Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

J Chem Good Trad Med, Volume 5, Issue 5, 2026 Traditional Medicine

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ В КОМБИНИРОВАННОМ ИНФУЗИОННОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ: РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК

Суннатулла Усмон угли Тугизбоев
Магистрант кафедры неорганической химии и материаловедения Самаркандского государственного университета.
https://orcid.org/0009-0006-1496-6262

Голиб Курбонович Тошев
Директор по качеству совместного предприятия «Samarkand-England Eco-medical» в форме общества с ограниченной ответственностью
https://orcid.org/0009-0000-9138-7658

Чарос Тоштемировна Тоштемирова
Исполняющая обязанности доцента кафедры фармацевтической химии Ташкентского фармацевтического института, доктор философии (PhD) по химическим наукам.
https://orcid.org/0009-0003-2785-0817
E-mail: toshtemirovac@gmail.com

Волидахон Гофуржоновна Умирдинова
Независимый соискатель кафедры фармацевтической химии Ташкентского фармацевтического института.
https://orcid.org/0009-0003-4352-7953

Севара Мусиновна Хазраткулова
Доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии Ташкентского фармацевтического института, доктор философии (PhD) по химическим наукам.
https://orcid.org/0000-0002-0993-4526

DOI: https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol5.iss5.2026.700

Аннотация. Для определения моноаммония глицирризината, глицина и L-цистеина гидрохлорида в комбинированном инфузионном растворе «ГЕПА-SEEM» были разработаны два метода ВЭЖХ и полностью валидированы согласно требованиям ICH Q2(R1); современные подходы также рассмотрены с учётом принципов ICH Q2(R2) и ICH Q14. Методы показали высокую прецизионность (ОСО ≤ 0,22%), правильность (степень извлечения 98,5–101,5%) и линейность (R^2 > 0,999). На основе результатов разработана фармакопейная статья предприятия (ФСП).

Ключевые слова. ВЭЖХ; валидация метода; моноаммония глицирризинат; инфузионный раствор; гепатопротекторное средство; ICH Q2(R2).

Как цитировать

Тугизбоэв, С. У. ў., Тошев, Ғ. К., Тоштемирова, Ч. Т., Умирдинова, В. Г., & Хазраткулова, С. М. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ В КОМБИНИРОВАННОМ ИНФУЗИОННОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ: РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК. *Журнал химии товаров и народной медицины*, *5*(5). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol5.iss5.2026.700

Введение. Обеспечение безопасности и терапевтической эффективности парентеральных лекарственных форм напрямую зависит от строгого контроля их качества. К инфузионным растворам, вводимым внутривенно, предъявляются особенно жёсткие требования — они должны

быть стерильными, апирогенными, а содержание активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) в них должно точно соответствовать заявленному [1, 2]. Именно поэтому создание валидированных методик анализа и соответствующих фармакопейных стандартов рассматривается как обязательный этап при регистрации любого нового лекарственного препарата.

Объектом настоящего исследования выступил препарат «ГЕПА-SEEM» (СП ООО «SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL», Узбекистан) — новая комбинированная инфузионная форма, включающая три действующих вещества: моноаммония глицирризинат (МАГ, 0,8 мг/мл), глицин (8,0 мг/мл) и L-цистеина гидрохлорид (0,6 мг/мл). Известно, что МАГ проявляет заметное противовоспалительное, антиоксидантное и стабилизирующее клеточные мембраны действие на гепатоциты [3]. Глицин, в свою очередь, представляет собой аминокислоту, вовлечённую в детоксикационные процессы печени и обладающую цитопротекторным эффектом [4]. L-цистеина гидрохлорид — серосодержащая аминокислота, служащая предшественником глутатиона и тем самым формирующая антиоксидантную защиту клетки [5]. Совместное присутствие данных компонентов формирует комбинированный состав препарата.

