

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК 615.07:615.32:543.544

МПК А61К36/484, В01D11/02, А61К125/00

Жусупова Махаббат Богумбаевна

**«РАЗРАБОТКА СПЕЦИФИКАЦИИ КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТА КОРНЯ СОЛОДКИ»**

7М10104 – «Фармация»

Диссертационная работа
на соискание степени магистра медицинских наук

Научный руководитель: к. фарм. наук, доцент Тогаева Надира
Ерболсыновна

Астана 2026 г.

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	8
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	10
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ	11
ВВЕДЕНИЕ	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Герпесвирусные инфекции: распространенность и проблемы терапии	16
1.2. Современные противовирусные препараты и ограничения монотерапии при герпесвирусных инфекциях.....	16
1.3. Ацикловир: фармакологические и физико-химические характеристики	18
1.4. Глицирризиновая кислота и ее соли: фармакологические и физико-химические свойства.....	19
1.5. Аскорбиновая кислота в составе комбинированных лекарственных препаратов	19
1.6. Обоснование комбинированного применения активных компонентов	21
1.7. Современные подходы к стандартизации и контролю качества комбинированных лекарственных препаратов.....	21
1.8. Аналитические методы определения активных фармацевтических ингредиентов в комбинированных лекарственных формах	22
1.9. Преимущества ВЭЖХ при анализе комбинированных препаратов..	23
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	25
2.1. Объекты исследования.....	25
2.2. Получение модельного образца комбинированного сиропа	26
2.3. Оборудование, реактивы и материалы.....	26
2.3.1 Оборудование и материалы	26
2.3.2 Стандартные образцы (референс-субстанции)	26
2.3.3 Реактивы	26
2.4 Методы исследования	27
2.4.1 Органолептические показатели	27
2.4.2 Определение показателей Ph	27
2.4.3 Относительная плотность	27
2.4.4 Вязкость	27
2.4.5 Однородность дозирования	27
2.4.6 Устойчивость	27
2.4.7 Дисперсность	27
2.4.8 Объем содержимого контейнера	28
2.4.9 Хроматографический анализ (ВЭЖХ-DAD).....	28
2.4.10 Микробиологическая чистота.....	28
2.5 Статистическая обработка результатов	28
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
3.1 Результаты физико-химических исследований	29

3.1.1	Определение pH.....	29
3.1.2	Определение относительной плотности	29
3.1.3	Определение вязкости	29
3.1.4	Оценка устойчивости суспензионной системы	30
3.1.5	Определение дисперсности (размера частиц).....	30
3.1.6	Однородность дозирования	30
3.2	Результаты ВЭЖХ-анализа.....	31
3.2.1	Условия хроматографирования	31
3.2.2	Приготовление растворов и пробоподготовка.....	32
3.2.3	Идентификация действующих веществ методом ВЭЖХ-УФ/DAD ...	34
3.2.4	Количественное определение действующих веществ	35
3.3	Валидация методики ВЭЖХ-УФ/DAD	36
3.3.1	Пригодность хроматографической системы.....	36
3.3.2	Специфичность.....	39
3.3.3	Линейность	43
3.3.4	Повторяемость.....	46
3.3.5	Правильность	49
3.3.6	Робастность.....	51
3.4.	Результаты исследования микробиологической чистоты	54
3.5	Разработка спецификации качества	55
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	58
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	59
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	60
	ПРИЛОЖЕНИЕ	66

Актуальность темы:

Разработка эффективных и хорошо переносимых лекарственных препаратов является центральной задачей современной фармацевтической науки. В настоящее время установлена взаимосвязь между приверженностью пациентов к терапии и ее эффективностью. Применение комбинированных лекарственных препаратов (КЛП) позволяет повысить эффективность проводимой терапии путем потенциального синергизма фиксированных комбинаций, повышения комплаенса пациентами за счет упрощения режима дозирования. Наряду с развитием синтетических лекарственных средств сохраняется интерес к биологически активным соединениям природного происхождения, обладающим широким спектром фармакологической активности. В контексте вектора развития современной фармации разработка комбинированных лекарственных препаратов на основе растительных экстрактов рассматривается как перспективное направление, которое позволит расширить возможности комплексной фармакотерапии.

Экстракт корня солодки обладает хорошо изученными фармакологическими свойствами, включая противовирусное, иммуномодулирующее, антиоксидантное, противовоспалительное, гепатопротекторное действие, что позволяет рассматривать его как перспективный компонент комбинированных лекарственных препаратов. Основным биологически активным компонентом экстракта корня солодки является глицирризиновая кислота (ГК). Относительно низкая вероятность токсичности и широкий спектр воздействия на вирусные возбудители позволяет рассматривать глицирризиновую кислоту как перспективный компонент при лечении различных вирусных инфекций.

Герпесвирусные инфекции (ГВИ) широко распространены и относятся к социально значимым заболеваниям. Высокая контагиозность и способность поражать различные органы и системы делают герпесвирусные инфекции серьезной междисциплинарной проблемой современного здравоохранения. Иммунная система играет ключевую роль в регуляции активности герпесвирусной инфекции и формировании ее клинических проявлений. Персистенция вируса связана с его способностью уклоняться от распознавания со стороны иммунной системы. Хроническое персистирование вируса может приводить к развитию вторичных иммунных нарушений, что способствует реактивации латентной инфекции и учащению рецидивов.

