‘g‘rilik parametri bo‘yicha olingan validatsiya natijalari
(1 ml/min, kolonka harorati – 40 °C, DAD – 273 nm, in’yektsiya hajmi – 10 µl)

Konsentratsiya darajasi, %	M-krezol konsentratsiyasi, mg/ml	Cho’qqi yuzasi	Aniqlangan m-krezol miqdori, mg/ml	Og‘ish, %
80	1,283	186,68704	1,282	-0,09
80	1,283	186,69510	1,282	-0,09
80	1,283	186,62160	1,282	-0,12
90	1,441	209,64030	1,440	-0,12
90	1,441	209,67033	1,440	-0,10
90	1,441	209,72687	1,440	-0,08
100	1,595	231,97563	1,593	-0,14
100	1,595	231,90022	1,592	-0,18
100	1,595	232,36678	1,596	0,02
100+10	1,746	254,11443	1,745	-0,06

100+10	1,746	253,94682	1,744	-0,12
100+10	1,746	253,95763	1,744	-0,12
100+20	1,911	278,10669	1,910	-0,08
100+20	1,911	278,03250	1,909	-0,11
100+20	1,911	278,03195	1,909	-0,11

Jadval 4. To‘g‘rililik parametri natijalari bo‘yicha statistik hisob-kitoblar

Statistik ko‘rsatkichlar, %	Результаты
O‘rtacha qiymat	99,90
Standart og‘ish	0,655
Variatsiya koeffitsiyenti	0,36
Ishonchli intervalning quyi chegarasi (P=95%)	99,64
Ishonchli intervalning yuqori chegarasi (P=95%)	100,36

Yaqinlik va oraliq aniqlikni baholash mezonlari: Variatsiya koeffitsiyenti ≤1,5 % (n>6), ishonchlilik oralig‘i F(5%, 5, 5): ≤5,05, t(5%, 10): ≤2,228.

M-krezolning miqdoriy miqdorini aniqlash bo‘yicha olingan validatsiya natijalarini solishtirish. M-krezol konservantining dori vositalaridagi miqdoriy miqdorini aniqlash bo‘yicha validatsiyadan so‘ng, avval farmakopeyada bayon etilgan usullar bilan biz tomonidan ishlab chiqilgan usulning solishtirma tahlili o‘tkazildi. Solishtirma tahlil har xil sharoitlarda, turli konsentratsiyalardagi olti yoki undan ortiq eritmalar asosida, sifat nazorati bo‘limining ikki xodimi (kimyo-analitik) tomonidan amalga oshirildi. Natijada umumlashtirilgan ko‘rinishda barcha ma’lumotlar yagona jadvalga kiritildi.

Olib borilgan solishtirma tahlil natijalariga ko‘ra, m-krezolning dori vositasi – insulindagi miqdoriy miqdorini aniqlashda spektrofotometrik va YuSSX (YuSSX – yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi) usullari o‘rganildi. Aniqlanishicha, biz tomonidan ishlab chiqilgan YuSSX usuli orqali olingan ma’lumotlar validatsiya parametrlariga to‘liq mos keladi va ishonchli hisoblanadi, eski YuSSX usuli bo‘yicha olingan ma’lumotlarga nisbatan yuqori aniqlikka ega [5].

Xulosa: Mazkur tadqiqotda m-krezolni insulin preparatlarida aniqlash uchun yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (YuSSX) usuli ishlab chiqildi va optimallashtirildi. Xromatografik tahlilning asosiy parametrlarini – harakatlanuvchi fazaning tarkibi, oqim tezligi, kolonka harorati va deteksiya to‘lqin uzunligini tanlash bo‘yicha keng ko‘lamli tajribalar o‘tkazildi. Ajratish samaradorligini oshirish maqsadida 0,1% H_3PO_4 va asetonnitril aralashmasi 70:30 hajmiy nisbatda eng optimal elyuent sifatida tanlandi. Kolonka harorati 40 °C da belgilandi, bu esa moddalarning barqarorligi va ajratish aniqligini ta’minladi. Usulning to‘g‘riligi, aniqligi va takrorlanuvchanligini baholash maqsadida o‘tkazilgan validatsiya natijalari YuSSX usulining yuqori ishonchliligini ko‘rsatdi. Statik va dinamik tahlil natijalari kichik og‘ishlar bilan yuqori aniqlikni tasdiqladi (variatsiya koeffitsiyenti – 0,36 %, o‘rtacha og‘ish – 0,09–0,18 %). Bundan tashqari, yangi ishlab chiqilgan YuSSX usuli farmakopeyada mavjud usullar bilan solishtirilganda yuqori sezgirlik va aniqlik namoyon etdi. Umuman olganda, ishlab chiqilgan xromatografik usul m-krezolni insulin tarkibida aniqlashda tezkor, ishonchli va takrorlanuvchan natijalar beradi. Bu usul farmatsevtika sanoatida sifat nazorati va xavfsizlik talablariga javob beruvchi zamonaviy tahlil vositasi sifatida samarali qo‘llanilishi mumkin. Shu orqali nafaqat xromatografiya texnologiyasining imkoniyatlari kengaymoqda, balki an’anaviy usullarning ham takomillashuvi uchun asos yaratilmoqda.