Анализ доступных литературных источников показал отсутствие валидированной ВЭЖХ-методики, позволяющей количественно определять все три АФИ одновременно или последовательно в составе комбинированного инфузионного раствора. В связи с этим целью данной работы стали разработка двух специфичных ВЭЖХ-методик, их валидация в соответствии с требованиями ICH Q2(R1) [6] с учётом современных принципов ICH Q2(R2) [7] и ICH Q14 [8], а также подготовка фармакопейной статьи предприятия для «ГЕПА-SEEM».

Результаты исследования

Испытуемый образец и состав

В качестве объекта исследования использовался инфузионный раствор «ГЕПА-SEEM», выпущенный СП ООО «SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL» (серия EX0110423, дата выпуска 04/2023). Количественное содержание компонентов препарата из расчёта на 1 мл приведено в таблице 1.

Таблица 1. Количественный состав инфузионного раствора «ГЕПА-SEEM» (в 1 мл).

Компонент	Количество	Роль
Моноаммония глицирризинат	0,80 мг	Действующее вещество
Глицин	8,00 мг	Действующее вещество
L-Цистеина гидрохлорид	0,60 мг	Действующее вещество
Натрия сульфит	0,80 мг	Вспомогательное вещество
Кальция динатрия ЭДТА моногидрат	0,08 мг	Вспомогательное вещество
Натрия хлорид	5,00 мг	Вспомогательное вещество
Вода для инъекций	до 1 мл	Растворитель

Хроматографическое разделение и специфичность

Хроматограммы ВЭЖХ, полученные по методике 1, показаны на рисунке 1. Пик МАГ фиксировался приблизительно на 7,6 мин, тогда как 18α-глицирризиновая кислота элюировалась около 10,3 мин (относительное удерживание ~1,36), а Примесь-А — около 5,1 мин (относительное удерживание ~0,72). При этом на хроматограммах холостой пробы и плацебо не выявлено мешающих пиков, совпадающих по времени удерживания с МАГ, что подтверждает специфичность методики. 18α-ГЗК и Примесь-А представлены как дополнительные хроматографические показатели разделения; отдельные пределы обнаружения или количественного определения для них в рамках данной валидации не оценивались.

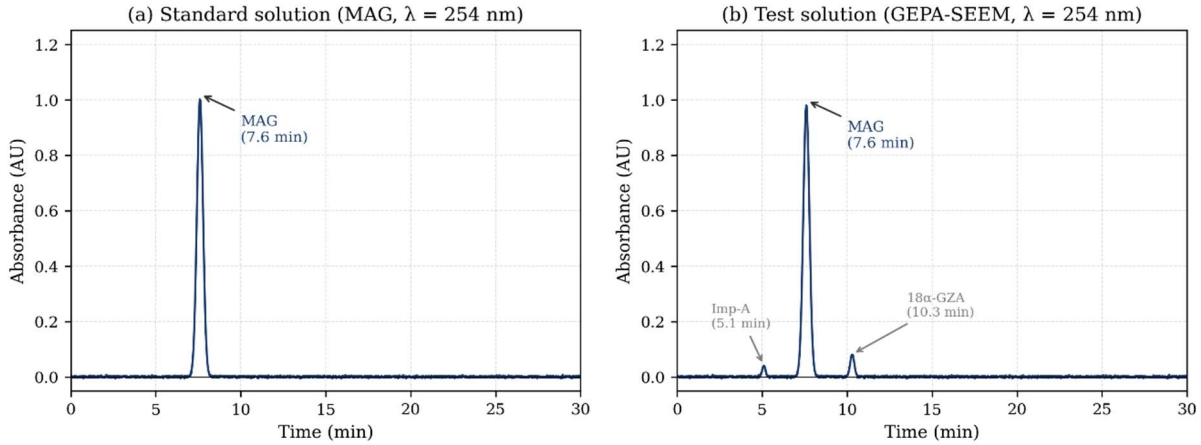


Рис. 1. Типичные хроматограммы ВЭЖХ по методу 1 (λ = 254 нм): (a) стандартный раствор МАГ; (b) испытуемый раствор «ГЕПА-SEEM». МАГ — моноаммония глицирризинат, 18α-ГЗК — 18α-глицирризиновая кислота, Пр-А — Примесь-А.