Ацикловир (АЦ) является препаратом с доказанной эффективностью и рекомендован клиническими протоколами и международными руководствами для этиотропной терапии герпесвирусных инфекций. Однако его действие направлено на активно реплицирующиеся вирусы и не обеспечивает элиминацию латентно персистирующей инфекции, что обуславливает возможность рецидивирующего течения заболевания. Кроме того, при длительном применении возможно развитие лекарственной резистентности.

В связи с этим для успешной терапии ГВИ необходим комплексный подход, который будет включать противовирусный препарат и средства, способные модулировать иммунный ответ и повышать резистентность макроорганизма.

Для коррекции иммунного статуса человека и снижения выраженности окислительного стресса при вирусных инфекциях применяется природный антиоксидант аскорбиновая кислота (АК). Аскорбиновая кислота представляет собой органическое соединение, которое обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим действием. Она участвует в защите клеток от действия активных форм кислорода, способствует поддержанию функциональной активности иммунной системы и участвует в процессах синтеза интерферона. Включение аскорбиновой кислоты в состав комбинированного препарата может способствовать повышению устойчивости организма к инфекционным воздействиям.

Применение комплексного препарата на основе фиксированной комбинации глицирризиновой кислоты, ацикловира и аскорбиновой кислоты представляет интерес в связи с сочетанием противовирусных, антиоксидантных и иммуномодулирующих свойств действующих веществ. Выбор лекарственной формы в виде суспензионного сиропа обусловлен необходимостью обеспечения удобства дозирования и применения у пациентов детского и пожилого возраста, а также у лиц с дисфагией. Разработка спецификации качества и стандартизация комбинированного лекарственного препарата направлена на обеспечение надлежащего контроля идентичности, количественного содержания действующих веществ в соответствии с требованиями нормативной документации. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшей стандартизации комбинированного лекарственного препарата и разработке нормативной документации.

Цель исследования:

Разработка научно обоснованной спецификации качества и стандартизация комбинированного лекарственного препарата в форме суспензионного сиропа с использованием современных физико-химических методов анализа.

Задачи исследования:

1. Разработка методики идентификации ацикловира, аскорбиновой кислоты и натрия глицирризината в составе комбинированного лекарственного препарата.
2. Разработка методики количественного определения действующих веществ комбинированного лекарственного препарата методом ВЭЖХ в УФ области с применением диодно-матричного детектора (DAD).
3. Валидация разработанной аналитической методики.
4. Провести оценку микробиологической чистоты препарата.

5. Разработка спецификации качества комбинированного лекарственного препарата.

Объект и предмет исследования:

Суспензионный сироп, содержащий глицирризиновую кислоту, ацикловир и аскорбиновую кислоту.

Методы исследования:

1. Анализ научных публикаций, нормативных документов и фармакопейных стандартов.
2. Физико-химические методы анализа: pH, плотность, вязкость. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) для идентификации и количественного определения активных веществ.
3. Тесты на микробиологическую чистоту.
4. Наблюдение изменений отдельных физико-химических и микробиологических показателей препарата в процессе хранения.

Научная новизна:

Впервые разработана спецификация качества для комбинированного лекарственного препарата в форме суспензионного сиропа, содержащего ацикловир, аскорбиновую кислоту и натрия глицирризинат. Разработаны и валидированы аналитические методики качественного и количественного определения действующих веществ в составе КЛП-суспензионного сиропа.

Разработан и запатентован способ совместного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината в сиропе.

Практическая значимость:

Разработанные методики качественного и количественного определения действующих веществ, а также предложенные показатели качества могут быть использованы при разработке нормативной документации, регламентирующей качество комбинированного лекарственного препарата в форме суспензионного сиропа, и внедрены в практику аналитических лабораторий.

База проведения исследований:

Кафедра фармацевтических дисциплин НАО «Медицинский университет Астана»

Хроматографические исследования проводились на базе лаборатории ProLubSupport в рамках договора оказания услуг №TRAIN-2025-530 с использованием жидкостного хроматографа 1260 Infinity II.

Микробиологические исследования проводились на базе филиала РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы» с использованием

стандартизированных микробиологических методов анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан метод ВЭЖХ-УФ/DAD для одновременного качественного и количественного определения ацикловира, аскорбиновой кислоты и натрия глицирризината в составе комбинированного лекарственного препарата в форме суспензионного сиропа.
2. Результаты валидации разработанного метода ВЭЖХ-УФ/DAD по показателям специфичности, линейности, правильности, прецизионности и робастности, а также оценка пригодности хроматографической системы.
3. Результаты оценки микробиологической чистоты, подтверждающие соответствие препарата требованиям фармакопейных стандартов.
4. Сформированная спецификация качества комбинированного лекарственного препарата.

Объем и структура диссертации:

Полный объем диссертации составляет 66 страниц, включая 22 таблицы, и 31 рисунок. Список использованной литературы включает 80 источников.

