Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

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

KOMBINATSIYALANGAN INFUZION ERITMADA FAOL FARMATSEVTIK INGREDIENTLARNI YUXXS USULIDA ANIQLASH: USULLARNI ISHLAB CHIQISH VA VALIDATSIYA QILISH

Sunnatulla Usmon o'g'li Tugizboev
Samarqand davlat universiteti Noorganik kimyo va materialshunoslik kafedrasi magistranti
https://orcid.org/0009-0006-1496-6262

G'olib Kurbonovich Toshev
"Samarkand-England Eco-medical" mas'uliyati cheklangan jamiyat shaklidagi qo'shma korxonaning sifat bo'yicha direktori
https://orcid.org/0009-0000-9138-7658

Charos Toshtemirovna Toshtemirova
Toshkent farmatsevtika instituti Farmatsevtik kimyo kafedrasi dotsenti vazifasini bajaruvchisi, kimyo fanlari bo'yicha falsafa doktori (PhD)
https://orcid.org/0009-0003-2785-0817
E-mail : toshtemirovac@gmail.com

Volidakhon Gofurjonovna Umirdinova
Toshkent farmatsevtika instituti Farmatsevtik kimyo kafedrasi mustaqil izlanuvchisi
https://orcid.org/0009-0003-4352-7953

Sevara Musinovna Xazratkulova
Toshkent farmatsevtika instituti Noorganik, fizik va kolloid kimyo kafedrasi dotsenti, kimyo fanlari bo'yicha falsafa doktori (PhD)
https://orcid.org/0000-0002-0993-4526

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

Annotatsiya. «GEPA-SEEM» kombinatsiyalangan infuzion eritmasidagi monoammoniy glitsirrizinati, glitsin va L-sistein gidroxloridni aniqlash uchun ikkita YUXXS usuli ishlab chiqildi va ICH Q2(R1) talablariga muvofiq to'liq validatsiya qilindi; zamonaviy yondashuvlar ICH Q2(R2) va ICH Q14 tamoyillari nuqtayi nazaridan ham ko'rib chiqildi. Usullar yuqori aniqlik (OSO ≤ 0,22%), to'g'rilik (ajratib olish darajasi 98,5–101,5%) va chiziqlilikni (R^2 > 0,999) namoyon etdi. Natijalar asosida preparat uchun korxona farmakopeyasi maqolasi (KFM) ishlab chiqildi.

Kalit so'zlar. YUXXS; usul validatsiyasi; monoammoniy glitsirrizinati; infuzion eritma; gepatoprotektiv vosita; ICH Q2(R2).

Havola uchun
Tugizboev, S. U. o'g'li, Toshev, G. K., Toshtemirova, C. T., Umirdinova, V. G., & Xazratqulova, S. M. KOMBINATSIYALANGAN INFUZION ERITMADA FAOL FARMATSEVTIK INGREDIENTLARNI YUXXS USULIDA ANIQLASH: USULLARNI ISHLAB CHIQISH VA VALIDATSIYA QILISH. *Tovarlar Kimyosi Va Xalq Tabobati Jurnali*, *5*(5). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol5.iss5.2026.700

Kirish. Parenteral shakldagi dori vositalari xavfsiz va samarali bo'lishi uchun ularning sifati doimiy nazoratda bo'lishi shart. Xususan, venaga yuboriladigan infuzion eritmalarga qo'yiladigan talablar boshqa dori shakllariga qaraganda ancha qat'iy: ular steril, apirogen bo'lishi va tarkibidagi faol farmatsevtik ingredientlar (FFI) aniq miqdorda saqlanishi lozim [1, 2]. Aynan shu sababli, ro'yxatga olinadigan har qanday

yangi preparat uchun ishonchli, validatsiyalangan tahlil usullari va mos farmakopeya talablarini shakllantirish muqarrar bosqich hisoblanadi.

Tadqiqot ob'ekti bo'lgan «GEPA-SEEM» («SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL» QK MAS'UL. JAM., O'zbekiston) uchta faol komponentdan tarkib topgan yangi kombinatsiyalashgan infuzion mahsulotdir: monoammoniy glitsirrizinati (MAG, 0,8 mg/mL), glitsin (8,0 mg/mL) va L-sistein gidroxlorid (0,6 mg/mL). Ma'lumki, MAG gepatotsitlar darajasida seziladigan yallig'lanishga qarshi, antioksidant hamda membranani mustahkamlovchi ta'sir ko'rsatadi [3]; glitsin esa jigarning zararsizlantirish jarayonlarida ishtirok etuvchi, hujayralarni himoya qiluvchi aminokislotadir [4]. O'z navbatida L-sistein gidroxlorid tarkibida oltingugurt saqlagan aminokislota bo'lib, glutation sintezi uchun boshlang'ich modda vazifasini bajaradi va shu orqali hujayra ichida antioksidant himoyani ta'minlaydi [5]. Ushbu uch komponentning birgalikda qo'llanilishi preparatning kombinatsiyalangan tarkibini shakllantiradi.

Mavjud ilmiy manbalarni tahlil qilish shuni ko'rsatdiki, ushbu uchta FFIni birgalikdagi infuzion tarkibda bir yo'la yoki ketma-ket miqdoriy aniqlash imkonini beruvchi, to'liq validatsiyadan o'tgan YUXXS usuli hozircha ishlab chiqilmagan. Shu boisdan ushbu ishning maqsadi qilib ikkita alohida YUXXS metodikasini yaratish, ularni ICH Q2(R1) [6] talablari asosida validatsiya qilish, shuningdek analitik protsedurani ishlab chiqish va validatsiya qilishning zamonaviy ICH Q2(R2) [7] hamda ICH Q14 [8] tamoyillari bilan uyg'unligini baholash va «GEPA-SEEM» preparati uchun korxona farmakopeya maqolasini (KFM) tayyorlash belgilandi.

Tadqiqot natijalari

Sinov namunasi va tarkibi

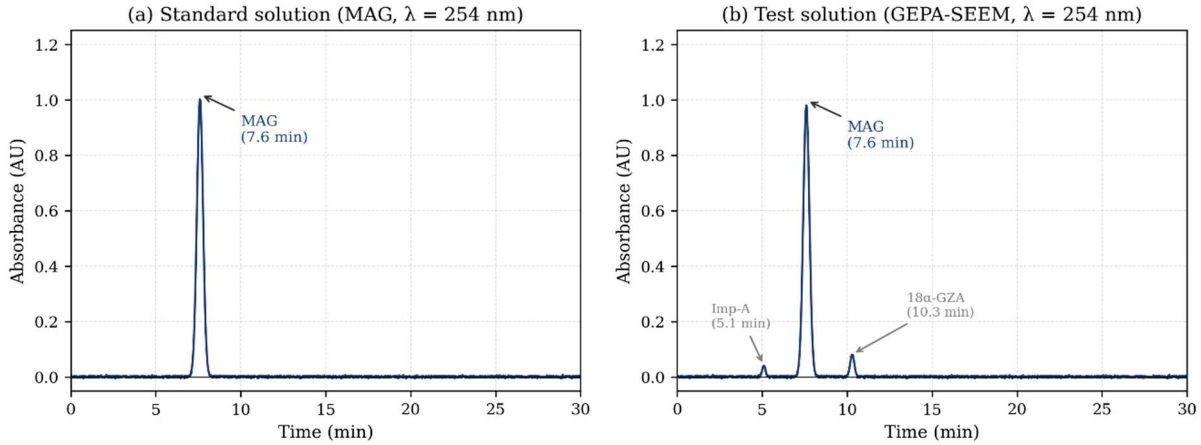
Sinov obyekti sifatida «SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL» QK MAS'UL. JAM. tomonidan ishlab chiqarilgan «GEPA-SEEM» infuzion eritmasi (EX0110423 seriyasi, 04/2023 sanasida chiqarilgan) olindi. Preparatning 1 millilitrga hisoblangan miqdoriy tarkibi 1-jadvalda aks ettirilgan.

1-jadval. «GEPA-SEEM» infuzion eritmasining miqdoriy tarkibi (1 ml ga).