На рисунке 2 приведены хроматограммы, зарегистрированные по методике 2. Пики глицина и L-Cys·HCl разделились с высоким коэффициентом разрешения (более 3): время удерживания составило соответственно ~5,1 и ~6,6 мин. Влияние вспомогательных компонентов на хроматограммах плацебо не зафиксировано.

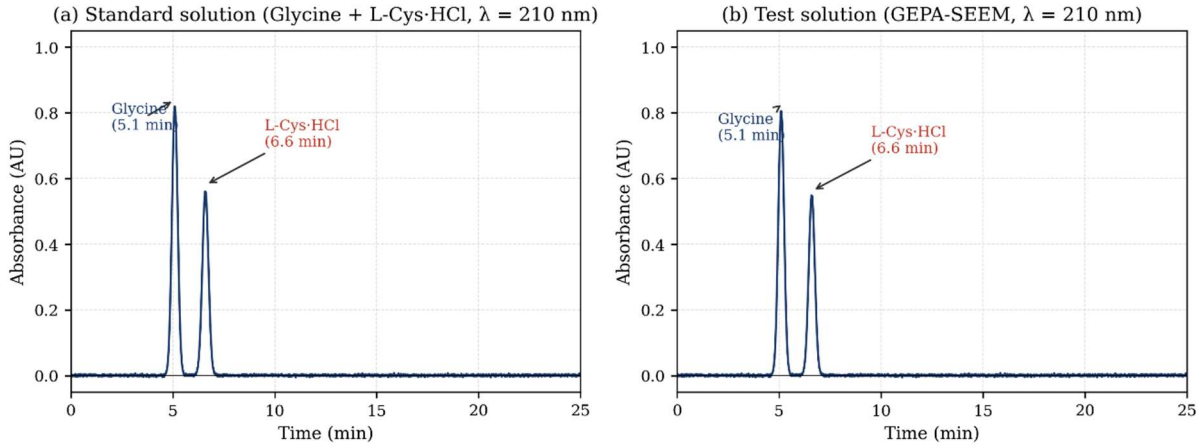


Рис. 2. Типичные хроматограммы ВЭЖХ по методу 2 (λ = 210 нм): (a) смешанный стандартный раствор (глицин + L-Cys·HCl); (b) испытуемый раствор «ГЕПА-SEEM».

Пригодность системы и прецизионность

Показатели пригодности хроматографической системы, а также данные оценки прецизионности для обеих методик сведены в таблицу 2.

Таблица 2. Параметры пригодности системы и результаты прецизионности.

Параметр	Метод 1 (МАГ)	Метод 2 (Gly/Cys)	Критерий
Коэффициент симметрии (USP)	1,124	1,18 / 1,15	≤ 2,5
Число теоретических тарелок (1-я инъекция)	6888	5430 / 4870	≥ 2000
ОСО, 5 инъекций (%)	0,10	0,12 / 0,14	≤ 2,0

Промежуточная прецизионность, ОСО (%)	0,20	0,18 / 0,22	≤ 2,0

По обеим методикам все установленные критерии пригодности системы были соблюдены. Значения ОСО как в течение одного дня, так и между разными сессиями не превысили 0,22%, что подтверждает отличную воспроизводимость результатов.

Линейность и диапазон

Построение калибровочных кривых проводилось в интервале 50–150% от номинальной рабочей концентрации каждого АФИ: для МАГ номинальная рабочая концентрация составляла 0,004 мг/мл (диапазон 0,002–0,006 мг/мл), для глицина — 0,004 мг/мл (0,002–0,006 мг/мл), для L-Cys·HCl — 0,003 мг/мл (0,0015–0,0045 мг/мл). По отношению к номинальному содержанию в препарате это соответствует общему разведению в 200 раз для МАГ и L-Cys·HCl и в 2000 раз для глицина. Соответствующие графики линейности показаны на рисунке 3.