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованных источников и приложений.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна и практическая значимость работы, а также представлены положения, выносимые на защиту.

В главе 1 представлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по вопросам герпесвирусных инфекций, современным подходам к их терапии, фармакологическим и физико-химическим свойствам ацикловира, аскорбиновой кислоты и натрия глицирризината. Также рассмотрены современные подходы к стандартизации комбинированных лекарственных препаратов и обосновано применение ВЭЖХ-УФ/DAD как основного метода аналитического контроля.

В главе 2 описаны объект исследования, материалы, оборудование, реактивы и методы анализа. Представлены условия проведения физико-химических, в том числе хроматографических, и микробиологических исследований комбинированного суспензионного сиропа.

В главе 3 приведены результаты экспериментальных исследований, включая оценку физико-химических показателей суспензионного сиропа, результаты ВЭЖХ-анализа, валидации методики, микробиологической чистоты и обоснование спецификации качества комбинированного лекарственного препарата.

В заключении сформулированы основные результаты проведенного исследования и выводы.

В приложении представлен патент на способ совместного определения

аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината методом ВЭЖХ, подтверждающий научную новизну и практическую значимость проведенного исследования.

Апробация диссертации:

Основные положения диссертационной работы обсуждены на заседаниях кафедры фармацевтических дисциплин НАО «Медицинский университет Астана».

Отдельные результаты исследования отражены в тезисе, опубликованном в сборнике материалов Международной научно-практической конференции «Биологическая безопасность в условиях глобальных угроз: научно-технологические подходы противодействия» (г. Астана, 27-28 ноября 2025 г.) по теме «Роль глицирризиновой кислоты в повышении эффективности ацикловира в составе комбинированного противовирусного сиропа».

Результаты диссертационной работы положены в основу методических рекомендаций по применению высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтическом анализе, планируемого к внедрению в образовательный процесс.

Получен патент Республики Казахстан на способ совместного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината в сиропе, что подтверждает научную новизну и практическую значимость результатов исследования.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативные правовые акты Республики Казахстан:

1. Приказ МЗ РК от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020: «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств»
2. Приказ МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20: «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств»

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АФИ — активный фармацевтический ингредиент
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-УФ/DAD — высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием с диодно-матричным детектированием
DAD — диодно-матричный детектор
ГВИ — герпесвирусные инфекции
ГК — глицирризиновая кислота
HSV — вирус простого герпеса (Herpes simplex virus)
HSV-1 — вирус простого герпеса 1 типа
HSV-2 — вирус простого герпеса 2 типа
VZV — вирус варицелла-зостер (Varicella zoster virus)
CMV — цитомегаловирус (Cytomegalovirus)
EBV — вирус Эпштейн-Барр (Epstein-Barr virus)
HHV — вирус герпеса человека (Human herpesvirus)
pH — водородный показатель (кислотность среды)
UV — ультрафиолетовая область спектра
ТСХ — тонкослойная хроматография
SST — пригодность хроматографической системы (System Suitability Test)
RSD — относительное стандартное отклонение (Relative Standard Deviation)

СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Таблица 1- Основные биологические и патогенетические характеристики герпесвирусов человека	18
Таблица 2- Условия хроматографирования	31
Таблица 3- Программа градиентного элюирования	32
Таблица 4- Калибровочные уровни.....	34
Таблица 5- Пригодность системы для аскорбиновой кислоты.....	38
Таблица 6- Пригодность системы для ацикловира	38
Таблица 7- Пригодность системы для натрия глицирризинат	38
Таблица 8- Результаты оценки специфичности методики.....	37
Таблица 9- Результаты оценки линейности для аскорбиновой кислоты	45
Таблица 10- Результаты оценки линейности для ацикловира	45
Таблица 11- Результаты оценки линейности для натрия глицирризината .	46
Таблица 12- Повторяемость для аскорбиновой кислоты	48
Таблица 13- Повторяемость для ацикловира.....	48
Таблица 14- Повторяемость для натрия глицирризината	48
Таблица 15- Правильность для аскорбиновой кислоты	51
Таблица 16- Правильность для ацикловира.....	51
Таблица 17- Правильность для натрия глицирризината	51
Таблица 18- Робастность для аскорбиновой кислоты.....	53
Таблица 19- Робастность для ацикловира.....	54
Таблица 20- Робастность для натрия глицирризината	54
Таблица 21- Результаты исследования микробиологической чистоты.....	56
Таблица 22- Спецификация качества комбинированного лекарственного препарата	58
Рисунок 1- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)	36
Рисунок 2- Хроматограмма рабочего раствора образца сиропа	36
Рисунок 3- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)-1.....	39
Рисунок 4- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)-2.....	39
Рисунок 5- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)-3.....	39
Рисунок 6- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)-4.....	39
Рисунок 7- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)-5.....	40
Рисунок 8- Хроматограмма холостой пробы перед проведением анализов	42
Рисунок 9- Хроматограмма модели плацебо сиропа	42
Рисунок 10- Хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)	42
Рисунок 11- Хроматограмма рабочего раствора образца сиропа	43
Рисунок 12- Хроматограмма холостой пробы для оценки переноса	43
Рисунок 13- Хроматограмма пика и УФ-спектра аскорбиновой кислоты..	43
Рисунок 14- Хроматограмма пика и УФ-спектра ацикловира.....	44
Рисунок 15- Хроматограмма пика и УФ-спектра натрия глицирризината .	44
Рисунок 16- График калибровочной кривой аскорбиновой кислоты.....	46
Рисунок 17- График калибровочной кривой ацикловира	47
Рисунок 18- График калибровочной кривой натрия глицирризината.....	47
Рисунок 19- Хроматограмма образца сиропа(1).....	49