Komponent	**Miqdori**	**Roli**
Monoammoniy glitsirrizinati	0,80 mg	Faol modda
Glitsin	8,00 mg	Faol modda
L-Sistein gidroxlorid	0,60 mg	Faol modda
Natriy sulfit	0,80 mg	Yordamchi modda
Kalsiy dinatriy EDTA monogidrat	0,08 mg	Yordamchi modda
Natriy xlorid	5,00 mg	Yordamchi modda
Inyeksiya uchun suv	1 ml gacha	Erituvchi

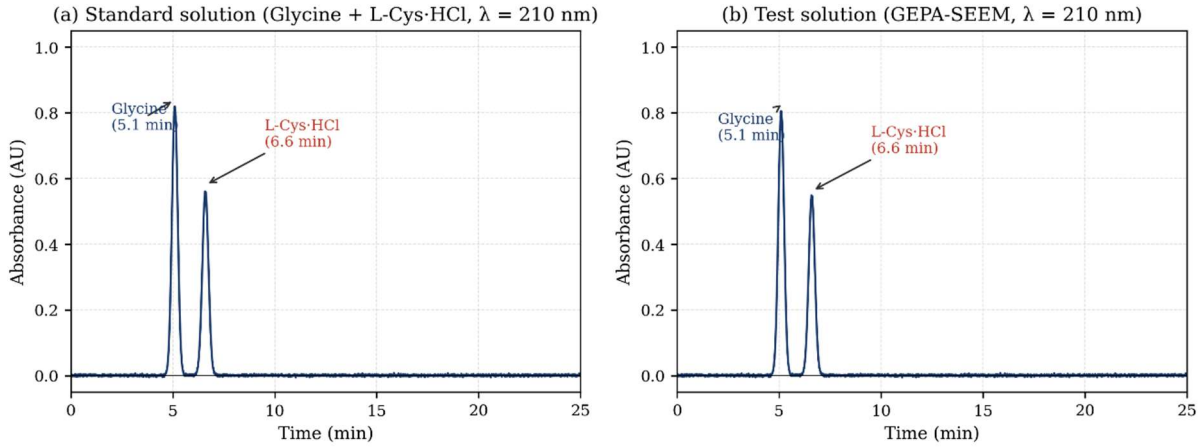
Xromatografik ajratish va spetsifiklik

1-usul qo'llanilganda olingan YUXXS xromatogrammalari 1-rasmda tasvirlangan. Unga ko'ra MAG piki taxminan 7,6-daqiqada, 18α-glitsirrizin kislotasi esa ~10,3-daqiqada (nisbiy ushlab qolinish ~1,36) qayd etildi, Aralashma-A esa ~5,1-daqiqada (nisbiy ushlab qolinish ~0,72) ajralib chiqdi. Bo'sh sinov va platsebo xromatogrammalarida MAG ning ushlab qolinish vaqtiga to'g'ri keladigan xalaqit beruvchi piklar aniqlanmadi, bu esa metodikaning spetsifikligini ko'rsatadi. 18α-GZA va Aralashma-A ushbu ishda xromatografik ajralishning qo'shimcha ko'rsatkichlari sifatida qayd etildi; ular uchun alohida aniqlash yoki miqdoriy aniqlash chegaralari ushbu validatsiya doirasida baholanmadi.



1-rasm. 1-usul (λ = 254 nm) bo'yicha namunali YUXXS xromatogrammalari: (a) MAG standart eritmasi; (b) «GEPA-SEEM» sinov eritmasi. MAG — monoammoniy glitsirrizinati, 18α-GZA — 18α-glitsirrizin kislotasi, Ar-A — Aralashma-A.

2-usul bo'yicha olingan xromatogrammalar 2-rasmda keltirilgan. Glitsin va L-Cys·HCl piklari yuqori rezolyutsiya (rezolyutsiya faktori 3 dan katta) bilan bir-biridan ajratildi: ularning ushlab qolinish vaqti mos ravishda ~5,1 va ~6,6 daqiqani tashkil etdi. Platsebo xromatogrammalarida esa yordamchi moddalar tomonidan hech qanday interferensiya kuzatilmadi.



2-rasm. 2-usul (λ = 210 nm) bo'yicha namunali YUXXS xromatogrammalari: (a) aralash standart eritma (glitsin + L-Cys·HCl); (b) «GEPA-SEEM» sinov eritmasi.

Tizim yaroqliligi va aniqlik

Har ikkala metodika bo'yicha olingan tizim yaroqliligi ko'rsatkichlari hamda aniqlik natijalari 2-jadvalda jamlangan.

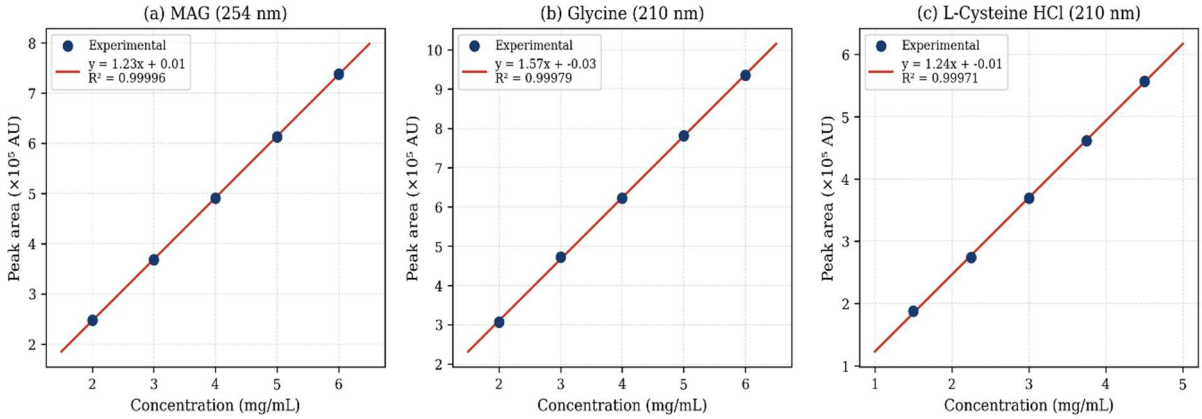
2-jadval. Tizim yaroqliligi parametrlari va aniqlik natijalari.

Parametr	1-usul (MAG)	2-usul (Gly/Cys)	Mezon
Simmetriya koeffitsienti (USP)	1,124	1,18 / 1,15	≤ 2,5
Nazariy tarelkalar soni (1-inj.)	6888	5430 / 4870	≥ 2000
OSO, 5 ta inyeksiya (%)	0,10	0,12 / 0,14	≤ 2,0
Oraliq aniqlik OSO (%)	0,20	0,18 / 0,22	≤ 2,0

Har ikkala metodika bo'yicha ham tizim yaroqliligiga qo'yilgan barcha talablar to'liq bajarildi. Kun ichida va sessiyalar oralig'ida olingan OSO qiymatlari 0,22% dan oshmagan bo'lib, bu yuqori darajadagi takrorlanuvchanlikdan dalolat beradi.

Chiziqlilik va diapazoni

Kalibrlash egri chiziqlari FFIlarning nominal ishchi konsentratsiyasiga nisbatan 50–150% oraliqda o'rnatildi: MAG uchun nominal ishchi konsentratsiya 0,004 mg/mL (0,002–0,006 mg/mL), glitsin uchun 0,004 mg/mL (0,002–0,006 mg/mL) va L-Cys·HCl uchun 0,003 mg/mL (0,0015–0,0045 mg/mL) bo'ldi. Preparatdagi nominal konsentratsiyalarga (MAG 0,8 mg/mL, glitsin 8,0 mg/mL, L-Cys·HCl 0,6 mg/mL) nisbatan ushbu ishchi konsentratsiyalar mos ravishda 200, 2000 va 200 marta umumiy suyultirishga to'g'ri keladi. Ushbu chiziqlilikni aks ettiruvchi tipik grafiklar 3-rasmda keltirilgan.



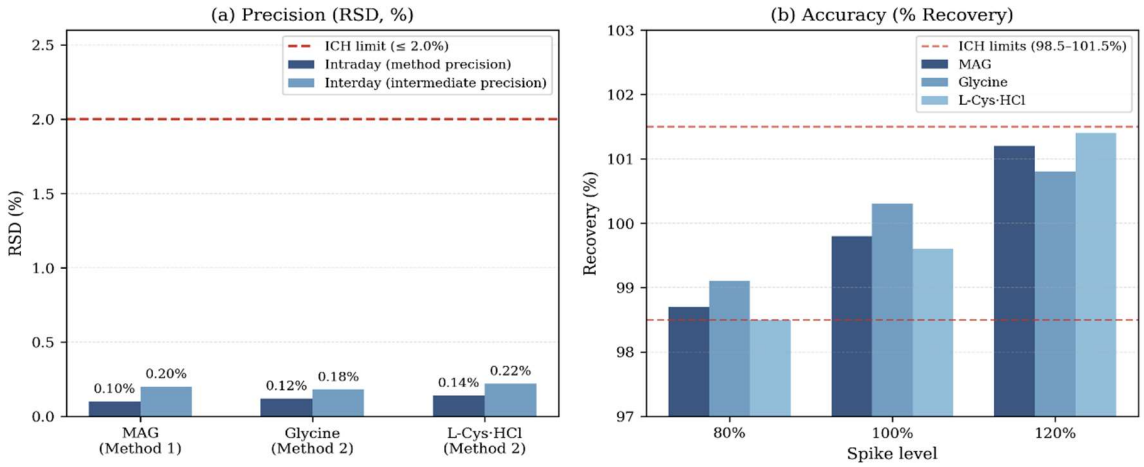
3-rasm. Uch FFI uchun chiziqlilik grafiklari: (a) MAG (1-usul, λ = 254 nm); (b) glitsin (2-usul, λ = 210 nm); (c) L-sistein gidroxlorid (2-usul, λ = 210 nm). Har bir nuqta uch marta inyeksiyaning o'rtacha qiymatini ifodalaydi; regressiya to'g'ri chiziqlari ko'rsatilgan.