Adabiyotlar

1. Кумар, С., & Сайни, П. (2010). "Суперкритическая флюидная хроматография: обзор." *Аналитические химические письма*, 5(4), стр. 213-227.
2. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-3801-2017
3. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-2491-2021
4. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-7732-2017
5. Жалилов, М. Ж., Сманова, З. А., Кутлимуротова, Н. Х., & Турсунова, С. У. (2022). Разработка методики определения м-крезола и фенола в препарате инъекционного инсулина // Журнал химии товаров и народной медицины, 1(3), с. 30–51. https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol1.iss3.2022.50
6. Harris, D. C. (2015). *Quantitative Chemical Analysis* (9th ed.). W.H. Freeman and Company стр. 33-45.

Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

J Chem Good Trad Med, Volume 4, Issue 1, 2025 Chemistry of Goods

РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МЕТОДИКИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ М-КРЕЗОЛА В ПРЕПАРАТЕ ИНСУЛИНА

Мохира Уйгунбек кизи Отабекова
Андижанский государственный медицинский институт Студент фармацевтического факультета
https://orcid.org/0009-0007-8758-9215

Маруфжон Жуманазарович Жалилов
Андижанский Филиал Кокандского Университета Доцент кафедры медицинской и биологической химии, PhD
https://orcid.org/0000-0003-1128-497X

Машхура Усмановна Атабекова
Андижанский Филиал Кокандского Университета Ассистент кафедры медицинской и биологической химии
https://orcid.org/0009-0002-0014-9916
E-mail: atabekovamashxuraxon@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol4.iss1.2025.407

Ключевые слова:
хроматография, колонка, м-крезол, инсулин

Аннотация

В данной статье рассматривается разработка метода ВЭЖХ для выявления м-крезола включает выбор оптимальных растворителей и условий, таких как использование колонки C_{18} и растворов с pH 2-3, что обеспечивает высококачественное разделение веществ. Результаты экспериментов показали, что лучший элюент — это раствор H_3PO_4 с ацетонитрилом в концентрации 0,1%.

Как цитировать

Отабекова, М. У. к., Жалилов, М. Ж., & Атабекова, М. У. РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МЕТОДИКИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ М-КРЕЗОЛА В ПРЕПАРАТЕ ИНСУЛИНА. Журнал химии товаров и народной медицины, 4(1). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol4.iss1.2025.407

Введение. Хроматография считается одним из величайших научных открытий XX века, оказавшим значительное влияние на развитие химической науки, промышленности, медицины, экологии, атомной энергетики и фармацевтики. Этот метод разделения и анализа веществ позволил значительно расширить возможности исследовательских и производственных процессов в различных областях. Хроматографические методы продолжали активно развиваться, и сегодня ученые продолжают усовершенствовать как традиционные, так и новейшие подходы, создавая инновационные технологические решения. В данной статье автор ставит перед собой две взаимосвязанные задачи. С одной стороны, рассматривается разработка методики высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения м-крезола в препарате инсулина, предложенная М.Ж. Жалиловым. С другой стороны, предпринята попытка всесторонне осветить развитие хроматографии, акцентируя внимание как на новых инновационных направлениях и решениях, так и на традиционных методах, которые, несмотря на свою значимость, в настоящее время находят ограниченное применение.