Рисунок 20- Хроматограмма образца сиропа(2).....	49
Рисунок 21- Хроматограмма образца сиропа(3).....	49
Рисунок 22- Хроматограмма образца сиропа(4).....	50
Рисунок 23- Хроматограмма образца сиропа(5).....	50
Рисунок 24- Хроматограмма образца сиропа(6).....	50
Рисунок 25- Хроматограмма образца сиропа на уровне 80%.....	52
Рисунок 26- Хроматограмма образца сиропа на уровне 100%.....	52
Рисунок 27- Хроматограмма образца сиропа на уровне 120%.....	52
Рисунок 28- Хроматограмма образца сиропа при скорости подвижной фазы 0,45 мл/мин	54
Рисунок 29- Хроматограмма образца сиропа при скорости подвижной фазы 0,55 мл/мин	55
Рисунок 30- Хроматограмма образца сиропа при рН подвижной фазы 2,9	55
Рисунок 31- Хроматограмма образца сиропа при рН подвижной фазы 3,05..	55

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы:

Разработка эффективных и безопасных лекарственных препаратов является одной из приоритетных задач современной фармацевтической науки. В настоящее время установлена взаимосвязь между приверженностью пациентов к терапии и ее эффективностью. Применение комбинированных лекарственных препаратов позволяет повысить эффективность проводимой терапии путем потенциального синергизма действующих веществ и повышения комплаенса пациентов вследствие упрощения режима дозирования. Несмотря на успехи в создании синтетических препаратов, интерес к фитопрепаратам, обладающим доказанной эффективностью и безопасным профилем, также растет. В контексте вектора развития современной фармации разработка комбинированных лекарственных препаратов на основе растительных экстрактов рассматривается как перспективное направление, которое позволит расширить возможности комплексной фармакотерапии.

Экстракт корня солодки обладает хорошо изученными фармакологическими свойствами, включая противовирусное, противовоспалительное, иммуномодулирующее и антиоксидантное действия, и рассматривается как перспективный компонент комбинированных лекарственных препаратов. Основным биологически активным компонентом экстракта корня солодки является глицирризиновая кислота. Относительно низкая вероятность токсичности и широкий спектр воздействия на вирусные возбудители позволяет рассматривать глицирризиновую кислоту как перспективный компонент при лечении различных вирусных инфекций.

Герпесвирусные инфекции широко распространены и относятся к социально значимым заболеваниям. Высокая контагиозность и способность поражать различные органы и системы делают герпесвирусные инфекции серьезной междисциплинарной проблемой современного здравоохранения. Иммунная система играет ключевую роль в регуляции активности герпесвирусной инфекции и формировании ее клинических проявлений. Персистенция вируса связана с его способностью уклоняться от распознавания со стороны иммунной системы. Хроническое персистирование вируса может приводить к развитию вторичных иммунных нарушений, что способствует реактивации латентной инфекции и учащению рецидивов.

Ацикловир (АЦ) является препаратом с доказанной эффективностью и рекомендован клиническими протоколами и международными руководствами для этиотропной терапии герпесвирусной инфекции. Однако его действие направлено на активно реплицирующиеся вирусы и не влияет на латентную форму инфекции, что обуславливает рецидивирующее течение заболевания. Кроме того, при длительном применении возможно развитие лекарственной резистентности.

В связи с этим для успешной терапии герпесвирусных инфекций необходим комплексный подход, который будет включать противовирусный препарат и средства, способные модулировать иммунный ответ и повышать резистентность макроорганизма.

Для коррекции иммунного статуса человека и снижения выраженности окислительного стресса при вирусных инфекциях применяется природный антиоксидант аскорбиновая кислота (АК). Аскорбиновая кислота представляет собой органическое соединение, которое обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим действием. Она участвует в защите клеток от действия активных форм кислорода, способствует поддержанию функциональной активности иммунной системы и участвует в процессах синтеза интерферона. Включение аскорбиновой кислоты в состав комбинированного препарата может способствовать повышению устойчивости организма к инфекционным воздействиям.

Применение комплексного препарата на основе фиксированной комбинации глицирризиновой кислоты, ацикловира и аскорбиновой кислоты может повысить противовирусную активность за счет синергического эффекта, усилить иммунный ответ на вирусный агент и снизить риск развития резистентности. Выбор лекарственной формы в виде суспензионного сиропа обусловлен необходимостью обеспечения удобства дозирования и применения у пациентов детского и пожилого возраста, а также у лиц с нарушением глотания.

Важным этапом разработки лекарственного препарата является формирование научно обоснованной спецификации качества и внедрение современных аналитических методов контроля, обеспечивающих достоверное определение идентичности и количественного содержания действующих веществ.