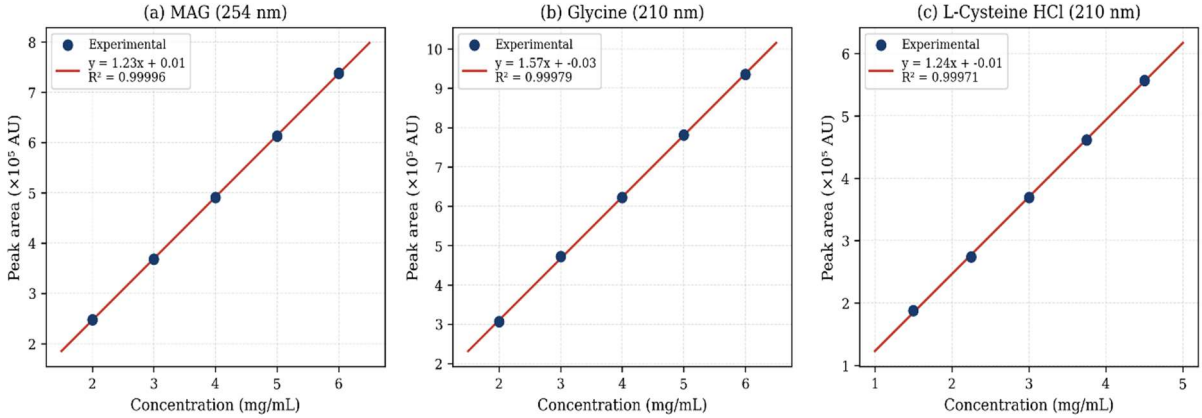


Рис. 3. Графики линейности для трёх АФИ: (a) МАГ (метод 1, λ = 254 нм); (b) глицин (метод 2, λ = 210 нм); (c) L-цистеина гидрохлорид (метод 2, λ = 210 нм). Каждая точка представляет среднее значение трёх инъекций; показаны линии регрессии.

Таблица 3. Параметры линейности для трёх аналитов.

Аналит	Диапазон (мг/мл)	Наклон	Отсечение	R^2
МАГ	0,002–0,006	$1{,}23\times10^{8}$	$2{,}1\times10^{3}$	> 0,999
Глицин	0,002–0,006	$1{,}56\times10^{8}$	$3{,}4\times10^{3}$	> 0,999
L-Cys·HCl	0,0015–0,0045	$1{,}23\times10^{8}$	$1{,}9\times10^{3}$	> 0,999

Прецизионность и правильность

Данные по прецизионности (ОСО) и правильности (степень извлечения, %) отражены на рисунке 4. При тестировании на трёх уровнях добавок (80, 100 и 120% от номинальной концентрации) степень извлечения по всем трём АФИ находилась в диапазоне 98,5–101,5%, что удовлетворяет критериям приемлемости ICH Q2(R1). При этом значения ОСО, как внутридневные, так и межсессионные, не превышали 0,22%.