Газовая хроматография используется для точного и детального анализа органических веществ, включая м-крезол. В этом методе образец превращается в газовую фазу и проходит через хроматографическую колонку, где происходит его разделение на компоненты. В колонке используется статическая фаза, которая взаимодействует с компонентами образца, разделяя их на основе их различной подвижности. После прохождения через колонку компоненты анализируются с помощью детектора, который позволяет количественно и качественно определить их содержание. Однако существуют и некоторые недостатки этого метода. Например, подготовка образцов может быть сложной и требовать специфических условий, а также некоторые вещества могут быть трудно разделяемыми в хроматографической колонке, что может повлиять на точность результатов. Несмотря на эти ограничения, газовая хроматография остается одним из самых точных и широко применяемых методов для анализа м-крезола и других органических соединений.

Однако, когда речь идет о методах анализа м-крезола в конкретных препаратах, например, инсулине, традиционные методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), также играют важную роль [1,2,3,4]. Для разработки методики анализа м-крезола в таких препаратах использовали обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ, так как м-крезол является низкополярным соединением, что требует использования полярных растворителей. Для оптимизации разделения было выбрано использование колонок с С18 и растворителей с pH 2-3, что является идеальными условиями для разделения м-крезола и других подобных аналитов. Таким образом, как СФХ, так и ВЭЖХ предлагают разные подходы для анализа м-крезола, каждый из которых имеет свои преимущества и области применения. СФХ обеспечивает более высокую чувствительность при работе с термолабильными соединениями и сложными смесями, в то время как ВЭЖХ предоставляет надежные результаты при анализе м-крезола в фармацевтических препаратах. Для разработки оптимальная скорость 1 мл/мин. Выбор хроматографического режима и условий проведения анализа для определения консервантов, при разработке метода анализа м-крезола начали с подбора подходящего элюента. Для увеличения полярности использованы различные полярные растворы элюентов, таких как H_3PO_4, Na_3PO_4, Na_2SO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4 и другие. При этом как неполярный растворитель использовали ацетонитрил, так как он является более нетоксичным и является одним из более часто используемых при использовании ВЭЖХ приборов. Подвижная фаза из смеси полярных и неполярных растворителей готовили в объемных соотношениях 30% на 70%. Полученный результат приведен в таблице 1.

Таблица 1. Выбор оптимального полярного растворителя (колонка С18 250 х4,6 мм 5 мкм, скорость: 1 мл/мин, 273 нм)

№	Полярные растворители	Концентрация раствора	Время удержания пиков м-крезола, мин	Разделение пиков м-крезола, мин
1	Na_3PO_4	0,2 М	6,50	1,14
2	Na_2SO_4	0,2 М	7,34	2,2
3	H_3PO_4	0,1 %	4,62	1,62
4	Na_2HPO_4	0,2 М	6,1	1,2
5	NaH_2PO_4	0,2 М	5,8	1,4

Исхода из приведенных данных таблицы 1 можно сделать вывод, что при использовании различных элюентов наилучшее разделение пиков м-крезола, а также время выхода пиков получается при использовании 0,1% раствора H_3PO_4. При этом учитывали, что соли металлов в течение времени отлагаются на местах соединения капилляров и других частей прибора, поэтому нами в качестве элюента выбрали 0,1% раствора H_3PO_4.

Оптимизация соотношений полярных растворителей и полученные данные при их использовании приведены в таблице 2.

Таблица 2. Выбор оптимального соотношения полярного и неполярного растворителя (колонка C18 250 x4,6 мм 5 мкм, скорость: 1 мл/мин, 273 нм)

№	0,1% раствор H_3PO_4, % по объему	Ацетонитрил, % по объему	Время удержания пиков м-крезол, мин	Разделение пиков м-крезола, мин
1	10	90	1,34	0,29
2	30	70	2,31	0,50
3	50	50	3,11	0,97
4	70	30	4,62	1,62
5	90	10	7,87	2,26

Из табличных данных видно, что разрешение между пиками увеличивается при уменьшении концентрации ацетонитрила и времени удержания последнего пика оптимальным соотношением буферного раствора (0,1% H_3PO_4) и ацетонитрила является 70:30, так как при более высоких концентрациях при испытаниях № 1-2 наблюдается наложения пиков м-крезола, а при № 5 общее время хроматографии увеличивается.