Научная значимость исследования подтверждается получением патента на разработанную методику высокоэффективной жидкостной хроматографии для одновременного количественного определения ацикловира, аскорбиновой кислоты и натрия глицирризината.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Герпесвирусные инфекции: распространенность и проблемы терапии

Герпесвирусные инфекции (ГВИ) относятся к числу наиболее распространенных вирусных заболеваний человека и представляют серьезную медико-социальную проблему современного здравоохранения [1-3]. Вирусы семейства *Herpesviridae* широко распространены среди населения земного шара и характеризуются способностью к пожизненной персистенции в организме человека с последующими периодическими реактивациями [2]. По данным эпидемиологических исследований, серопозитивность по отношению к различным типам герпесвирусов достигает 60-95% среди взрослого населения [3].

Наиболее клиническое значение имеют вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов (*Herpes simplex virus*, HSV-1 и HSV-2), а также вируса варицелла-зостер (*Varicella zoster virus*, VZV), вызывающие широкий спектр заболеваний — от локализованных поражений кожи и слизистых оболочек до тяжелых генерализованных форм инфекции [4]. Для герпесвирусных инфекций характерно хроническое рецидивирующее течение, обусловленное способностью вирусов переходить в латентное состояние.

Семейство *Herpesviridae* включает α -, β -, γ -герпесвирусы, различающиеся по тканевой тропности, скорости репликации и особенностям взаимодействия с иммунной системой организма [5]. К α -герпесвирусам относятся HSV-1, HSV-2 и VZV. Для данной группы характерны выраженная нейротропность, быстрый цикл репликации и способность к формированию латентной инфекции в сенсорных нервных ганглиях [6]. β -герпесвирусы, представленные цитомегаловирусом (CMV), HHV-6 и HHV-7, обладают преимущественно висцеротропностью и вызывают системные поражения внутренних органов, особенно у пациентов с иммунодефицитными состояниями [7]. γ -герпесвирусы, включающие вирус Эпштейна-Барр (EBV) и HHV-8, ассоциированы с лимфопролиферативными и онкологическими заболеваниями [8].

Жизненный цикл HSV включает последовательные стадии адсорбции вируса на поверхности клетки, проникновения в клетку, депротеинизации вирусного капсида, репликации вирусного генома, синтеза вирусных белков и сборки вирусных частиц [9]. После первичного инфицирования вирус способен переходить в латентное состояние и длительно сохраняться в нервных ганглиях в виде неактивного вирусного генома [10].

Ключевой особенностью герпесвирусов является способность к иммунному уклонению. Герпесвирусы способны подавлять синтез интерферонов, ингибировать процессы презентации антигенов и изменять активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета [11]. Установлено, что HSV способен вмешиваться в сигнальные пути Toll-like

рецепторов (TLR), а также подавлять интерферон-опосредованные механизмы противовирусной защиты [11,12]. Подобные механизмы способствуют хроническому течению инфекции и развитию рецидивов заболевания.

Несмотря на наличие современных противовирусных препаратов, терапия герпесвирусных инфекций остается сложной задачей [13]. Стандартные схемы лечения не всегда обеспечивают длительную ремиссию, особенно у пациентов с иммунодефицитными состояниями и частыми рецидивами заболевания [13,14]. Кроме того, длительное применение противовирусных препаратов сопровождается риском формирования лекарственной устойчивости [14].

В связи с этим актуальным направлением современной фармацевтической науки является разработка комбинированных лекарственных препаратов, обладающих одновременно противовирусным, иммуномодулирующим и антиоксидантным действием [15].

Таблица.1 – Классификация герпесвирусов человека по биологическим и патогенетическим характеристикам

Подсемейство	Представители	Основная тропность	Ключевые особенности патогенеза	Основные клинические проявления
α-герпесвирусы	HSV-1, HSV-2, VZV	Нейротропная	Быстрый цикл репликации, латентность в нервных ганглиях, склонность к реактивации	Лабиальный и генитальный герпес, опоясывающий лишай
β-герпесвирусы	CMV, HHV-6, HHV-7	Висцеротропная	Медленный цикл репликации, системное поражение органов, иммунные нарушения	Врожденные инфекции, поражение внутренних органов
γ-герпесвирусы	EBV, HHV-8	Лимфотропная	Персистенция в лимфоцитах, иммунная мимикрия	Инфекционный мононуклеоз, лимфомы

Примечание - составлено автором на основе данных [5-8].

1.2. Современные противовирусные препараты и ограничения монотерапии при герпесвирусных инфекциях

Современная терапия герпесвирусных инфекций основывается преимущественно на применении этиотропных противовирусных препаратов, направленных на подавление репликации вирусного генома [13-

15]. Основу клинической практики в настоящее время составляют ациклические аналоги нуклеозидов, к которым относятся ацикловир, валацикловир и фамцикловир. Ацикловир является наиболее изученным и широко применяемым представителем данной группы [16]. Существенным преимуществом препарата является высокая селективность действия, обусловленная активацией ацикловира преимущественно в инфицированных клетках под действием вирусной тимидинкиназы [16, 17].