3-jadval. Uch analit uchun chiziqlilik parametrlari.

Analit	Diapazoni (mg/mL)	**Qiyalik**	**Kesishma**	**R²**
MAG	0,002–0,006	$1{,}23\times10^{8}$	$2{,}1\times10^{3}$	> 0,999
Glitsin	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

Aniqlik va to'g'rilik

Aniqlik (OSO) va to'g'rilik (ajratib olish foizi) ko'rsatkichlari 4-rasmda tasvirlangan. Nominal konsentratsiyaning 80%, 100% va 120% darajalarida o'tkazilgan sinovlarda uchala FFI bo'yicha ham ajratib olish darajasi 98,5–101,5% oralig'ida bo'lib chiqdi, bu ICH Q2(R1) tomonidan belgilangan qabul qilish mezonlariga to'liq javob beradi. Shuningdek, kunlik va sessiyalararo o'lchashlarda OSO qiymati doimo 0,22% dan past bo'lgan.



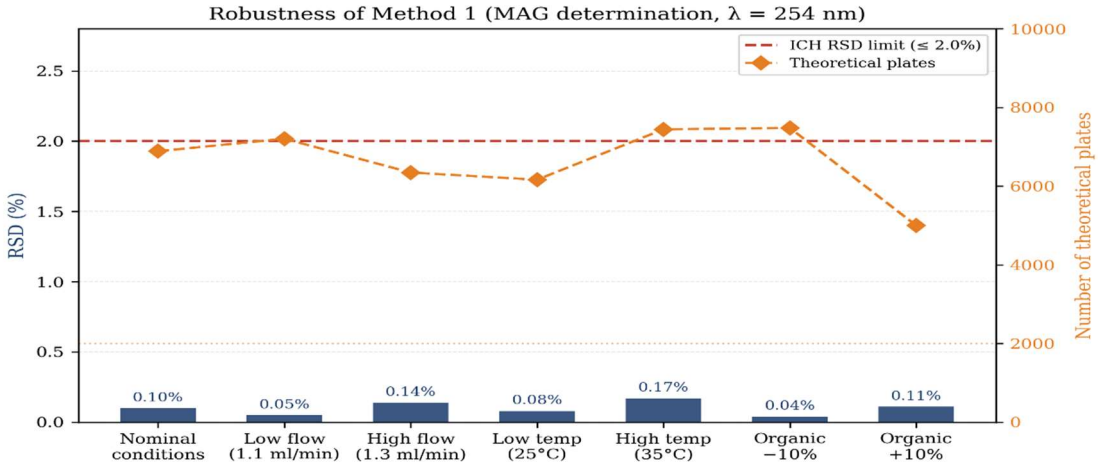
4-rasm. (a) Kunlik va sessiyalararo o'lchovlar uchun OSO (%) sifatida ifodalangan aniqlik; qizil kesma chiziq — ICH chegarasini (2,0%) ko'rsatadi. (b) Uch qo'shimcha darajasida (80%, 100%, 120%) ajratib olish foizi sifatida ifodalangan to'g'rilik; qizil kesma chiziqlar — ICH qabul qilish chegaralarini (98,5–101,5%) ko'rsatadi.

4-jadval. To'g'rilik natijalari (ajratib olish %, n = 3 har bir daraja uchun).

Analit	Qo'shimcha 80% (%)	Qo'shimcha 100% (%)	Qo'shimcha 120% (%)
MAG	98,7 ± 0,4	99,8 ± 0,3	101,2 ± 0,5
Glitsin	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

Mustahkamlik

1-usulning mustahkamlik ko'rsatkichi oqim tezligini (1,1 va 1,3 mL/min), kolonka haroratini (25 va 35°C) hamda organik modifikator miqdorini (±10%) atayin o'zgartirish yo'li bilan baholandi. Olingan natijalar 5-rasm va 5-jadvalda taqdim etilgan.



5-rasm. 1-usulning mustahkamligi (MAG, λ = 254 nm). Ustunlar turli sharoitlarda OSO (%) ni ko'rsatadi (chap o'q); olmoslar nazariy tarelkalar sonini ko'rsatadi (o'ng o'q). Qizil kesma chiziq — ICH OSO chegarasi (2,0%); to'q sariq nuqtali chiziq — minimal tarelkalar soni mezoni (2000).

5-jadval. 1-usulning mustahkamligi ma'lumotlari (MAG aniqlash).

Sharoit	Simmetriya koeffitsienti	Nazariy tarelkalar soni	OSO (%)
Nominal sharoitlar	1,124	6888	0,10

Past oqim (1,1 mL/min)	1,126	7205	0,05
Yuqori oqim (1,3 mL/min)	1,118	6346	0,14
Past harorat (25°C)	1,099	6164	0,08
Yuqori harorat (35°C)	1,145	7444	0,17
Organik erituvchi −10%	1,357	7480	0,04
Organik erituvchi +10%	1,375	4999	0,11

Tekshirilgan barcha sharoitlarda 1-usul uchun OSO ko'rsatkichi 0,20% chegarasidan oshmadi, simmetriya koeffitsientlari ruxsat etilgan oraliqda saqlandi, nazariy tarelkalar soni esa 2000 talab qilingan minimal darajadan ancha yuqori — 4999 dan ortiq bo'ldi. Ushbu natijalar 1-usulning analitik sharoitlardagi kichik chetlanishlarga nisbatan yetarlicha bardoshli ekanligini ko'rsatadi.

Eritmalar va harakatlanuvchi faza barqarorligi

Standart va sinov eritmalari xona haroratida 24 soat davomida o'z barqarorligini yo'qotmadi: pik maydonlaridagi o'zgarish boshlang'ich qiymatga nisbatan 0,5% dan oshmadi. 1-usulda qo'llanilgan sirka kislotali harakatlanuvchi faza ham 24 soatlik kuzatuv davomida o'z xromatografik xususiyatlarini to'liq saqlab qoldi.

Korxona farmakopeyasi maqolasi (spetsifikatsiya)

Olingan validatsiya natijalari hamda O'zbekiston Respublikasi Davlat Farmakopeyasi talablarini hisobga olgan holda, «GEPA-SEEM» 100 mL infuzion eritmasi uchun taklif etilayotgan korxona farmakopeya maqolasi (KFM) spetsifikatsiyasi shakllantirildi (6-jadval). pH, osmolyallik, bakterial endotoksinlar, sterillik va yaroqlilik muddati kabi ko'rsatkichlar ushbu maqoladagi YUXXS validatsiyasi natijalari bilan bevosita baholanmagan va KFM uchun taklif etilayotgan sifat ko'rsatkichlari sifatida keltirilgan.

6-jadval. «GEPA-SEEM» infuzion eritmasi spetsifikatsiyasi (KFM).

Ko'rsatkich	Me'yor	Nazorat usuli
Tavsifi	Tiniq, rangsiz yoki biroz sariq rangdagi eritma	Ko'rish usuli
Haqiqiyligi (MAG, Gly, L-Cys·HCl)	YUXXS da standart bilan ushlanib qolish vaqti mos keladi	YUXXS, O'zR DF 2.2.29
Tiniqligi	Tiniq (inyeksiya uchun suv bilan solishtirganda)	O'zR DF 2.2.1
Rangliligi	Rangsiz yoki Y3 etalon eritmasidan to'q emas	O'zR DF 2.2.2
pH	5,0–7,0	Potentsiometrik, O'zR DF 2.2.3
Ko'rinadigan zarrachalar	Yo'q bo'lishi kerak	Ko'rish usuli, O'zR DF 2.9.20
Ko'rinmaydigan zarrachalar (100 ml): ≥10 µm; ≥25 µm	≤ 6000 zar/flakon; ≤ 600 zar/flakon	O'zR DF 2.9.19
Begona aralashmalar: 18α-GZA; Ar-A; Har qanday boshqa; Yig'indisi	≤10,0%; ≤5,0%; ≤2,0%; ≤7,0%	YUXXS, O'zR DF 2.2.29

Zichligi	1,000–1,020 g/sm³	O'zR DF 2.2.5
Osmolyallik	260–320 mOsmol/kg	Krioskopik, O'zR DF 2.2.35
Bakterial endotoksinlar	≤ 0,3 EU/ml	O'zR DF 2.6.14
Sterillik	Steril bo'lishi kerak	Membrana filtrlash, O'zR DF 2.6.1
Miqdoriy aniqlash (1 ml da): MAG; Glitsin; L-Cys·HCl	0,00072–0,00088 g; 0,0072–0,0088 g; 0,00054–0,00066 g	YUXXS, O'zR DF 2.2.29
Yaroqlilik muddati	2 yil	—

Muhokama

Mazkur ishda taklif etilgan ikkala YUXXS metodikasi «GEPA-SEEM» tarkibining bir jinsli emasligidan tug'iladigan analitik qiyinchilikni bartaraf etadi: preparatdagi uchta FFI — triterpenoid glikozid, alifatik aminokislota va oltingugurt saqlovchi aminokislota — kimyoviy tabiati bo'yicha bir-biridan sezilarli farqlanadi, shu sababli ularni yetarlicha ajratish va sezgirlik bilan aniqlash uchun har xil xromatografik sharoitlar zarur bo'ladi.

