



**DETERMINATION OF CYANOCOBALAMIN IN A  
PHARMACEUTICAL PRODUCT CONTAINING B-  
COMPLEX VITAMINS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY**

**Sobirjonov D.B.  
Shamsiyev Sh.Sh.**

Tashkent Pharmaceutical Institute, Tashkent, Republic of Uzbekistan  
e-mail: davron210999@gmail.com  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.19441554>

**ARTICLE INFO**

Received: 29<sup>th</sup> March 2026  
Accepted: 05<sup>th</sup> April 2026  
Online: 06<sup>th</sup> April 2026

**KEYWORDS**

“Nevrosit Forte”, high-  
performance liquid  
chromatography,  
cyanocobalamin,  
specification, validation,  
identification, quantitative  
analysis.

**ABSTRACT**

*This article describes the application of a high-performance liquid chromatography (HPLC) method as an alternative analytical approach for the analysis of the pharmaceutical product “Nevrosit Forte”. Cyanocobalamin (vitamin B12), one of the B-complex vitamins present in the formulation, was determined using liquid chromatography, and the developed analytical method was successfully validated.*

**B GURUH VITAMINLARI SAQLAGAN DORI VOSITASI TARKIBIDAGI  
SIANOKOBALAMINNING TAHLILINI YUQORI SAMARALI SUYUQLIK  
XROMATOGRAFIYASI YORDAMIDA ANIQLASH**

**Sobirjonov D.B.  
Shamsiyev Sh.Sh.**

Toshkent Farmasevtika Instituti, Toshkent shahri, O'zbekiston Respublikasi  
e-mail: davron210999@gmail.com  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.19441554>

**ARTICLE INFO**

Received: 29<sup>th</sup> March 2026  
Accepted: 05<sup>th</sup> April 2026  
Online: 06<sup>th</sup> April 2026

**KEYWORDS**

“Nevrosit Forte”, yuqori  
samarador suyuqlik  
xromatografiyasi,  
sianokobalamin,  
spetsifikatsiya, validatsiya,  
chinlik va miqdoriy tahlil.

**ABSTRACT**

*Maqolada “Nevrosit Forte” dori vositasining tahlilining muqobili sifatida YuSSX usulini tatbiq etish imkoniyatlari bayon etilgan. Nevrosit Forte dori vositasi tarkibidagi B guruh vitaminlaridan sianokobalamin suyuqlik xromatografiyasi yordamida aniqlanib, ushbu tadqiqot usuli validatsiya qilindi.*

**Kirish.** “Nevrosit Forte” dori vositasi tarkibida sianokobalamin ya’ni

vitamin B12 mavjud bo’lib u qon hosil bolishida, asab tizimini himoya qilishda,



yurak-qon tomir kasalliklarida, holsizlik va charchashni oldini olishda keng qo'llaniladi Sianokobalamin - bu B-guruh vitaminlaridan biri bo'lib, murakkab porfirin tuzilishga ega va kobalt ionini o'z ichiga oladi. U suvda eriydigan, nur va issiqlikka nisbatan sezgir modda bo'lib, tahlilda to'g'ri xromatografik sharoitlarni talab qiladi.

**Materiallar va usullar:** "Nevrosit Forte" ineksiya eritmasi 2 ml №3 (1x3), №5 (1x5) (ampulalar)" dori vositasi, sianokobalamin standart namunasi, Analitik tarozi, Yuqori samarali suyuqlik xromatografi, O'lchov kolbalari, Pipetkalar.

**Maqsad:** "Nevrosit Forte" ineksiya eritmasi tarkibidagi B guruhi vitaminlarini aniqlash usullarini takomillashtirishdan iborat. Amaldagi me'yoriy hujjatlarga ko'ra, tiamin (B1) va piridoksin (B6) miqdoriy tahlili yuqori samarador suyuqlik xromatografiyasi (YuSSX) usulida, sianokobalamin (B12) esa spektrofotometrik usulda aniqlanadi. Shu munosabat bilan, mazkur ishda sianokobalamin (B12) ni aniqlash uchun YuSSX asosidagi muqobil (alternativ) analitik uslubiyotni ishlab chiqish hamda ushbu uslubni validatsiya qilish maqsad qilib qo'yildi.