Устанавливали оптимальную температуру колонки, при этом хроматографический анализ проводили при комнатной 25 ^{0}C, 30 ^{0}C и 40 ^{0}C. Эксперименты показали, что, при 40 ^{0}C давление системы было самое низкое и целесообразно использовать эту температуру для дальнейших испытаний. В процессе хроматографического анализа температура колонки была оптимально установлена на уровне 40 °C, так как эта температура снижает давление системы до минимального уровня, что повышает эффективность процесса разделения. При температуре 40 °C хроматографическое разделение проводится эффективно, так как при более высоких температурах процесс разделения веществ может ухудшаться или результаты могут быть неточными. Также эта температура является оптимальной для определения термолабильных соединений, так как они не разлагаются при высокой температуре и правильно анализируются в процессе разделения. Однако, преимуществом анализа при высокой температуре является стабильность системы и получение высококачественных результатов, что улучшает воспроизводимость и точность хроматографического метода [10].

Правильность метода**.** Готовили и проводили измерения испытуемых растворов с концентрацией м-крезола в интервале от 80 % до больше на 20% от 100%: 3 раствора с концентрацией консервантов 80%, 3 раствора с концентрацией м-крезола 90%, 3 раствора с концентрацией консервантов 100%, 3 раствора с концентрацией консервантов больше на 10% от 100% и 3 раствора с концентрацией консервантов больше на 20% от 100%. Результаты

валидации по параметрам правильности приведены в таблице 3. Навеска РСО м-крезола – 31,97 мг, площадь пика раствора РСО м-крезола – 232,07943.

Таблица 3. Полученные данные по параметрам правильности валидации для м-крезола (1 мл/мин, темп. колонки 40 ^{0} С, DAD-273 нм, объем иньекции 10 µл)

Уровень концентрации, %	Концентрация м-крезола, мг/мл	Площадь пика	Определенное содержание м-крезола, мг/мл	Отклонение, %
80	1,283	186,68704	1,282	-0,09
80	1,283	186,69510	1,282	-0,09
80	1,283	186,62160	1,282	-0,12
90	1,441	209,64030	1,440	-0,12
90	1,441	209,67033	1,440	-0,10
90	1,441	209,72687	1,440	-0,08
100	1,595	231,97563	1,593	-0,14
100	1,595	231,90022	1,592	-0,18
100	1,595	232,36678	1,596	0,02
100+10	1,746	254,11443	1,745	-0,06
100+10	1,746	253,94682	1,744	-0,12
100+10	1,746	253,95763	1,744	-0,12
100+20	1,911	278,10669	1,910	-0,08
100+20	1,911	278,03250	1,909	-0,11
100+20	1,911	278,03195	1,909	-0,11

Таблица 3. Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,90
Стандартное отклонение	0,655
Коэффициент вариации	0,36
Нижняя граница доверительного интервала (P-95%)	99,64
Верхняя граница доверительного интервала (P-95%)	100,36

Критерии оценки сходимости и промежуточный прецизионности: коэффициент вариации ≤1,5% (n>6), доверительный интервал F(5%,5,5): ≤5,05, t(5%,10): ≤ 2,228.

Сравнение результатов валидации, полученных при определении количественного содержания м-крезола в составе лекарственных препаратов. После проведения валидации определения количественного содержания консерванта м-крезола в лекарственных препаратах, был проведен сравнительный анализ методов, ранее описаных в фармакопее с методом, разработанным нами.

Сравнительный анализ был проведен при разных условиях, более шести растворов, приготовленных с различной концентрацией, двумя сотрудниками (химик-аналитик) отдела

контроля качества. После чего была составлена общая таблица полученных данных, в которой отражены обобщенные результаты.

В результате проведенного нами сравнительного анализа спектрофотометрического и ВЭЖХ методов определения количественного содержания м-крезола в составе лекарственного препарата инсулина, было выявлено, что данные полученные при использовании разработанного ВЭЖХ метода, соответствуют по всем параметрам валидации и являются достоверными, по сравнению с данными, полученными старым ВЭЖХ методом. [5]