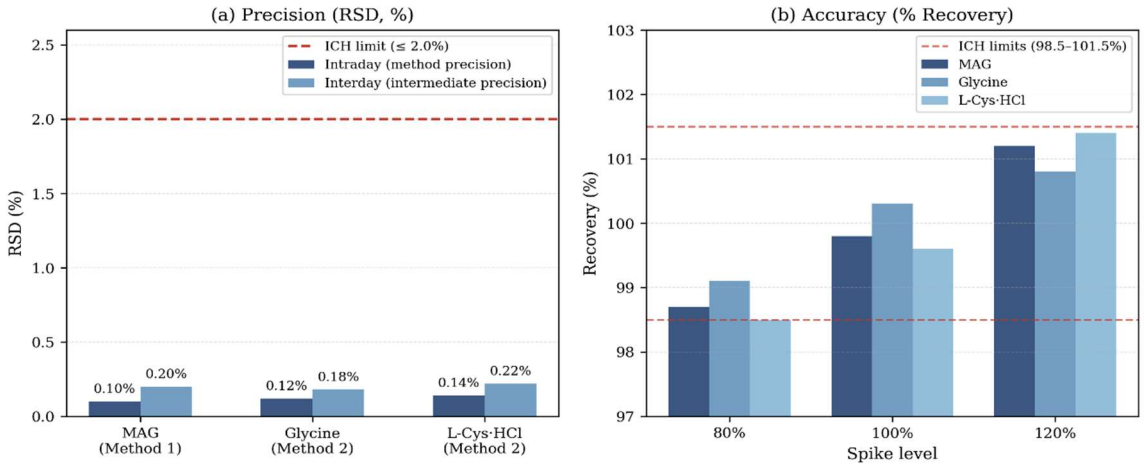


Рис. 4. (a) Прецизионность, выраженная как ОСО (%) для внутридневных и межсессионных измерений; красная пунктирная линия — предел ICH (2,0%). (b) Правильность, выраженная как процент извлечения на трёх уровнях добавок (80%, 100%, 120%); красные пунктирные линии — границы приемлемости ICH (98,5–101,5%).

Таблица 4. Результаты определения правильности (степень извлечения, %, n = 3 на каждом уровне).

Аналит	Добавка 80% (%)	Добавка 100% (%)	Добавка 120% (%)
МАГ	98,7 ± 0,4	99,8 ± 0,3	101,2 ± 0,5
Глицин	99,1 ± 0,5	100,3 ± 0,4	100,8 ± 0,4
L-Cys·HCl	98,5 ± 0,6	99,6 ± 0,5	101,4 ± 0,6

Устойчивость (робастность)

Оценка устойчивости методики 1 проводилась посредством целенаправленного варьирования скорости потока подвижной фазы (1,1 и 1,3 мл/мин), температуры колонки (25 и 35 °C), а также доли органического модификатора (±10%). Полученные данные приведены на рисунке 5 и в таблице 5.

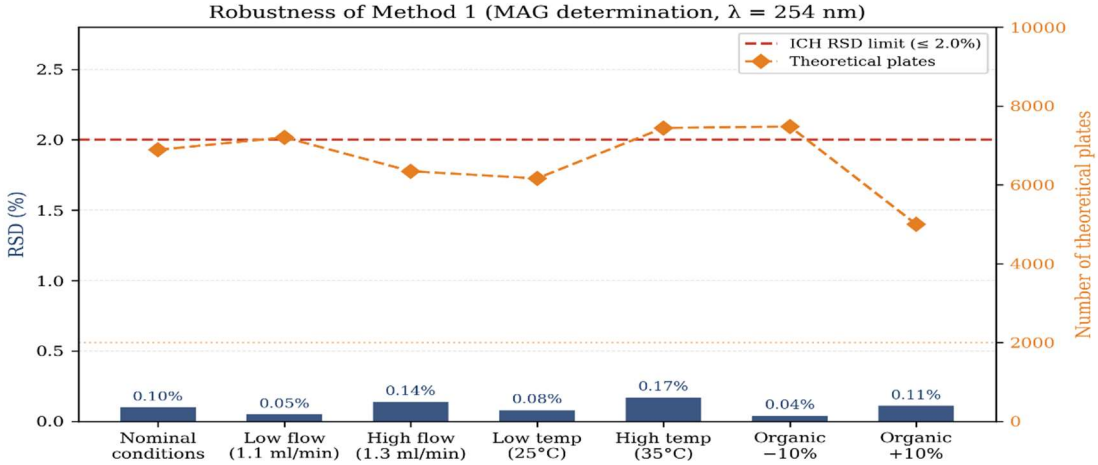


Рис. 5. Устойчивость метода 1 (МАГ, λ = 254 нм). Столбцы показывают ОСО (%) при различных условиях (левая ось); ромбы — число теоретических тарелок (правая ось). Красная пунктирная линия — предел ОСО по ICH (2,0%); оранжевая пунктирная линия — минимальный критерий числа тарелок (2000).

Таблица 5. Данные по устойчивости метода 1 (определение МАГ).