**Tadqiqot usullari, natijalar va ularning muhokamasi.**

#### CHINLIKNI ANIQLASH USULI

*Yuqori Samarador Suyuqlik Xromatografiyasi (ГФ ПУЗ, том 1, 2.2.29, Евр.Ф, том 1, 2.2.29).*

Chinlikni aniqlash tahlili sianokobalaminning miqdoriy tahlili bilan bir vaqtda amalga oshiriladi. Miqdoriy tahlil uchun tayyorlangan sinov eritmasining xromatogrammasidagi asosiy cho'qqining ushlanish vaqti

sianokobalaminning standart namunasi eritmasining xromatogrammasidagi asosiy cho'qqining ushlanish vaqtiga mos kelishi kerak.

#### MIQDORIY TAHLIL USULI

**Qurilma va xromatografik sharoitlar:**

- **YuSSX rusumi:** LC-20, сер. №L20105881329, ishlab chiqaruvchi: «Shimadzu Corp.» Япония, 2020 yil.

- **Qo'zg'almas faza:** 250x4,6mm, Perfectsil 100 ODS-3, 5mkm li kolonka;

- **Qo'zg'aluvchan faza (A):** 1 g Natriy 1-geksansulfonat 1l li o'lchov kolbaga solinadi, ustiga 500 ml tozalangan suvdan quyib, 10 ml sirka kislotasi (99%) solinadi, keyin esa trietilamin bilan pH=3.0 ga keltiriladi va belgisigacha suv bilan yetkaziladi. Ushbu erutma mobil faza sifatida ishlatiladi.

- **Qo'zg'aluvchan faza (B):** metanol

**Rejim: Chiziqli gradientli:**

Vaqt (min)	A-mobil faza (%)	B-mobil faza (%)
0	97	3
0.1	97	3
0.3	85	15
2.0	85	15
4.0	80	20
7.0	77	23
12.0	65	35
14.0	55	45
17.0	45	55
20.0	40	60
23.0	70	30
24.0	90	10
25.0	97	3
30.0	97	3

- **Oqim tezligi:** 1ml/min

- **Detektor (UV/Vis)/To'lqin**

**uzunligi:** UB 361nm



-Kolonka harorati: 25°C

-Yuboriladigan ineksiya hajmi:  
20 mkl

**Standart namuna tayyorlash:** 50 mg sianokobalamin standart namunasi 100 ml o'lchov kolbasiga solinib belgisigacha suv bilan yetkaziladi. Undan 10 ml olib, 100 ml o'lchov kolbasiga solinib, belgisigacha suv bilan yetkaziladi (kons.=0.05 mg/ml).

**Sinov eritmasini tayyorlash:** "Nevrosit Forte" dori vositasining in'eksion eritmasidan 10 ml namuna olinib, 100 ml o'lchov kolbasiga solib, belgisigacha suv bilan yetkaziladi (kons.=0.05mg/ml).

## VALIDATSIYA SINOVLARI

### 1. Spetsifikatsiya

#### 1.1. Faol moddaning chinlik tahlili

Sianokobalaminning chinlik tahlili yuqori samarador suyuqlik xromatografiyasi yordamida amalga oshirildi. Ushbu tahlil uchun sinov eritmalari "Miqdoriy tahlil" usuli asosida tayyorlandi va usul O'zbekiston Respublikasi Davlat farmakopeyasi 2.2.29 umumiy maqolasi talablariga muvofiq bajarildi:

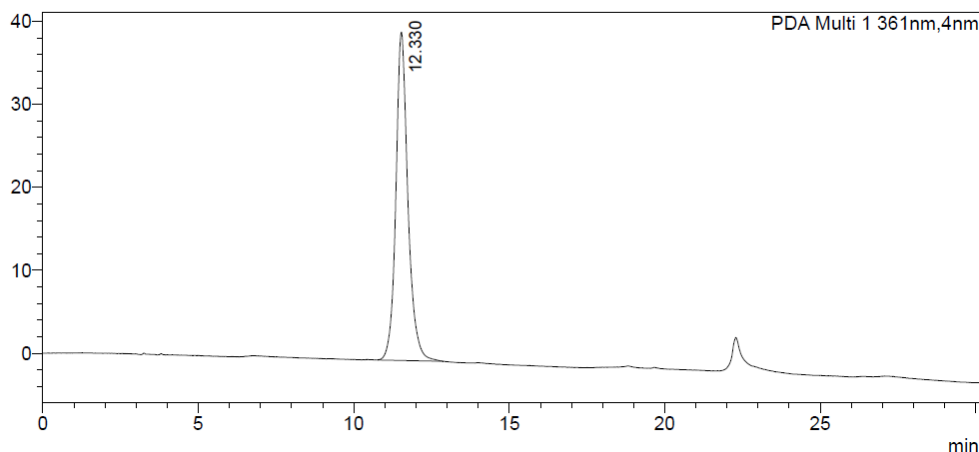
#### Jadval №1.

Chinlik tahlili:	Metodlar	Me'yoriy hujjat bo'yicha qo'yiladigan talab
- sianokobalamin	<i>O'zR DF, mom 1, 2.2.29, EuPh, mom 1, 2.2.29.</i>	Miqdoriy tahlil uchun tayyorlangan sinov eritmasining xromatogrammasidagi asosiy cho'qqining ushlanish vaqti sianokobalaminning standart namunasi eritmasining xromatogrammasidagi asosiy cho'qqining ushlanish vaqti(±0,2min) ga mos kelishi kerak.

Tahlil natijasida olingan xromatogrammalar quyida keltirilgan (1-rasm).

#### <Chromatogram>

mAU

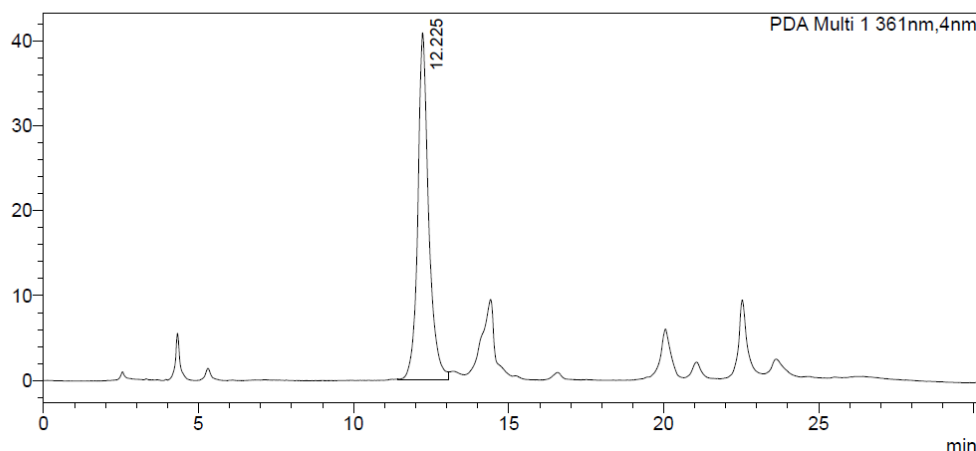


A) Standart eritmaning xromatogrammasi



<Chromatogram>

mAU



B) Sinov eritmaning xromatogrammasi

**1-rasm. Chinlik tahlili xromatogrammalari**

- tayyorlangan sinov eritmasining xromatogrammasidagi asosiy cho'qqining ushlanish vaqti sianokobalaminning standart namunasi eritmasining xromatogrammasidagi asosiy cho'qqining ushlanish vaqti 12,225 min ( $\pm 0,2$ min) ga mos keldi.