Birinchi metodikada teskari fazali C18 kolonka va suv–organik erituvchi–kislota tarkibli harakatlanuvchi faza qo'llaniladi; bu tanlov MAG uchun yaxshi ushlab qolinish vaqti va simmetrik pik shaklini ta'minlaydi, shu bilan birga asosiy hamroh modda — 18α-glitsirrizin kislotasini (nisbiy ushlab qolinish ko'rsatkichi 1,36) ham aniqlash imkonini beradi. 254 nm to'lqin uzunligining tanlanishi glitsirrizinat molekulasining yutilish maksimumiga to'g'ri keladi, natijada MAG uchun tanlangan deteksiya sharoitida yaxshi selektivlik ta'minlanadi.

Ikkinchi metodika ion-juft xromatografiyasi tamoyiliga asoslangan: tetrabutilammoniy gidroksid ion-juftlovchi reagent rolini o'ynab, qutbli aminokislotalarning C18 statsionar fazada ushlab qolinishini ta'minlashda hal qiluvchi omil hisoblanadi. Peptid bog'i mintaqasiga to'g'ri keladigan 210 nm to'lqin uzunligida aniqlash esa bitta, atigi 30 daqiqa davom etadigan tahlil doirasida glitsin va L-Cys·HCl ni birgalikda miqdoriy baholash imkonini yaratadi. Ikki aminokislota piki orasidagi yuqori ajratish darajasi (rezolyutsiya faktori 3 dan katta) piklarni bir-biriga aralashtirmasdan aniq integratsiya qilishga xizmat qiladi.

KFM uchun taklif etilgan miqdoriy chegaralar nominal FFI miqdorining ±10% oralig'ida belgilangan. pH 5,0–7,0 va osmolyallik 260–320 mOsmol/kg ushbu spetsifikatsiyada sifat ko'rsatkichlari sifatida keltirilgan; ularning fiziologik mosligi yoki izotoniklikka muvofiqligi ushbu tadqiqotning eksperimental doirasida alohida baholanmagan.

Ishlab chiqilgan metodikalar farmatsevtik sifat nazorati laboratoriyalarida amaliy qo'llash uchun tayyor bo'lib, boshqa ko'p tarkibli gepatoprotektiv infuzion preparatlarni tahlil qilishga qaratilgan o'xshash usullarni yaratishda ham namuna sifatida foydalanilishi mumkin.

Tajriba qismi

Reaktivlar va standart namunalar

Standart namunalar: monoammoniy glitsirrizinati (seriya AmGly04-03/23-02, tozaligi 96,76%); glitsin (seriya Gly03-03/23-02, tozaligi 99,90%); L-sistein gidroxlorid (seriya Cys.Hyd02-03/23-02, tozaligi 99,60%). Reaktivlar: atsetonitril (YUXXS darajasi, ≥99,9%, VWR Chemicals); tetrabutilammoniy gidroksid eritmasi 54–56% (Sigma-Aldrich); ortofosfat kislotasi (≥99,0%, Sigma-Aldrich); muzli sirka kislotasi (Supelco); inyeksiya uchun suv (o'tkazuvchanlik ≤1,2 μS·cm⁻¹, SEEM ishlab chiqarishi). Barcha kimyoviy moddalar qabul qilingan holatda ishlatildi.

Standart va sinov eritmalarini tayyorlash. Chiziqlilik diapazonidagi ishchi konsentratsiyalar nominal tarkibdan hisoblab chiqildi: MAG uchun 0,004 mg/mL, glitsin uchun 0,004 mg/mL va L-Cys·HCl uchun 0,003 mg/mL. Bu qiymatlar preparatdagi nominal konsentratsiyalarga nisbatan mos ravishda 200, 2000 va 200 marta umumiy suyultirishga teng. 80%, 100% va 120% darajadagi to'g'rilik sinovlari har bir daraja uchun n = 3 bilan bajarildi.

Jihozlar

Ikkita Shimadzu YUXXS tizimidan foydalanildi: (1) Shimadzu LC-40 Nexera Lite (seriya raqami L22155902420AE) va (2) Shimadzu LC-20 Prominence. Xromatografik ajratish Shim-pack GIST C18 ustunida (250 × 4,6 mm, 5 µm; seriya raqami 21C22070) amalga oshirildi. Qo'shimcha jihozlar: AUY 120 D analitik tarozisi (Shimadzu); KQ-100 DE ultratovush vannasi; Sartorius stedim filtr qurilmasi; FiveEasy F20 pH-metri (Mettler Toledo). Barcha jihozlar belgilangan muddatlarda kalibrlangan.

Xromatografik usullar

1-usul (MAG, λ = 254 nm): harakatlanuvchi faza suv–atsetonitril–muzli sirka kislotasi (61:38:1, haj/haj/haj), oqim tezligi 1,2 mL/min, Shim-pack GIST C18 ustuni (250 × 4,6 mm, 5 µm). 2-usul (glitsin va L-Cys·HCl, λ = 210 nm): harakatlanuvchi faza tetrabutilammoniy gidroksid buferi (pH 7,0)–atsetonitril (95:5, haj/haj), oqim tezligi 0,5 mL/min.

Validatsiya metodologiyasi

Har ikkala usul ICH Q2(R1) [6] talablariga muvofiq quyidagi parametrlar bo'yicha validatsiya qilindi; mazkur yondashuv ICH Q2(R2) [7] va ICH Q14 [8] da bayon etilgan zamonaviy analitik protsedura validatsiyasi va ishlab chiqish tamoyillari bilan ham uyg'unlashtirildi: spetsifiklik (bo'sh va platsebo eritmalarini standart bilan solishtirish orqali); aniqlik (kunlik va sessiyalararo takroriylik, 5 ta inyeksiya asosida); to'g'rilik (nominal konsentratsiyaning 80%, 100%, 120% darajalarida qo'shimcha kiritish usuli, n = 3 har bir daraja uchun); chiziqlilik (nominal konsentratsiyaning 50–150% diapazonida kamida beshta nuqtada kalibrlash); mustahkamlik (1-usul uchun oqim tezligi, ustun harorati va organik modifikator miqdorining ataylab o'zgartirilishi orqali); hamda eritmalar va harakatlanuvchi faza barqarorligi (xona haroratida 24 soat davomida).

Xulosa qilib aytganda, «GEPA-SEEM» kombinatsiyalashgan infuzion eritmasi tarkibidagi MAGni (1-usul, λ = 254 nm) hamda glitsin va L-sistein gidroxloridni (2-usul, λ = 210 nm) miqdoriy tahlil qilish uchun ikkita YUXXS metodikasi yaratildi va ICH Q2(R1) talablariga to'liq muvofiq validatsiya qilindi. Har ikkala metodika ham yuqori spetsifiklik, aniqlik (OSO ≤ 0,22%), to'g'rilik (ajratib olish darajasi 98,5–101,5%) va ishchi diapazonda chiziqlilik ($R^2 > 0,999$) ni namoyon etdi; mustahkamlik bo'yicha keltirilgan tajribalar 1-usul uchun o'tkazilgan va ijobiy natija bergan. Olingan natijalar asosida «GEPA-SEEM» uchun sifat ko'rsatkichlarini belgilovchi korxona farmakopeya maqolasi tayyorlandi, u O'zbekiston Respublikasida preparatni davlat ro'yxatidan o'tkazish va uni boshqa mamlakatlar bozorlariga chiqarishda me'yoriy hujjat vazifasini bajarishi mumkin.

Bayonotlar va Deklaratsiyalar

Raqobatdosh manfaatlar: Mualliflar hech qanday raqobatdosh manfaatlar yo'qligini e'lon qiladilar.

Moliyalashtirish: Ushbu tadqiqot QK MAS'UL. JAM. «SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL»ning ichki ilmiy-tadqiqot faoliyati doirasida o'tkazildi. Tashqi moliyalashtirish olinmagan.

Etika xulosasi: Qo'llanilmaydi. Ushbu tadqiqotda insonlar yoki hayvonlar ishtirok etmagan.

Adabiyotlar

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

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.