Условие	Коэффициент симметрии	Число теоретических тарелок	ОСО (%)
Номинальные условия	1,124	6888	0,10
Низкий поток (1,1 мл/мин)	1,126	7205	0,05
Высокий поток (1,3 мл/мин)	1,118	6346	0,14
Низкая температура (25 °C)	1,099	6164	0,08
Высокая температура (35 °C)	1,145	7444	0,17
Органический растворитель −10%	1,357	7480	0,04
Органический растворитель +10%	1,375	4999	0,11

Во всех протестированных условиях для методики 1 значения ОСО не выходили за пределы 0,20%, коэффициенты симметрии сохранялись в допустимом диапазоне, а число теоретических тарелок неизменно превышало 4999, что выше минимального критерия в 2000. Полученные данные подтверждают достаточную устойчивость методики 1 к небольшим отклонениям в аналитических условиях.

Стабильность растворов и подвижной фазы

На протяжении 24 часов при комнатной температуре стандартные и испытуемые растворы сохраняли стабильность: отклонение площадей пиков от исходных значений не превысило 0,5%. Подвижная фаза методики 1 на основе уксусной кислоты также не теряла своих хроматографических свойств в течение всего 24-часового периода наблюдения.

Фармакопейная статья предприятия (спецификация)

С учётом полученных результатов валидации и требований Государственной фармакопеи Республики Узбекистан была сформирована предлагаемая спецификация ФСП для 100 мл инфузионного раствора «ГЕПА-SEEM» (таблица 6). Показатели pH, осмоляльности, бактериальных эндотоксинов, стерильности и срока годности непосредственно в рамках данной ВЭЖХ-валидации не оценивались и представлены как предлагаемые показатели качества для ФСП.

Таблица 6. Спецификация ФСП инфузионного раствора «ГЕПА-SEEM».

Показатель	Норма	Метод контроля
Описание	Прозрачный, бесцветный или слегка желтоватый раствор	Визуальный метод
Подлинность (МАГ, Gly, L-Cys·HCl)	Время удерживания на ВЭЖХ соответствует стандарту	ВЭЖХ, ГФ РУз 2.2.29
Прозрачность	Прозрачный (в сравнении с водой для инъекций)	ГФ РУз 2.2.1

Цветность	Бесцветный или не темнее эталона Y3	ГФ РУз 2.2.2
pH	5,0–7,0	Потенциометрически, ГФ РУз 2.2.3
Видимые частицы	Не допускаются	Визуальный метод, ГФ РУз 2.9.20
Невидимые частицы (100 мл): ≥10 мкм; ≥25 мкм	≤ 6000 частиц/флакон; ≤ 600 частиц/флакон	ГФ РУз 2.9.19
Посторонние примеси: 18α-ГЗК; Пр-А; Любая другая; Сумма	≤10,0%; ≤5,0%; ≤2,0%; ≤7,0%	ВЭЖХ, ГФ РУз 2.2.29
Плотность	1,000–1,020 г/см³	ГФ РУз 2.2.5
Осмоляльность	260–320 мОсмоль/кг	Криоскопически, ГФ РУз 2.2.35
Бактериальные эндотоксины	≤ 0,3 ЕЭ/мл	ГФ РУз 2.6.14
Стерильность	Должен быть стерильным	Мембранная фильтрация, ГФ РУз 2.6.1
Количественное определение (в 1 мл): МАГ; Глицин; L-Cys·HCl	0,00072–0,00088 г; 0,0072–0,0088 г; 0,00054–0,00066 г	ВЭЖХ, ГФ РУз 2.2.29
Срок годности	2 года	—

Обсуждение

Предложенные в работе две ВЭЖХ-методики позволяют решить аналитическую задачу, связанную с неоднородностью состава «ГЕПА-SEEM»: три входящих в него АФИ — тритерпеновый гликозид, алифатическая аминокислота и серосодержащая аминокислота — заметно отличаются по своим химическим свойствам, что и обусловливает необходимость применения разных хроматографических условий для их корректного разделения и чувствительного определения.