После проникновения в клетку ацикловир подвергается последовательному фосфорилированию с образованием активного метаболита — ацикловиртрифосфата, ингибирующего вирусную ДНК-полимеразу и вызывающего прекращение синтеза вирусной ДНК [17]. Данный механизм обеспечивает выраженную противовирусную активность препарата при относительно низкой токсичности по отношению к клеткам организма хозяина.

Несмотря на доказанную клиническую эффективность, монотерапия ацикловиром обладает рядом ограничений. Одним из ключевых недостатков является низкая биодоступность препарата при пероральном применении, которая, по данным различных исследований, составляет в среднем 15-30% [18]. Это обуславливает необходимость частого приема препарата и применение относительно высоких доз.

Дополнительным ограничением является риск формирования лекарственной устойчивости герпесвирусов, связанный преимущественно с мутациями вирусной тимидинкиназы и ДНК-полимеразы [14,19]. Наиболее часто резистентные штаммы выявляются у пациентов с иммунодефицитными состояниями, включая ВИЧ-инфекцию, онкогематологические заболевания и состояния после трансплантации органов [19].

Следует также отметить, что противовирусные препараты группы ациклических нуклеозидов действуют преимущественно на фазу активной репликации вируса и практически не влияют на латентную форму инфекции [16,17]. В условиях способности герпесвирусов к пожизненной персистенции и иммунному уклонению это существенно ограничивает возможности монотерапии и не предотвращает развитие рецидивов заболевания [11,12].

Кроме того, длительное применение ацикловира может сопровождаться развитием нежелательных побочных реакций. В клинической практике описаны случаи нефротоксичности, нейротоксичности и нарушения функции желудочно-кишечного тракта, особенно при использовании высоких доз препарата или у пациентов с сопутствующей патологией. [20].

Указанные ограничения монотерапии подчеркивают необходимость поиска альтернативных и вспомогательных терапевтических подходов. В последние годы в литературе все больше внимания уделяется применению комбинированных терапевтических подходов, позволяющих одновременно воздействовать на вирусную репликацию, иммунный ответ и воспалительные процессы при герпесвирусных инфекциях [15].

Таким образом, анализ современных противовирусных средств и ограничений их монотерапевтического применения подтверждает целесообразность разработки комбинированных лекарственных препаратов с взаимодополняющим механизмом действия. Это положение служит теоретическим и практическим обоснованием для дальнейшего рассмотрения активных компонентов комбинированного препарата и их роли в терапии герпесвирусных инфекций, что будет подробно изложено в последующих разделах настоящего обзора.

1.3. Ацикловир: фармакологические и физико-химические характеристики

Ацикловир является синтетическим аналогом пуринового нуклеозида гуанозина и относится к группе ациклических аналогов нуклеозидов [16,17]. Препарат обладает выраженной активностью в отношении HSV-1, HSV-2 и VZV и на протяжении нескольких десятилетий рассматривается как один из основных препаратов в клинической практике [13-17].

С фармакокинетической точки зрения ацикловир характеризуется низкой биодоступностью и коротким периодом полувыведения, что требует многократного применения препарата в течение суток [18]. Выведение ацикловира осуществляется преимущественно почками, что повышает риск нефротоксических реакций при нарушении функций почек [20].

Физико-химические свойства ацикловира имеют ключевое значение при разработке лекарственной формы. Согласно фармакопейным данным, ацикловир представляет собой кристаллическое вещество белого или почти белого цвета, с малой растворимостью в воде и слабо растворимый в органических растворителях [21-24].

Низкая растворимость ацикловира существенно осложняет разработку жидких лекарственных форм и обуславливает необходимость его введения в лекарственную форму в виде дисперсной системы с применением стабилизирующих вспомогательных веществ. В связи с этим суспензионные лекарственные формы рассматриваются как рациональный подход к введению ацикловира в состав комбинированного препарата.

Особенности физико-химических свойств ацикловира имеют значение и при аналитическом контроле препарата [38-40]. Наличие малорастворимых частиц, высокая вязкость сиропной матрицы и присутствие вспомогательных компонентов создают дополнительные сложности при пробоподготовке и хроматографическом анализе.

Согласно литературным данным, ведущим методом количественного определения ацикловира в мировой фармакопейной практике является высокоэффективная жидкостная хроматография [25]. ВЭЖХ используется в Государственной фармакопее Российской Федерации, USP, BP, JP и Европейской фармакопее для анализа субстанции и различных лекарственных форм ацикловира [25].

1.4. Глицирризиновая кислота и ее соли: фармакологические и физико-химические свойства

Глицирризиновая кислота (ГК) является основным биологически активным компонентом корня солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.) и относится к классу тритерпеновых сапонинов [26-29].

Молекула глицирризиновой кислоты содержит гидрофильные и гидрофобные фрагменты, что обуславливает ее амфифильные свойства и способность стабилизировать дисперсные системы [30]. В фармацевтической практике преимущественно применяются соли глицирризиновой кислоты, в частности натрия глицирризинат, обладающий более высокой растворимостью в воде и улучшенными технологическими характеристиками [30].