Вывод. В данном исследовании была разработана и оптимизирована методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения м-крезола в препаратах инсулина. Проведён широкий комплекс экспериментов по подбору оптимальных хроматографических условий, включая состав подвижной фазы, скорость потока, температуру колонки и длину волны детектирования. Наиболее эффективным элюентом признана смесь 0,1% H_3PO_4 и ацетонитрила в объёмном соотношении 70:30. Оптимальная температура колонки составила 40 °C, что обеспечило стабильность компонентов и точность разделения. Проведённая валидация метода по показателям точности, правильности и воспроизводимости показала высокую надёжность разработанного ВЭЖХ-метода. Результаты анализа с минимальными отклонениями (среднее отклонение – 0,09–0,18 %, коэффициент вариации – 0,36 %) подтвердили соответствие метода установленным требованиям. Кроме того, по сравнению с ранее используемыми фармакопейными методами, предложенная методика ВЭЖХ продемонстрировала более высокую чувствительность и точность. Таким образом, разработанный хроматографический метод позволяет эффективно, достоверно и воспроизводимо определять м-крезол в составе инсулиновых препаратов. Он может успешно применяться в фармацевтической промышленности в рамках контроля качества и соответствия требованиям безопасности. Это не только расширяет возможности хроматографического анализа, но и способствует совершенствованию традиционных методов контроля.

Литературы

1. Кумар, С., & Сайни, П. (2010). "Суперкритическая флюидная хроматография: обзор." *Аналитические химические письма*, 5(4), стр. 213-227.
2. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-3801-2017
3. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-2491-2021
4. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-7732-2017
5. Жалилов, М. Ж., Сманова, З. А., Кутлимуротова, Н. Х., & Турсунова, С. У. (2022). Разработка методики определения м-крезола и фенола в препарате инъекционного инсулина // Журнал химии товаров и народной медицины, 1(3), с. 30–51. https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol1.iss3.2022.50
6. Harris, D. C. (2015). *Quantitative Chemical Analysis* (9th ed.). W.H. Freeman and Company стр. 33-45.

Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

J Chem Good Trad Med, Volume 4, Issue 1, 2025 Chemistry of Goods

DEVELOPMENT OF A HPLC METHOD FOR DETERMINING M-CRESOL IN INSULIN PREPARATION

Mokhira U. Otabekova
Andijan State Medical Institute Student of the Faculty of Pharmacy
https://orcid.org/0009-0007-8758-9215

Marufjon J. Jalilov
Kokand University Andijan Branch Associate Professor of the Department of Medical and Biological Chemistry, PhD
https://orcid.org/0000-0003-1128-497X

Mashkhura U. Atabekova
Kokand University Andijan Branch Assistant of the Department of Medical and Biological Chemistry
https://orcid.org/0009-0002-0014-9916
E-mail: atabekovamashxuraxon@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol4.iss1.2025.407

Keywords:
chromatography, column, m-cresol, insulin

Annotation
This article reviews the use of the HPLC method for *m*-cresol detection includes the selection of optimal solvents and conditions, such as using a C_{18} column and solutions with a pH of 2-3, ensuring high-quality separation of substances. Experimental results showed that the best eluent is a 0.1% solution of H_3PO_4 with acetonitrile.

How to Cite
Otabekova, M. U., Jalilov, M. J., & Atabekova M. U. DEVELOPMENT OF A HPLC METHOD FOR DETERMINING M-CRESOL IN INSULIN PREPARATION. Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine, 4(1). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol4.iss1.2025.407

Introduction. Chromatography is considered one of the greatest scientific discoveries of the 20th century, having a significant impact on the development of chemistry, industry, medicine, ecology, nuclear energy, and pharmaceuticals. This method of separation and analysis has greatly expanded the possibilities for research and production processes in various fields. Chromatographic methods have continued to develop actively, and today scientists continue to improve both traditional and modern approaches, creating innovative technological solutions. The author of this article sets two interconnected tasks. On the one hand, it examines the development of a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of m-cresol in insulin preparations, proposed by M.J. Jalilov. On the other hand, an attempt is made to comprehensively cover the development of chromatography, focusing both on new innovative directions and solutions, as well as traditional methods, which, despite their importance, are currently finding limited application.

Gas Chromatography is an analytical method used for precise and detailed analysis of organic substances, including m-cresol. In this method, the sample is converted into a gas phase and passes through a chromatographic column, where it is separated into its components. The column contains a stationary phase that interacts with the sample components, separating them based on their different mobilities. After passing through the column, the components are analyzed by a detector, which allows for the qualitative and quantitative determination of their content. However, there are some drawbacks to this method. For example, sample preparation can be complex and require specific

conditions, and some substances may be difficult to separate in the chromatographic column, which could affect the accuracy of the results. Despite these limitations, gas chromatography remains one of the most precise and widely used methods for analyzing m-cresol and other organic compounds.