Методика 1 основана на использовании обращённо-фазовой колонки C18 в сочетании с водно-органически-кислотной подвижной фазой, что обеспечивает хорошее удерживание и симметричную форму пика МАГ, а также позволяет фиксировать основную сопутствующую примесь — 18α-глицирризиновую кислоту (относительное удерживание 1,36). Выбор длины волны 254 нм обусловлен тем, что она соответствует максимуму поглощения хромофора глицирризината, обеспечивая тем самым селективное определение МАГ в выбранных хроматографических условиях.

Методика 2 базируется на принципе ион-парной хроматографии, где тетрабутиламмония гидроксид выступает в роли ион-парного реагента, играющего ключевую роль в удержании полярных аминокислот на неподвижной фазе C18. Проведение детектирования при 210 нм с использованием поглощения свободных аминокислот в коротковолновой УФ-области даёт возможность в рамках единого анализа одновременно количественно определять глицин и L-Cys·HCl. Достигаемое между их пиками высокое разрешение (коэффициент разрешения более 3) обеспечивает точное интегрирование пиков без взаимного наложения.

Предлагаемые пределы количественного содержания для ФСП установлены в пределах ±10% от номинального содержания каждого АФИ. Диапазоны pH 5,0–7,0 и осмоляльности 260–320 мОсмоль/кг представлены в спецификации как показатели качества; их физиологическая совместимость и соответствие изотонической норме отдельно в рамках настоящего исследования не оценивались.

Предложенные методики полностью готовы для практического применения в лабораториях фармацевтического контроля качества, а также могут использоваться как ориентир при разработке подобных аналитических процедур для других многокомпонентных гепатопротекторных инфузионных препаратов.

Экспериментальная часть

Реактивы и стандартные образцы

Стандартные образцы: моноаммония глицирризинат (серия AmGly04-03/23-02, чистота 96,76%); глицин (серия Gly03-03/23-02, чистота 99,90%); L-цистеина гидрохлорид (серия Cys.Hyd02-03/23-02, чистота 99,60%). Реактивы: ацетонитрил (степень чистоты для ВЭЖХ, ≥99,9%, VWR Chemicals); раствор тетрабутиламмония гидроксида 54–56% (Sigma-Aldrich); ортофосфорная кислота (≥99,0%, Sigma-Aldrich); ледяная уксусная кислота (Supelco); вода для инъекций (электропроводность ≤1,2 мкСм·см$^{-1}$, производство SEEM). Все химические вещества использовались в том виде, в котором были получены.

Приготовление стандартных и испытуемых растворов. Рабочие номинальные концентрации для диапазона линейности рассчитывали исходя из номинального содержания: 0,004 мг/мл для МАГ, 0,004 мг/мл для глицина и 0,003 мг/мл для L-Cys·HCl. Это соответствует общему разведению исходного препарата в 200, 2000 и 200 раз соответственно. Испытания правильности на уровнях 80%, 100% и 120% выполняли с n = 3 для каждого уровня.

Оборудование

Использовались две системы ВЭЖХ Shimadzu: (1) Shimadzu LC-40 Nexera Lite (серийный номер L22155902420AE) и (2) Shimadzu LC-20 Prominence. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Shim-pack GIST C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм; серийный номер 21C22070). Дополнительное оборудование: аналитические весы AUY 120 D (Shimadzu); ультразвуковая ванна KQ-100 DE; фильтрующее устройство Sartorius Stedim; pH-метр FiveEasy F20 (Mettler Toledo). Всё оборудование было откалибровано в установленные сроки.

Хроматографические методики. Метод 1 (МАГ, λ = 254 нм): подвижная фаза вода–ацетонитрил–ледяная уксусная кислота (61:38:1, об/об/об), скорость потока 1,2 мл/мин, колонка Shim-pack GIST C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм). Метод 2 (глицин и L-Cys·HCl, λ = 210 нм): подвижная фаза буфер тетрабутиламмония гидроксида (pH 7,0)–ацетонитрил (95:5, об/об), скорость потока 0,5 мл/мин.