Противовирусное действие глицирризиновой кислоты связано с ее способностью влиять на процессы проникновения вируса в клетку, репликацию вирусного генома и экспрессию вирусных белков [27-29].

Показано, что ГК способна изменять свойства клеточных мембран, нарушая процессы слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной [27].

Дополнительное значение имеет иммуномодулирующее действие глицирризиновой кислоты. В ряде исследований показано, что ГК способна модулировать продукцию цитокинов, включая интерферон- γ , фактор некроза опухоли- α и интерлейкины [28,31]. Указанные эффекты способствуют усилению противовирусного иммунного ответа и снижению выраженности воспалительных реакций.

Противовоспалительное действие ГК частично связано с ее влиянием на метаболизм арахидоновой кислоты и синтез простагландинов [31]. Кроме того, глицирризиновая кислота обладает антиоксидантными свойствами и способна снижать выраженность оксидативного стресса [28].

Благодаря сочетанию противовирусного, иммуномодулирующего и противовоспалительного действия глицирризиновая кислота рассматривается как перспективный компонент комбинированных препаратов для терапии герпесвирусных инфекций. Разработка многокомпонентных лекарственных форм, содержащих глицирризиновую кислоту, требует разработки селективных и валидированных методик контроля качества [38,42].

1.5. Аскорбиновая кислота в составе комбинированных лекарственных препаратов

Аскорбиновая кислота является водорастворимым витамином С и одним из ключевых регуляторов окислительно-восстановительных процессов в организме человека [32-35]. Установлено, что аскорбиновая кислота участвует в регуляции функции врожденного и адаптивного иммунитета, влияет на активность нейтрофилов, макрофагов и натуральных киллеров, а также принимает участие в синтезе интерферонов [33,34].

Особый интерес к аскорбиновой кислоте обусловлен ее антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, что делает

данный компонент перспективным для применения в составе комплексной терапии вирусных инфекций. Показано, что витамин С способствует снижению выраженности оксидативного стресса и участвует в поддержании функциональной активности иммунокомпетентных клеток [32-35].

При вирусных инфекциях повышенная продукция активных форм кислорода способствует повреждению клеточных мембран и нарушению клеточного метаболизма. Антиоксидантное действие витамина С способствуют защите клеточных структур и снижению выраженности воспалительной реакции [35].

В составе комбинированных лекарственных препаратов аскорбиновая кислота рассматривается как компонент, способный потенцировать фармакологический эффект противовирусных средств за счет влияния на клеточный метаболизм, редокс-баланс и иммунологические механизмы защиты организма. При этом данный эффект не связан с прямым увеличением фармакокинетической биодоступности противовирусных препаратов.

С фармацевтической точки зрения аскорбиновая кислота относится к химически лабильным соединениям и склонна к окислению под действием кислорода, света и повышенной температуры [36]. Дегградация аскорбиновой кислоты сопровождается снижением содержания действующего вещества и образованием продуктов разложения, что требует строгого контроля условий хранения и выбора рациональных условий анализа. Использование жидких лекарственных форм с контролируемым рН и антиоксидантной защитой рассматривается как рациональный подход к сохранению стабильности аскорбиновой кислоты в составе комбинированных препаратов.

При аналитическом контроле аскорбиновой кислоты традиционно применяют спектрофотометрические методы анализа [37]. Однако в условиях многокомпонентных систем данные методы могут ограничены вследствие перекрытия спектров и влияния вспомогательных веществ.

Согласно литературным данным, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии обладает более высокой точностью и воспроизводимостью по сравнению с УФ-спектрофотометрией при количественном определении аскорбиновой кислоты [37].

Таким образом, аскорбиновая кислота является фармакологически и технологически обоснованным компонентом комбинированных лекарственных препаратов для терапии герпесвирусных инфекций.

1.6. Обоснование комбинированного применения активных компонентов

Герпесвирусные инфекции характеризуются способностью к длительной персистенции и рецидивирующему течению, что ограничивает эффективность исключительно этиотропной терапии [9-15].

Ацикловир подавляет репликацию вирусной ДНК, однако не влияет на латентную форму инфекции и при длительном применении может сопровождаться развитием резистентности [14,19].

В связи с этим особый интерес представляет комбинированное применение ацикловира с соединениями, обладающими иммуномодулирующими, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами [15,26-35].

Глицирризиновая кислота и ее соли способны дополнять действие ацикловира за счет влияния на иммунологические механизмы защиты и воспалительные процессы [26-31].

Аскорбиновая кислота участвует в регуляции окислительно-восстановительных процессов и поддержании функциональной активности иммунокомпетентных клеток [32-35].

Таким образом, сочетание ацикловира, натрия глицирризината и аскорбиновой кислоты можно рассматривать как фармакологически обоснованную комбинацию и требует разработки подходов к их аналитическому контролю в составе комбинированного препарата.

1.7. Современные подходы к стандартизации и контролю качества комбинированных лекарственных препаратов

Стандартизация лекарственных препаратов является обязательным этапом обеспечения их качества, безопасности и эффективности [21-24].