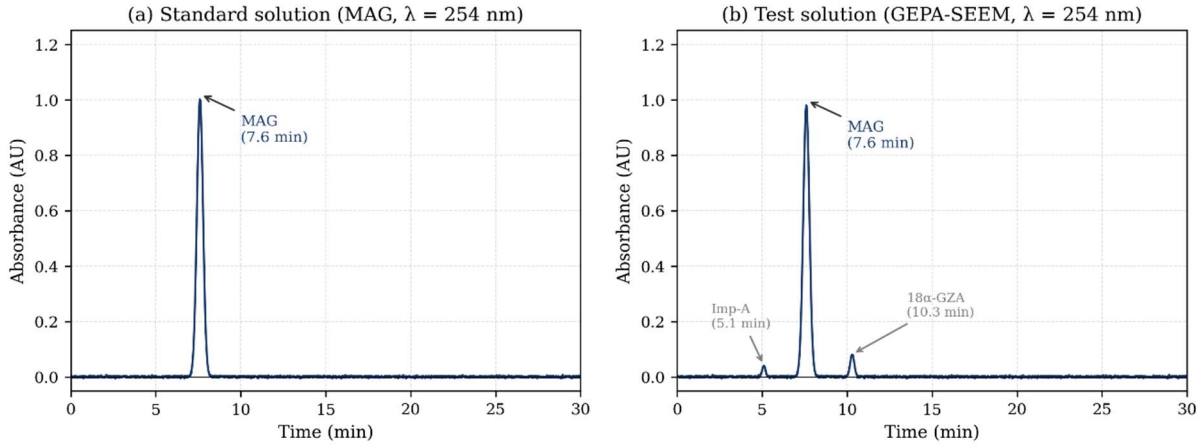


Рис. 1. Типичные хроматограммы ВЭЖХ по методу 1 (λ = 254 нм): (a) стандартный раствор МАГ; (b) испытуемый раствор «ГЕПА-SEEM». МАГ — моноаммония глицирризинат, 18α-ГЗК — 18α-глицирризиновая кислота, Пр-А — Примесь-А.

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.

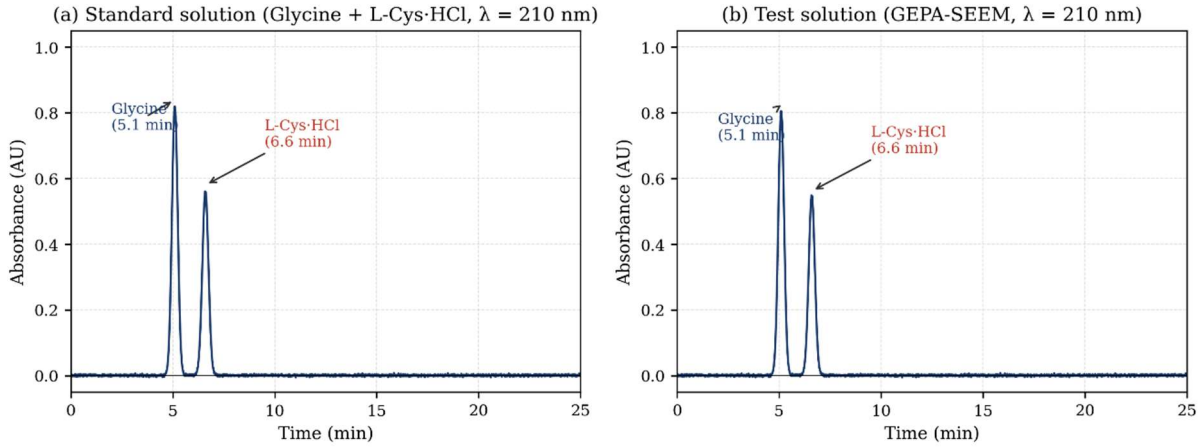


Рис. 2. Типичные хроматограммы ВЭЖХ по методу 2 (λ = 210 нм): (a) смешанный стандартный раствор (глицин + L-Cys·HCl); (b) испытуемый раствор «ГЕПА-SEEM».

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.

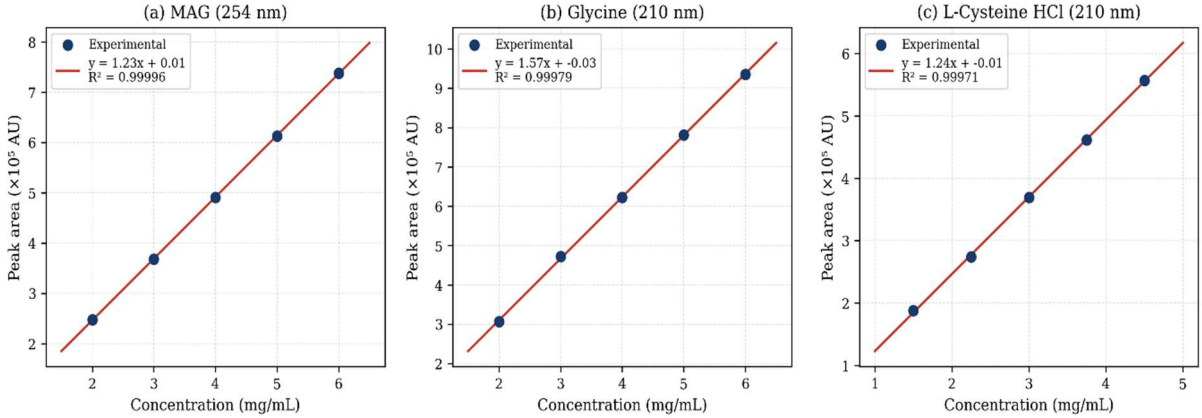


Рис. 3. Графики линейности для трёх АФИ: (a) МАГ (метод 1, λ = 254 нм); (b) глицин (метод 2, λ = 210 нм); (c) L-цистеина гидрохлорид (метод 2, λ = 210 нм). Каждая точка представляет среднее значение трёх инъекций; показаны линии регрессии.

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%.

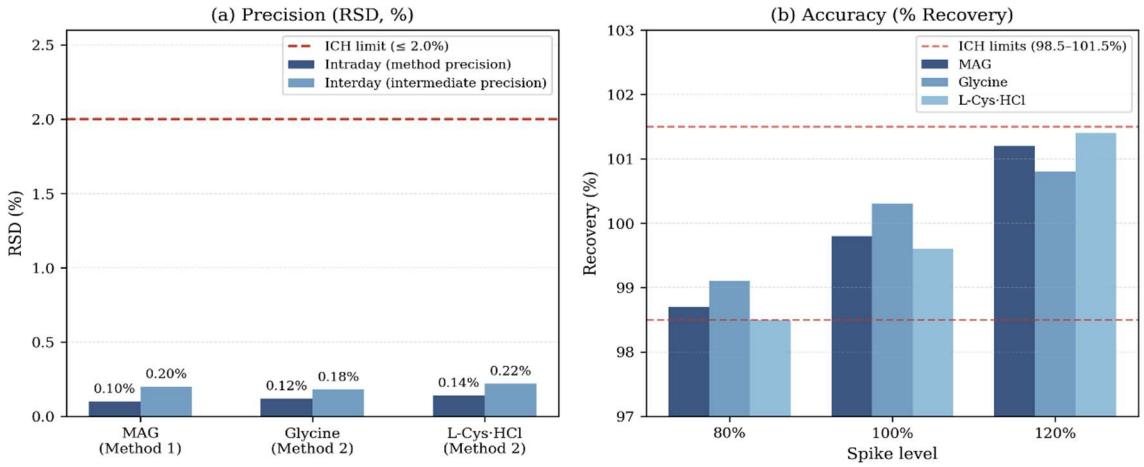


Рис. 4. (a) Прецизионность, выраженная как ОСО (%) для внутридневных и межсессионных измерений; красная пунктирная линия — предел ICH (2,0%). (b) Правильность, выраженная как процент извлечения на трёх уровнях добавок (80%, 100%, 120%); красные пунктирные линии — границы приемлемости ICH (98,5–101,5%).

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.

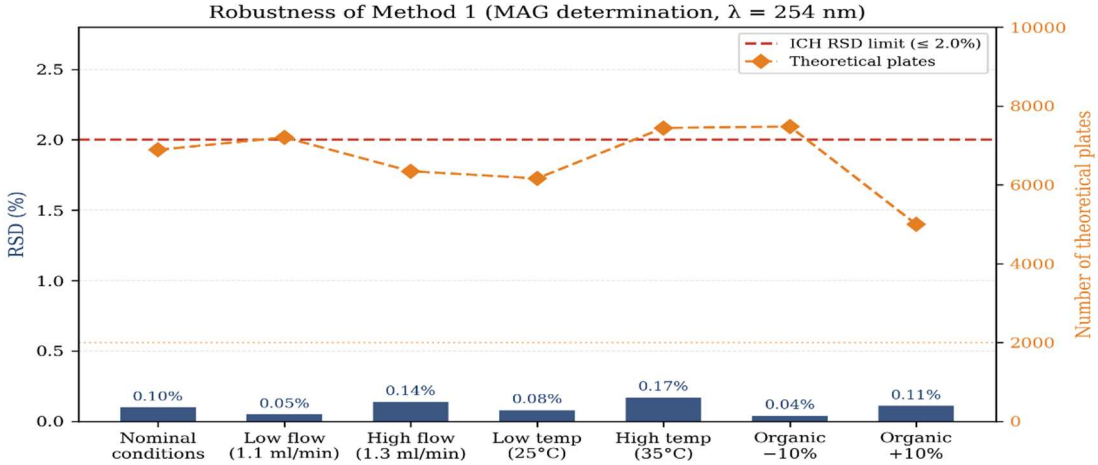


Рис. 5. Устойчивость метода 1 (МАГ, λ = 254 нм). Столбцы показывают ОСО (%) при различных условиях (левая ось); ромбы — число теоретических тарелок (правая ось). Красная пунктирная линия — предел ОСО по ICH (2,0%); оранжевая пунктирная линия — минимальный критерий числа тарелок (2000).