**2. Faol moddaning miqdoriy tahlili**

Sianokobalaminning miqdoriy tahlili yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi yordamida amalga oshirildi. Tahlil uchun kerak bo'lgan standart va sinov eritmalari "miqdoriy tahlil usuli" asosida tayyorlandi va quyidagi formula yordamida hisoblandi:

$$x = \frac{A1 * m0 * 10 * 100 * P * 2}{A0 * 100 * 100 * 10 * 100}$$

$$x = \frac{1172880 * 51.2 * 10 * 100 * 99.8 * 2}{1052085 * 100 * 100 * 10 * 100} = 1,14\text{mg}/2\text{ml}$$

Sianokobalaminning miqdoriy tahliliga ko'ra hisoblashlar natijalari

quyida keltirilgan va olingan natijalar me'yoriy hujjat talablariga mos keladi (2-jadval).

**3.To'g'rilik (aniqlik)**

Tahlillar namunaning "Miqdoriy tahlil usuli"da keltirilgan ketma-ketlik bo'yicha o'tkazildi, nominal tarkibning 80%, 100% va 120% miqdorida sinov eritmalari tayyorlandi. Hisoblashlar "2. Faol moddaning miqdoriy tahlili" bo'yicha amalga oshirildi.

**Qayta aniqlanish qiymati (R) quyidagi formula yordamida topiladi:**

$$R = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Bu yerda:

R (recovery) – qayta aniqlanish;

A - o'lchangan miqdor;

B – belgilangan (haqiqiy) daraja.

**Qabul qilish mezonlari:** 80 %, 100 % va 120 % li konsentratsiyalar qo'llanilganda qaytarib aniqlanish foizi 98,0 % dan 102,0 % gacha bo'lgan oraliqda bo'lishi kerak.

**Jadval №2.**

**Sianokobalaminning aniqlik tahliliga ko'ra qayta aniqlanish**



**qiymati bo'yicha natijalarni baholash  
jadvali**

Olingan miqdor, mkg/ml	Topilgan miqdor, mkg/ml	Absolyut xatolik, mkg/ml (d=c <sub>1</sub> -c <sub>2</sub> )	Nisbiy xatolik, %	Topilgan miqdor, %	Usulning metrologik xossalari (p=95%, n=6)
40,21	40,37	0,16	0,39	100,39	$\bar{x}=100,13\%$ $S=0,29, S\bar{x}=0,12$ $\Delta\bar{x}=0,31, \Delta x=0,85$ $RSD=0,29\%$ $E=0,13\%$
40,65	40,82	0,17	0,41	100,41	
50,14	50,26	0,12	0,23	100,23	
50,63	50,47	-0,16	-0,31	99,68	
60,62	60,53	-0,09	-0,14	99,85	
60,31	60,45	0,14	0,23	100,23	

Jadval natijalaridan ko'rinib turibdiki, sianokobalaminning o'rtacha qayta tiklanish qiymati foizda 100,13% ni tashkil etadi, bu esa usulning to'g'riligini tasdiqlaydi.

**3. Takrorlanuvchanlik**

Sinov dori vositasining "Miqdoriy tahlil usuli"ga muvofiq o'tkaziladi. Bunda har biri sinov konsentratsiyasining 100 % ini o'z ichiga olgan 6 ta sinalayotgan eritma tayyorlanadi. Natijalar bir kun davomida ikki nafar kimyogar tomonidan olindi. Hisob-kitoblar "Miqdoriy tahlil" usuliga muvofiq amalga oshirildi.

**Qabul qilish me'yorlari:**

6 ta o'lchov uchun parallel aniqlashlarning nisbiy standart og'ishi (RSD) 2 % dan oshmasligi lozim.