Методология валидации. Обе методики были валидированы согласно требованиям ICH Q2(R1) [6] с учётом принципов ICH Q2(R2) [7] и ICH Q14 [8] по следующим параметрам: специфичность (путём сравнения холостых и плацебо-растворов со стандартом); прецизионность (внутридневная и межсессионная повторяемость на основе 5 инъекций); правильность (метод добавок на уровнях 80%, 100%, 120% от номинальной концентрации, n = 3 на каждом уровне); линейность (калибровка не менее чем по пяти точкам в диапазоне 50–150% от номинальной концентрации); устойчивость для методики 1 (путём намеренного варьирования скорости потока, температуры колонки и содержания органического модификатора); а также стабильность растворов и подвижной фазы (при комнатной температуре в течение 24 часов).

Вывод. Таким образом, для комбинированного инфузионного раствора «ГЕПА-SEEM» были созданы и полностью валидированы согласно ICH Q2(R1) две ВЭЖХ-методики: для количественного определения МАГ (методика 1, λ = 254 нм) и глицина совместно с L-цистеина гидрохлоридом (методика 2, λ = 210 нм). Обе методики подтвердили свою специфичность, высокую прецизионность (ОСО ≤ 0,22%), правильность (степень извлечения 98,5–101,5%) и линейность в рабочем диапазоне концентраций (R^2 > 0,999); испытание устойчивости, представленное в настоящей работе, было выполнено для методики 1 и дало удовлетворительные результаты. На основании полученных данных была составлена фармакопейная статья предприятия, задающая спецификацию качества «ГЕПА-SEEM», которая способна служить нормативной базой для регистрации препарата в Республике Узбекистан и его выхода на другие рынки.

Литературы

1. Bulatov AE, Trofimova EO (2013) Rossiya Federatsiyasida infuzion eritma ishlab chiqarishda birlamchi qadoqdan foydalanish tendentsiyalarini tahlil qilish. Remedium 1.
2. Sakanyan EI, Buniatyan ND, Lavrenchuk RA, Bichenova KA, Kovaleva EL, Mitkina LI (2015) Parenteral va oftalmologik preparatlar uchun farmakopeyasi maqolalarini tuzishning zamonaviy yondashuvlari. Farmatsiya 64(5):47–50.
3. Asl MN, Hosseinzadeh H (2008) Glycyrrhiza sp. va uning bioaktiv birikmalarining farmakologik ta'sirlariga sharh. Phytother Res 22(6):709–724. https://doi.org/10.1002/ptr.2362
4. Gundersen RY, Vaagenes P, Breivik T, Fonnum F, Opstad PK (2005) Glitsin — muhim neyrotransmitter va sitoprotektiv agent. Acta Anaesthesiol Scand 49(8):1108–1116. https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2005.00786.x
5. Nizar H, Gómez D, Kaur G, Young L, Want EJ, Holmes E, Nicholson JK (2021) L-Sistein antioksidant prekursor sifatida: biokimyoviy va funksional rollar. Nutrients 13:1–25. https://doi.org/10.3390/nu13020000
6. ICH Q2(R1) (2005) Analitik protseduralarni validatsiya qilish: matn va metodologiya. Xalqaro muvofiqlashtiruv kengashi, Jeneva.
7. ICH Q2(R2) (2023) Validation of Analytical Procedures. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Geneva.
8. ICH Q14 (2023) Analytical Procedure Development. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Geneva.
9. Tyzhigirova VV, Filippova SYu, Illarionova EA (2015) Inyeksion eritmalar va ko'z tomchilarining sifat ko'rsatkichlari va tahlil xususiyatlari. Irkutsk IGMU, Irkutsk.
10. O'zbekiston Respublikasi Davlat Farmakopeyasi, 1-nashr, 1-jild (2021). Toshkent.
11. Yevropa Farmakopeyasi, 11-nashr (2022). Yevropa Kengashi, Strasburg.
12. Épshtein NA (2004) Farmatsevtik tahlil uchun YUXXS usullarini validatsiya qilish. Pharm Chem J 38:212–228. https://doi.org/10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c