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

Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

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

DETERMINATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN A COMBINED INFUSION SOLUTION BY HPLC: METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION

Sunnatulla U. Tugizboev
Master's student at the Department of Inorganic Chemistry and Materials Science, Samarkand State University, Uzbekistan.
https://orcid.org/0009-0006-1496-6262

Golib K. Toshev
Director of Quality at "Samarkand-England Eco-medical", a joint venture established as a limited liability company, Uzbekistan.
https://orcid.org/0009-0000-9138-7658

Charos T. Toshtemirova
Acting Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Tashkent Pharmaceutical Institute, Doctor of Philosophy (PhD) in Chemical Sciences, Uzbekistan.
https://orcid.org/0009-0003-2785-0817
E-mail: toshtemirovac@gmail.com

Volidakhon G. Umirdinova
Independent Researcher at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Tashkent Pharmaceutical Institute, Uzbekistan
https://orcid.org/0009-0003-4352-7953

Sevara M. Xazratkulova
Associate Professor at the Department of Inorganic, Physical and Colloid Chemistry, Tashkent Pharmaceutical Institute, Doctor of Philosophy (PhD) in Chemical Sciences, Uzbekistan.
https://orcid.org/0000-0002-0993-4526

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

Annotation. Two HPLC methods for the determination of monoammonium glycyrrhizinate, glycine, and L-cysteine hydrochloride in the combined infusion solution «GEPA-SEEM» were developed and fully validated in accordance with ICH Q2(R1); the current approach was also considered in the context of ICH Q2(R2) and ICH Q14. Both methods demonstrated high precision (RSD ≤ 0.22%), accuracy (recovery 98.5–101.5%), and linearity ($R^2 > 0.999$). Based on the results, an in-house pharmacopoeial monograph was established for the product.

Keywords. HPLC; method validation; monoammonium glycyrrhizinate; infusion solution; hepatoprotective agent; ICH Q2(R2).

How to Cite

Tugizboev, S. U., Toshev, G. K., Toshtemirova, C. T., Umirdinova, V. G., & Xazratqulova, S. M. DETERMINATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN A COMBINED INFUSION SOLUTION BY HPLC: METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. *Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine*, *5*(5). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol5.iss5.2026.700

Introduction. Ensuring the safety and clinical effectiveness of parenteral medicines depends fundamentally on rigorous quality control. Solutions administered by intravenous infusion are held to particularly demanding standards, being required to be sterile, apyrogenic, and precisely dosed with respect to their active pharmaceutical ingredients (APIs) [1, 2]. Consequently, the establishment of validated

analytical procedures and pharmacopoeial specifications is an essential step in bringing any new pharmaceutical product to registration.

The subject of this study, «GEPA-SEEM» (JV LLC «SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL», Uzbekistan), is a newly developed combined infusion solution formulated with three active ingredients: monoammonium glycyrrhizinate (MAG, 0.8 mg/mL), glycine (8.0 mg/mL), and L-cysteine hydrochloride (0.6 mg/mL). MAG is known to produce a marked anti-inflammatory, antioxidant, and membrane-stabilizing effect on hepatocytes [3], while glycine, an amino acid engaged in hepatic detoxification pathways, contributes cytoprotective properties [4]. L-cysteine hydrochloride, for its part, is a sulfur-bearing amino acid acting as a glutathione precursor and thereby supplying intracellular antioxidant protection [5]. The combined presence of these three components defines the formulation of the product.

A review of the available literature revealed no validated quantitative HPLC procedure capable of determining all three APIs, either simultaneously or sequentially, within a combined infusion matrix. Accordingly, this work set out to develop two dedicated HPLC methods, to validate them in line with ICH Q2(R1) [6], taking into account the current principles of ICH Q2(R2) [7] and ICH Q14 [8], and to establish an in-house pharmacopoeial monograph for «GEPA-SEEM».

Research results

Test sample and composition

The «GEPA-SEEM» infusion solution manufactured by JV LLC «SAMARKAND-ENGLAND ECO-MEDICAL» (batch EX0110423, manufacture date 04/2023) served as the test article for this study. The quantitative composition of the product, expressed per 1 mL, is given in Table 1.

Table 1. Quantitative composition of the «GEPA-SEEM» infusion solution (per 1 mL).

Component	Amount	Role
Monoammonium glycyrrhizinate	0.80 mg	Active substance
Glycine	8.00 mg	Active substance
L-Cysteine hydrochloride	0.60 mg	Active substance
Sodium sulfite	0.80 mg	Excipient
Calcium disodium EDTA monohydrate	0.08 mg	Excipient
Sodium chloride	5.00 mg	Excipient
Water for injection	to 1 mL	Solvent

Chromatographic separation and specificity

The HPLC chromatograms obtained under Method 1 are shown in Figure 1. The MAG peak eluted at approximately 7.6 min, 18α-glycyrrhizinic acid at around 10.3 min (relative retention ~1.36), and Impurity-A at roughly 5.1 min (relative retention ~0.72). Blank and placebo chromatograms showed no interfering peaks at the MAG retention time, supporting the specificity of the method. 18α-glycyrrhizinic acid and Impurity-A were reported as additional chromatographic separation indicators; separate limits of detection or quantification for these impurities were not evaluated within this validation study.

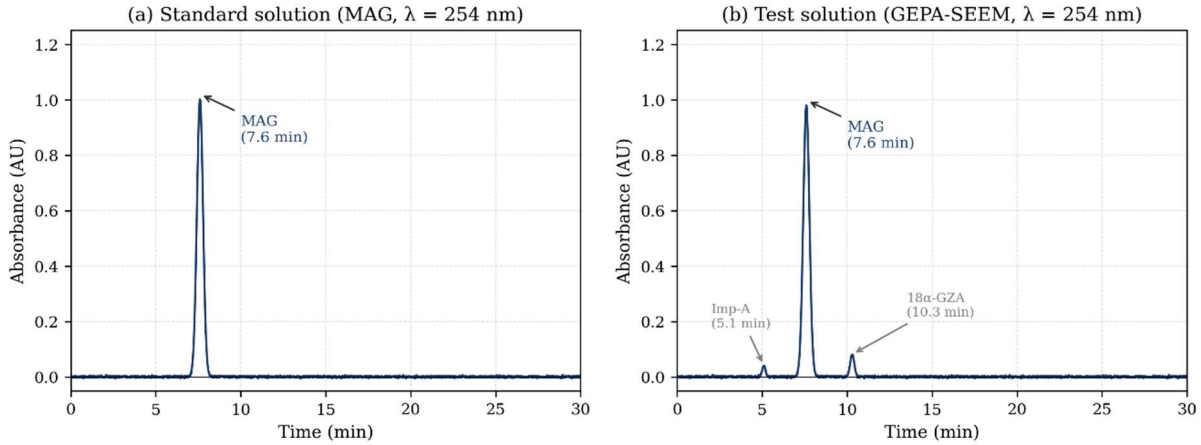


Fig. 1. Representative HPLC chromatograms by Method 1 (λ = 254 nm): (a) MAG standard solution; (b) «GEPA-SEEM» test solution. MAG — monoammonium glycyrrhizinate, 18α-GZA — 18α-glycyrrhizinic acid, Imp-A — Impurity-A.

Chromatograms recorded under Method 2 are presented in Figure 2. Glycine and L-Cys·HCl were separated to baseline (resolution factor greater than 3), with retention times of approximately 5.1 and 6.6 min, respectively. No interference from excipients was detected in the placebo chromatograms.