**Nisbiy standart og'ishi (RSD)**

$S = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$	$Sr = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$
---	---------------------------------------

Bu yerda:

S – Standart chetlanish,

Sr – Nisbiy standart chetlanish,

X<sub>i</sub> – Olingan qiymat,

$\bar{X}$  – O'rtacha qiymat,

n – Tahlil qilinayotgan namunalar soni.

**Sianokobalamin uchun  
natijalarni baholash**



№	Umumiy cyanocobalamin miqdori, mg/2ml	Kimyogar 1		Umumiy cyanocobalamin miqdori, mg/2ml	Kimyogar 2		
		Aniqlangan miqdor			Aniqlangan miqdor		
		mg/2ml	%		mg/2ml	%	
1	1.000	0.994	99.40	1.000	1.006	100.60	
2	1.000	1.005	100.50	1.000	1.002	100.20	
3	1.000	1.002	100.20	1.000	1.009	100.90	
4	1.000	1.009	100.90	1.000	1.011	101.10	
5	1.000	0.992	99.20	1.000	0.994	99.40	
6	1.000	0.997	99.70	1.000	1.004	100.40	
O'rtacha qiymat		1.000	99.98	O'rtacha qiymat		100.43	
Standart chetlanish, %			0.66	Standart chetlanish, %			0.60

Takrorlanuvchanlik bir xil laboratoriya sharoitida, bir xil uskunadan foydalangan holda, ikki nafar kimyogar tomonidan ketma-ket 6 ta sinov o'tkazish orqali tekshirildi. Ikki kimyogar tomonidan olingan natijalar uchun nisbiy standart chetlanish mos ravishda 0,66 % va 0,60 % ni tashkil etdi va bu qiymatlar me'yoriy talablar shartini qanoatlantiradi.

#### 4. Chiziqlilik

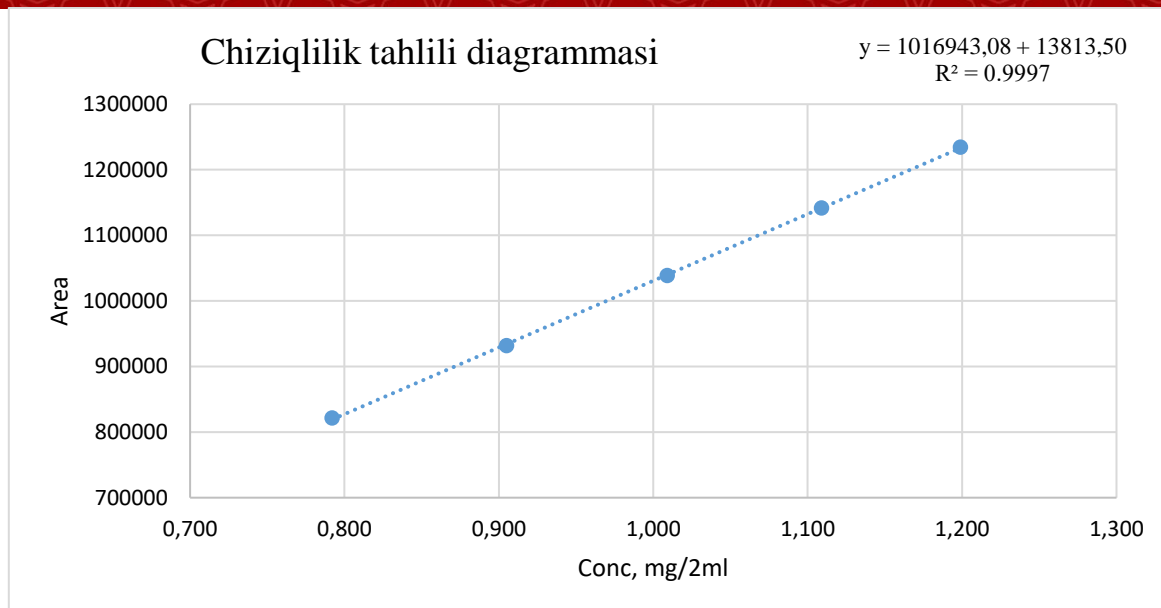
Sinov dori vositasining «Miqdoriy tahlil» usuli bo'yicha o'tkazildi, nominal tarkibga nisbatan 80%, 90%, 100%, 110% va 120% miqdorlarda sinov eritmalari tayyorlandi. Hisoblashlar «Miqdoriy tahlil» usuli asosida bajarildi.