However, when it comes to methods for analyzing m-cresol in specific preparations, such as insulin, traditional methods like high-performance liquid chromatography (HPLC) also play an important role[1,2,3,4]. To develop a method for analyzing m-cresol in such preparations, using the reversed-phase variant of HPLC, as m-cresol is a low-polar compound, which requires the use of polar solvents. For optimization of separation, columns with C18 and solvents with pH 2-3 were selected, as these provide ideal conditions for separating m-cresol and other similar analytes. Thus, both SFC and HPLC offer different approaches to analyzing m-cresol, each with its advantages and areas of application. SFC provides higher sensitivity when working with thermolabile compounds and complex mixtures, while HPLC offers reliable results for analyzing m-cresol in pharmaceutical preparations. The optimal flow rate for this method is 1 mL/min. The selection of chromatographic conditions and methods for determining preservatives, when developing the analysis method for m-cresol, began with choosing an appropriate eluent. Various polar solvent solutions, such as H_3PO_4, Na_3PO_4, Na_2SO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, and others, were used to increase polarity. Acetonitrile was used as the non-polar solvent, as it is less toxic and one of the most commonly used solvents in HPLC instruments. The mobile phase, consisting of a mixture of polar and non-polar solvents, was prepared in volume ratios of 30% to 70%. The obtained result is presented in Table 1.

Table 1. Selection of the optimal polar solvent
(Column C18 250 x 4.6 mm 5 µm, flow rate: 1 mL/min, 273 nm)

№	Polar solvents	Solution concentration	m-cresol peak retention time, min	m-cresol peak separation time, min
1	Na_3PO_4	0.2 M	6.50	1.14
2	Na_2SO_4	0.2 M	7.34	2.2
3	H_3PO_4	0.1 %	4.62	1.62
4	Na_2HPO_4	0.2 M	6.1	1.2
5	NaH_2PO_4	0.2 M	5.8	1.4

From the data in Table 1, it can be concluded that the best separation of m-cresol peaks, as well as the peak retention time, is achieved when using a 0.1% H_3PO_4 solution. This was based on the understanding that metal salts deposit over time at the connection points of capillaries and other parts of the equipment, so 0.1% H_3PO_4 was chosen as the eluent.

Optimization of the ratios of polar solvents and the results obtained from their use are presented in Table 2.

Table 2. Selection of the optimal ratio of polar and non-polar solvents
(Column C18 250 x 4.6 mm 5 µm, flow rate: 1 mL/min, 273 nm)

№	0.1% H_3PO_4 solution, % by volume	Acetonitrile, % by volume	m-cresol peak retention time, min	m-cresol peak separation time, min
1	10	90	1.34	0.29

2	30	70	2.31	0.50
3	50	50	3.11	0.97
4	70	30	4.62	1.62
5	90	10	7.87	2.26

From the table, it is evident that the resolution between peaks increases as the concentration of acetonitrile decreases and the retention time of the last peak becomes shorter. The optimal ratio of the buffer solution (0.1% H_3PO_4) and acetonitrile is 70%:30%, since higher concentrations (tests 1-2) show peak overlapping of m-cresol, and in test 5, the total chromatographic time increases.

We established the optimal column temperature, conducting chromatographic analysis at room temperature, 30°C, and 40°C. In the chromatographic analysis process, the column temperature was optimally set at 40 °C, as this temperature reduces the system's pressure to the minimum level, enhancing the efficiency of the separation process. At 40 °C, chromatographic separation is carried out effectively because at higher temperatures, the separation process of substances may degrade or the results may become inaccurate. Additionally, this temperature is optimal for detecting thermolabile compounds, as they do not decompose at high temperatures and are properly analyzed during the separation process. However, the advantage of conducting the analysis at a high temperature is the stability of the system and the provision of high-quality results, which improves the reproducibility and accuracy of the chromatographic method[10].

Method Accuracy.Test solutions with m-cresol concentrations in the range from 80% to 20% above 100% were prepared and analyzed: 3 solutions with a preservative concentration of 80%, 3 solutions with a concentration of 90%, 3 solutions with a concentration of 100%, 3 solutions with a concentration 10% higher than 100%, and 3 solutions with a concentration 20% higher than 100%. The validation results for the accuracy parameter are presented in Table 3. Weighed amount of m-cresol RRS – 31.97 mg, peak area of m-cresol RRS solution – 232.07943.