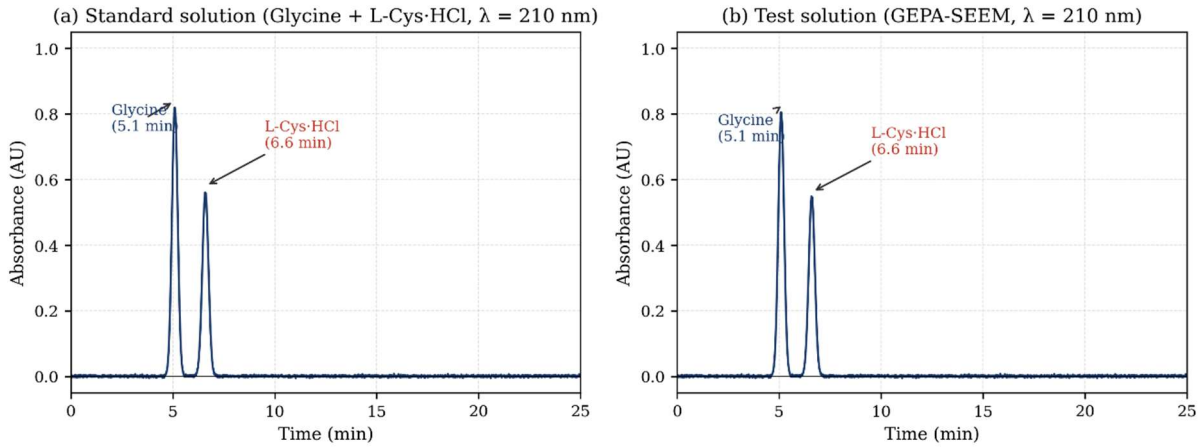


Fig. 2. Representative HPLC chromatograms by Method 2 (λ = 210 nm): (a) mixed standard solution (glycine + L-Cys·HCl); (b) «GEPA-SEEM» test solution.

System suitability and precision

Table 2 summarizes the system suitability parameters together with the precision data obtained for both methods.

Table 2. System suitability parameters and precision results.

Parameter	Method 1 (MAG)	Method 2 (Gly/Cys)	Criterion
Symmetry factor (USP)	1.124	1.18 / 1.15	≤ 2.5
Theoretical plates (1st inj.)	6888	5430 / 4870	≥ 2000
RSD, 5 injections (%)	0.10	0.12 / 0.14	≤ 2.0
Intermediate precision RSD (%)	0.20	0.18 / 0.22	≤ 2.0

Both methods satisfied all the required system suitability criteria. RSD values remained at or below 0.22% for both intra-day and inter-session measurements, indicating excellent repeatability.

Linearity and range

Calibration curves were constructed across 50–150% of the nominal working concentration of each API: 0.004 mg/mL for MAG (0.002–0.006 mg/mL), 0.004 mg/mL for glycine (0.002–0.006 mg/mL), and 0.003 mg/mL for L-Cys·HCl (0.0015–0.0045 mg/mL). Relative to the nominal concentrations in the product, these working concentrations correspond to overall dilution factors of 200-fold for MAG and L-Cys·HCl and 2000-fold for glycine. Representative linearity plots for these ranges appear in Figure 3.

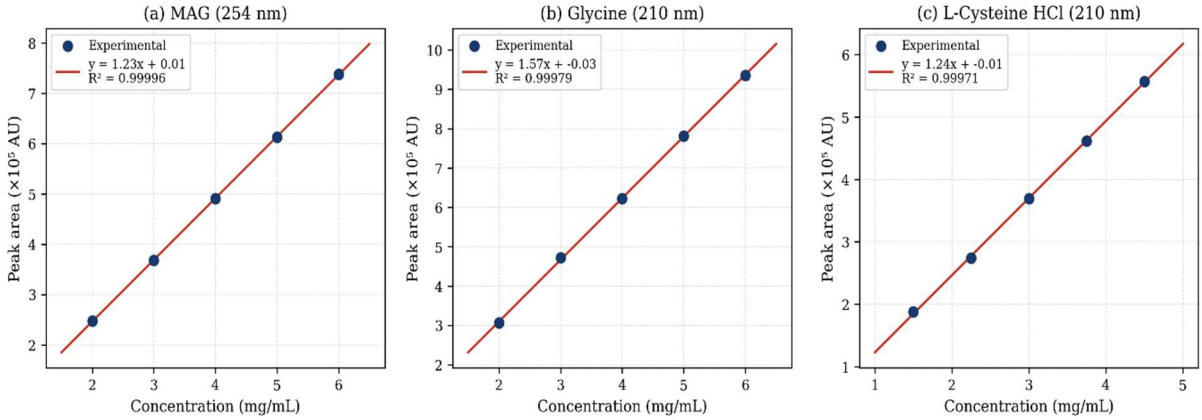


Fig. 3. Linearity plots for the three APIs: (a) MAG (Method 1, λ = 254 nm); (b) glycine (Method 2, λ = 210 nm); (c) L-cysteine hydrochloride (Method 2, λ = 210 nm). Each point represents the mean of triplicate injections; regression lines are shown.

Table 3. Linearity parameters for the three analytes.

Analyte	Range (mg/mL)	Slope	Intercept	R^2
MAG	0.002–0.006	1.23×10^8	2.1×10^3	> 0.999
Glycine	0.002–0.006	1.56×10^8	3.4×10^3	> 0.999
L-Cys·HCl	0.0015–0.0045	1.23×10^8	1.9×10^3	> 0.999

Precision and accuracy

Precision (RSD) and accuracy (percent recovery) data are shown in Figure 4. Across the three spiking levels tested (80%, 100%, and 120% of nominal concentration), recovery for each of the three APIs fell within 98.5–101.5%, satisfying the ICH Q2(R1) acceptance criteria, while RSD values stayed below 0.22% both within a day and between sessions.

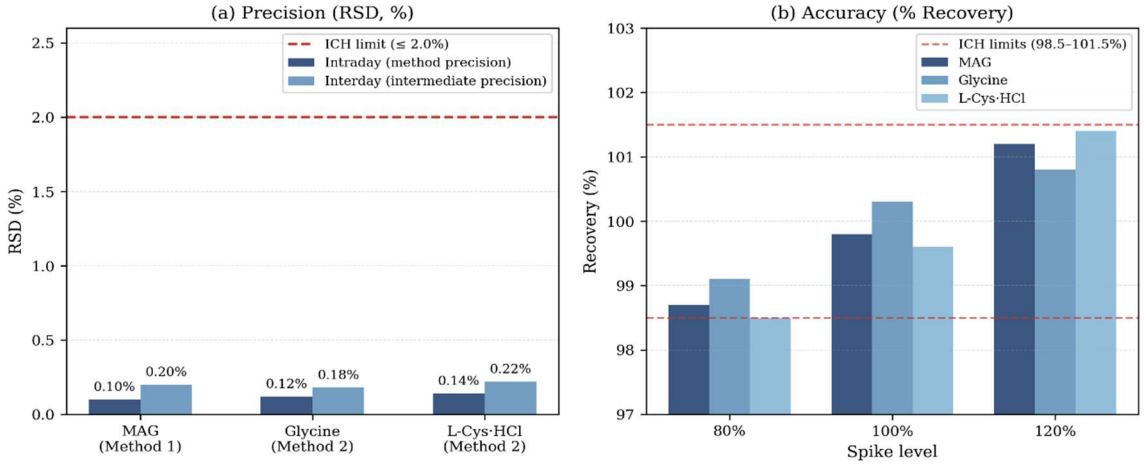


Fig. 4. (a) Precision expressed as RSD (%) for intra-day and inter-session measurements; the red dashed line indicates the ICH limit (2.0%). (b) Accuracy expressed as percent recovery at three spiking levels (80%, 100%, 120%); red dashed lines indicate the ICH acceptance range (98.5–101.5%).

Table 4. Accuracy results (percent recovery, n = 3 per level).

Analyte	Spike 80% (%)	Spike 100% (%)	Spike 120% (%)
MAG	98.7 ± 0.4	99.8 ± 0.3	101.2 ± 0.5
Glycine	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

Robustness

Robustness of Method 1 was assessed by deliberately altering the flow rate (1.1 and 1.3 mL/min), the column temperature (25 and 35 °C), and the proportion of organic modifier (±10%); the corresponding results appear in Figure 5 and Table 5.

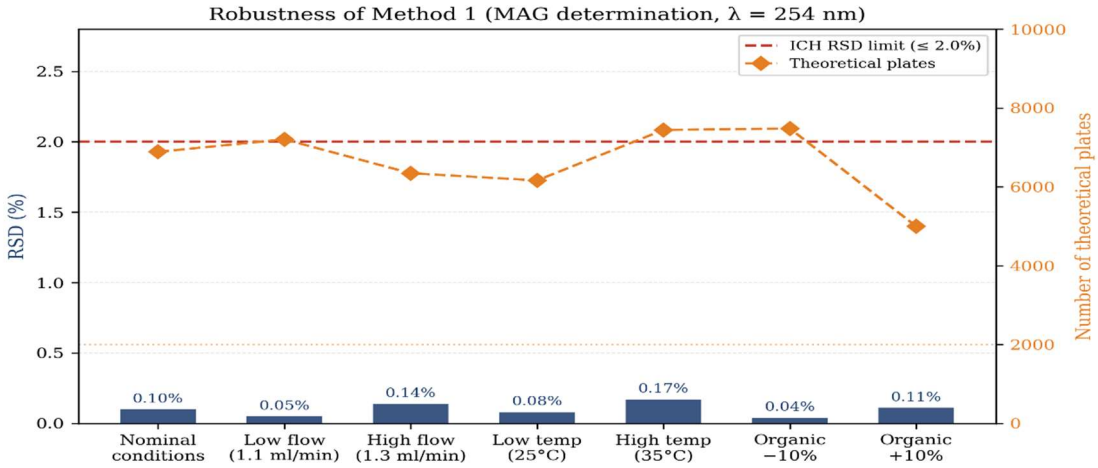


Fig. 5. Robustness of Method 1 (MAG, λ = 254 nm). Bars show RSD (%) under the various conditions (left axis); diamonds indicate the number of theoretical plates (right axis). The red dashed line marks the ICH RSD limit (2.0%); the orange dotted line marks the minimum theoretical-plate criterion (2000).