«Chiziqlilik» sinovi uchun berilgan konsentratsiyalardagi sinov eritmalarini tayyorlash.

№	Namuna				
	Belgilangan konsentratsiya, mg/2ml		Area	Belgilangan konsentratsiya, mg/2ml	
	mg/2ml	%		mg/2ml	%
1	0.8	80	815353	0.792	99.00
2	0.9	90	931685	0.905	100.56
3	1.0	100	1038751	1.009	100.90
4	1.1	110	1141700	1.109	100.82
5	1.2	120	1234354	1.199	99.92

Baholash konsentratsiya va choqqi osti maydoni (area) o'rtasidagi chiziqli bog'liqlikni regressiya tenglamasi

yordamida aniqlash orqali amalga oshirildi.



3-rasm. Chiziqlilik tahlili.

Qabul qilish mezonni sifatida korrelyatsiya (determinatsiya) koeffitsiyenti  $r^2 \geq 0,99$  deb belgilandi, bu ICH Q2(R1)/Q2(R2) talablariga muvofiq laboratoriya amaliyotida keng qo'llaniladigan mezon hisoblanadi. Olingan natijalarga ko'ra, chiziqli regressiya tenglamasi asosida hisoblangan determinatsiya koeffitsiyenti  $r^2 = 0,9997$  ni tashkil etdi, bu esa usulning yuqori darajada chiziqlilikini tasdiqlaydi.

### XULOSA

"Nevrosit Forte" inyeksiya eritmasi 2 ml №3 (1x3), №5 (1x5) (ampulalar)" dori vositasi uchun **haqiqiylik va miqdoriy tarkibni aniqlash usullarini**

**validatsiya qilish** natijasida validatsion tavsiflar tasdiqlandi: To'g'rilik (aniqlik):  $100,13\% \pm 0,29\%$ , takrorlanuvchanlik: RSD = 0,60–0,66%, chiziqlilik:  $r^2 = 0,9997$ .

Taklif etilgan muqobil usul dorivor preparatlar sifatini nazorat qilishda samarali vosita bo'lib xizmat qilishi mumkin. Bu nafaqat laboratoriya ishlarining samaradorligini oshiradi, balki ishlab chiqarish sharoitida sifat nazoratini tezkor va aniq amalga oshirish imkonini beradi.

Mazkur analitik usulbar validatsiya ko'rsatkichlari bo'yicha me'yoriy talablarga to'liq mos keladi, ya'ni: YuSSX usulining tanlangan rejimlari inyeksiya eritmasidagi **sianokobalamin** miqdori hamda haqiqiylikni aniqlash uchun yaroqlidir.

### References:

1. Sánchez-Rodríguez J., et al. "Validated HPLC-UV method for cyanocobalamin in pharmaceuticals," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012.
2. Chen T., et al. "HPLC-ESI-MS determination of B-vitamins in complex matrices," *Anal. Chim. Acta.*, 2017.
3. Van Loon A.J., et al. "Sample preparation techniques in vitamin analysis," *J. Chromatogr. B.*, 2015.



4. ICH Q2(R1) "Validation of Analytical Procedures," 2005.
5. European Pharmacopoeia / British Pharmacopoeia — Cyanocobalamin assay.