Table 3. Data obtained for the accuracy parameter during validation of m-cresol (*Flow rate: 1 mL/min, column temperature: 40 °C, DAD: 273 nm, injection volume: 10 µL*)

Concentration Level, %	m-Cresol Concentration, mg/ml	Peak Area	Determined m-Cresol Content, mg/ml	Deviation, %
80	1,283	186,68704	1,282	-0,09
80	1,283	186,69510	1,282	-0,09
80	1,283	186,62160	1,282	-0,12
90	1,441	209,64030	1,440	-0,12
90	1,441	209,67033	1,440	-0,10
90	1,441	209,72687	1,440	-0,08
100	1,595	231,97563	1,593	-0,14
100	1,595	231,90022	1,592	-0,18
100	1,595	232,36678	1,596	0,02
100+10	1,746	254,11443	1,745	-0,06
100+10	1,746	253,94682	1,744	-0,12
100+10	1,746	253,95763	1,744	-0,12

100+20	1,911	278,10669	1,910	-0,08
100+20	1,911	278,03250	1,909	-0,11
100+20	1,911	278,03195	1,909	-0,11

Table 3. Results of statistical analysis of the accuracy parameter

Statistical Characteristic %	Результаты
Mean Value	99,90
Standard Deviation	0,655
Coefficient of Variation	0,36
Lower Confidence Interval (P-95%)	99,64
Upper Confidence Interval (P-95%)	100,36

Evaluation Criteria for Repeatability and Intermediate Precision: Coefficient of variation ≤1.5% (n > 6), confidence interval F(5%,5,5): ≤5.05, t(5%,10): ≤2.228.

Comparison of validation results obtained for the quantitative determination of m-cresol in medicinal products.

After validating the method for the quantitative determination of the preservative m-cresol in medicinal products, a comparative analysis was conducted between the method we developed and previously described pharmacopeial methods.

The comparative analysis was performed under varying conditions using more than six solutions with different concentrations, and conducted by two quality control department analysts (chemical analysts). A summary table of the obtained data was compiled, presenting the consolidated results. As a result of our comparative analysis of spectrophotometric and HPLC methods for the quantitative determination of m-cresol in insulin-based medicinal products, it was revealed that the data obtained using the developed HPLC method fully meets all validation parameters and is reliable, especially when compared to the data obtained using the old HPLC method. [5].

Conclusion: In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and optimized for the determination of m-cresol in insulin preparations. A comprehensive series of experiments was conducted to determine the optimal chromatographic conditions, including the composition of the mobile phase, flow rate, column temperature, and detection wavelength. The most effective eluent was identified as a mixture of 0.1% H_3PO_4 and acetonitrile in a 70:30 volume ratio. The column temperature was set at 40 °C, which ensured component stability and precise separation. Validation of the method in terms of accuracy, precision, and reproducibility confirmed the high reliability of the developed HPLC method. The validation results showed minimal deviations (mean deviation ranging from 0.09% to 0.18%, with a variation coefficient of 0.36%), meeting the accepted analytical standards. Additionally, when compared to pharmacopeial methods, the newly developed HPLC technique demonstrated greater sensitivity and accuracy. Overall, the proposed chromatographic method enables efficient, reliable, and reproducible quantification of m-cresol in insulin formulations. It can be effectively applied in the pharmaceutical industry for quality control and compliance with safety standards. This approach not only expands the capabilities of chromatographic analysis but also contributes to the improvement of traditional analytical methods.

References

1. Кумар, С., & Сайни, П. (2010). "Суперкритическая флюидная хроматография: обзор." *Аналитические химические письма*, 5(4), стр. 213-227.
2. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-3801-2017
3. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-2491-2021
4. Нормативный документ Республики Узбекистан 42 Уз-7732-2017
5. Жалилов, М. Ж., Сманова, З. А., Кутлимуротова, Н. Х., & Турсунова, С. У. (2022). Разработка методики определения м-крезола и фенола в препарате инъекционного инсулина // Журнал химии товаров и народной медицины, 1(3), с. 30–51. https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol1.iss3.2022.50
6. Harris, D. C. (2015). *Quantitative Chemical Analysis* (9th ed.). W.H. Freeman and Company стр. 33-45.