Table 5. Robustness data for Method 1 (MAG determination).

Condition	Symmetry factor	Theoretical plates	RSD (%)
Nominal conditions	1.124	6888	0.10
Low flow (1.1 mL/min)	1.126	7205	0.05
High flow (1.3 mL/min)	1.118	6346	0.14
Low temperature (25 °C)	1.099	6164	0.08
High temperature (35 °C)	1.145	7444	0.17
Organic solvent −10%	1.357	7480	0.04
Organic solvent +10%	1.375	4999	0.11

Across every condition tested for Method 1, RSD stayed at or below 0.20%, symmetry factors remained within the acceptable range, and the theoretical plate count never fell below 4999 — well above

the minimum requirement of 2000. These findings support the robustness of Method 1 to minor variations in analytical conditions.

Solution and mobile-phase stability

Both standard and test solutions proved stable at room temperature over a 24-hour period, with peak area changes staying under 0.5% relative to the initial values. Likewise, the acetic-acid-based mobile phase used in Method 1 retained its chromatographic performance throughout the same 24-hour interval.

In-house pharmacopoeial monograph (specification)

Drawing on the validation outcomes and the requirements set out in the State Pharmacopoeia of the Republic of Uzbekistan, a proposed in-house pharmacopoeial specification was formulated for the 100 mL «GEPA-SEEM» infusion solution (Table 6). pH, osmolality, bacterial endotoxins, sterility, and shelf life were not directly evaluated within the HPLC validation study and are therefore presented as proposed quality specifications for the in-house monograph.

Table 6. Specification of the «GEPA-SEEM» infusion solution (in-house monograph).

Test	Requirement	Control method
Description	Clear, colorless or slightly yellowish solution	Visual
Identification (MAG, Gly, L-Cys·HCl)	HPLC retention time matches the standard	HPLC, SPh RUz 2.2.29
Clarity	Clear (compared with water for injection)	SPh RUz 2.2.1
Color	Colorless or not darker than reference solution Y3	SPh RUz 2.2.2
pH	5.0–7.0	Potentiometric, SPh RUz 2.2.3
Visible particles	None permitted	Visual, SPh RUz 2.9.20
Sub-visible particles (100 mL): ≥10 µm; ≥25 µm	≤ 6000 particles/vial; ≤ 600 particles/vial	SPh RUz 2.9.19
Related substances: 18α-GZA; Imp-A; Any other; Total	≤10.0%; ≤5.0%; ≤2.0%; ≤7.0%	HPLC, SPh RUz 2.2.29
Density	1.000–1.020 g/cm³	SPh RUz 2.2.5
Osmolality	260–320 mOsmol/kg	Cryoscopic, SPh RUz 2.2.35
Bacterial endotoxins	≤ 0.3 EU/mL	SPh RUz 2.6.14
Sterility	Must be sterile	Membrane filtration, SPh RUz 2.6.1
Assay (per 1 mL): MAG; Glycine; L-Cys·HCl	0.00072–0.00088 g; 0.0072–0.0088 g; 0.00054–0.00066 g	HPLC, SPh RUz 2.2.29
Shelf life	2 years	—

Discussion

The pair of HPLC methods developed here addresses the analytical challenge created by the compositional heterogeneity of «GEPA-SEEM»: its three APIs — a triterpenoid glycoside, an aliphatic amino acid, and a sulfur-containing amino acid — differ substantially in chemical character, so that adequate separation and sensitive detection could only be achieved by applying distinct chromatographic conditions to each.

Method 1 relies on a reversed-phase C18 column combined with an aqueous–organic–acidic mobile phase, a configuration that yields excellent retention and peak symmetry for MAG while also permitting

detection of its principal impurity, 18α-glycyrrhizinic acid (relative retention 1.36). Detection was carried out at 254 nm, providing selective determination of MAG under the selected chromatographic conditions.

Method 2, by contrast, relies on an ion-pairing chromatographic strategy in which tetrabutylammonium hydroxide serves as the ion-pairing reagent, a step that proves essential for retaining the polar amino acids on the C18 stationary phase. Detection at 210 nm, using the short-wavelength UV absorption of free amino acids, enables glycine and L-Cys·HCl to be quantified together in a single analytical run. The two amino acid peaks are resolved to baseline (resolution factor greater than 3), which allows accurate peak integration free of mutual interference.

The proposed specification limits for API content are set at ±10% of nominal content. The pH range of 5.0–7.0 and osmolality range of 260–320 mOsmol/kg are presented as quality specifications; their physiological compatibility and conformity with an isotonic limit were not independently evaluated in the present study.

The methods described are ready for direct implementation in pharmaceutical quality-control laboratories and may further serve as a template for developing comparable analytical procedures for other multi-component hepatoprotective infusion products.

Experimental section

Reagents and reference standards

Reference standards: monoammonium glycyrrhizinate (batch AmGly04-03/23-02, purity 96.76%); glycine (batch Gly03-03/23-02, purity 99.90%); L-cysteine hydrochloride (batch Cys.Hyd02-03/23-02, purity 99.60%). Reagents: acetonitrile (HPLC grade, ≥99.9%, VWR Chemicals); tetrabutylammonium hydroxide solution 54–56% (Sigma-Aldrich); orthophosphoric acid (≥99.0%, Sigma-Aldrich); glacial acetic acid (Supelco); water for injection (conductivity ≤1.2 μS·cm^{-1}, produced by SEEM). All chemicals were used as received.

Preparation of standard and test solutions. The nominal working concentrations for the linearity range were calculated from the nominal product content: 0.004 mg/mL for MAG, 0.004 mg/mL for glycine, and 0.003 mg/mL for L-Cys·HCl. These values correspond to overall dilution factors of 200-fold, 2000-fold, and 200-fold, respectively. Accuracy testing at 80%, 100%, and 120% levels was performed with n = 3 at each level.

Equipment

Two Shimadzu HPLC systems were used: (1) Shimadzu LC-40 Nexera Lite (serial number L22155902420AE) and (2) Shimadzu LC-20 Prominence. Chromatographic separation was performed on a Shim-pack GIST C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; serial number 21C22070). Additional equipment: AUY 120 D analytical balance (Shimadzu); KQ-100 DE ultrasonic bath; Sartorius Stedim filter device; FiveEasy F20 pH meter (Mettler Toledo). All equipment was calibrated within the established schedule.

Chromatographic methods

Method 1 (MAG, λ = 254 nm): mobile phase water–acetonitrile–glacial acetic acid (61:38:1, v/v/v), flow rate 1.2 mL/min, Shim-pack GIST C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm). Method 2 (glycine and L-Cys·HCl, λ = 210 nm): mobile phase tetrabutylammonium hydroxide buffer (pH 7.0)–acetonitrile (95:5, v/v), flow rate 0.5 mL/min.

Validation methodology

Both methods were validated in accordance with ICH Q2(R1) [6], taking into account the principles of ICH Q2(R2) [7] and ICH Q14 [8], for the following parameters: specificity (by comparing blank and placebo solutions with the standard); precision (intra-day and inter-session repeatability based on 5 injections); accuracy (spike-recovery method at 80%, 100%, and 120% of nominal concentration, n = 3 per level); linearity (calibration at no fewer than five points over 50–150% of nominal concentration); robustness for Method 1 (by deliberately varying flow rate, column temperature, and organic modifier content); and solution and mobile-phase stability (at room temperature over 24 hours).

Conclusion. In summary, two HPLC methods were developed and fully validated in accordance with ICH Q2(R1) for the quantitative determination of MAG (Method 1, λ = 254 nm) and of glycine together with L-cysteine hydrochloride (Method 2, λ = 210 nm) in the combined infusion solution «GEPA-SEEM». Both methods proved specific, precise (RSD ≤ 0.22%), accurate (recovery 98.5–101.5%), and linear across the working concentration range ($R^2 > 0.999$); the robustness experiment reported here was performed for Method 1 and gave satisfactory results. An in-house pharmacopoeial monograph specifying the quality requirements for «GEPA-SEEM» was compiled and may provide a regulatory foundation for registering the product in the Republic of Uzbekistan and for extending its use to other markets.

References

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