Особое значение вопросы стандартизации приобретают при разработке комбинированных лекарственных препаратов, содержащих несколько активных фармацевтических ингредиентов с различными физико-химическими свойствами [38-41]. Современные фармакопейные требования предусматривают, что спецификация качества комбинированного лекарственного препарата должна включать показатели, обеспечивающие всестороннюю характеристику его свойств. К числу обязательных показателей относятся подлинность и количественное содержание каждого активного компонента, физико-химические характеристики лекарственной формы (рН, вязкость, плотность), однородность состава, микробиологическая чистота, а также стабильность препарата в течение установленного срока годности. Выбор конкретных показателей должен быть научно обоснован и учитывать особенности состава и лекарственной формы препарата [21-24].

При разработке комбинированных лекарственных препаратов в жидких лекарственных формах, включая суспензионные сиропы, стандартизация приобретает дополнительные особенности. Необходимость обеспечения однородности распределения действующих веществ, стабильности

дисперсной системы и воспроизводимости дозирования требует включения в спецификацию качества дополнительных показателей, отражающих физико-химическое состояние лекарственной формы. Контроль таких параметров, как рН, вязкость и устойчивость суспензии, является важным условием обеспечения качества и безопасности препарата [21-24,39].

В соответствии с требованиями международных и национальных фармакопей аналитические методики, применяемые для контроля качества лекарственных средств, подлежат обязательной валидации [42]. Основными характеристиками валидируемых методик являются специфичность, линейность, правильность, прецизионность и робастность [42].

Таким образом, стандартизация комбинированных лекарственных препаратов представляет собой комплексный и многоэтапный процесс, направленный на обеспечение стабильности, воспроизводимости и клинической эффективности лекарственного средства. Разработка научно обоснованной спецификации качества и внедрение современных аналитических методов контроля являются необходимыми условиями успешного создания и последующего применения комбинированных лекарственных препаратов в медицинской практике [38,42].

1.8. Аналитические методы определения активных фармацевтических ингредиентов в комбинированных лекарственных формах

Аналитический контроль многокомпонентных лекарственных форм представляет собой сложную задачу вследствие сочетания компонентов с различными физико-химическими свойствами [38-41].

В фармацевтической практике применяются хроматографические и спектрофотометрические методы. Тонкослойная хроматография используется преимущественно для качественного анализа и подтверждения подлинности, однако обладает ограниченной разрешающей способностью и воспроизводимостью, что снижает ее пригодность для количественного определения в многокомпонентных системах [48].

Спектрофотометрия характеризуется простотой и доступностью, однако в условиях многокомпонентных лекарственных форм ее применение ограничено вследствие перекрытия спектров и влияния вспомогательных веществ [37,43].

В связи с этим при анализе комбинированных препаратов приоритет отдается селективным методам, прежде всего высокоэффективной жидкостной хроматографии. ВЭЖХ обеспечивает эффективное разделение веществ с различными физико-химическими свойствами, высокую точность и воспроизводимость результатов, что делает ее универсальным методом анализа сложных лекарственных систем [25,38-41]. Метод ВЭЖХ обеспечивает высокую селективность, чувствительность и воспроизводимость анализа [38-41].

Особые трудности возникают при анализе комбинированного суспензионного сиропа, содержащий ацикловир, натрия глицирризинат и

аскорбиновую кислоту. Указанные вещества существенно различаются по растворимости, полярности, кислотно-основным свойствам и химической стабильности.

Дополнительное влияние на результаты анализа оказывает сиропообразная матрица, содержащая сахара, загустители, стабилизаторы и консерванты. Вспомогательные вещества способны повышать вязкость растворов, затруднять пробоподготовку, ухудшать фильтрацию и влиять на воспроизводимость хроматографического анализа [39,40].

1.9. Преимущества ВЭЖХ при анализе комбинированных препаратов

Высокоэффективная жидкостная хроматография является одним из наиболее селективных и воспроизводимых методов анализа, широко применяемых в фармацевтическом контроле качества лекарственных средств [38-41].

Наиболее часто для анализа ацикловира используют обращенно-фазовые хроматографические системы с колонками C_{18} и УФ-детектированием в области 254 нм [25].

Использование обращенно-фазовой ВЭЖХ позволяет проводить селективное разделение соединений с различной полярностью и физико-химическими свойствами [38-40,47]. Особое значение при анализе многокомпонентных препаратов имеет применение диодно-матричного детектора (DAD).

В отличие от стандартного УФ-детектора, DAD позволяет одновременно регистрировать спектры поглощения веществ в широком диапазоне длин волн и проводить оценку спектральной чистоты пиков [38-41].

Использование ВЭЖХ-УФ/DAD позволяет обеспечить селективное разделение компонентов, их идентификацию по спектральным характеристикам и точное количественное определение в рамках одного анализа, что делает данный метод наиболее обоснованным для стандартизации разработанного комбинированного препарата.

Выводы

1. Проведенный анализ литературных данных показал актуальность разработки комбинированных лекарственных препаратов для терапии герпесвирусных инфекций и необходимость совершенствования подходов к их стандартизации [1-15].
2. Установлено, что ацикловир остается одним из основных противовирусных средств для лечения герпесвирусных инфекций, однако его применение имеет ряд ограничений, связанных с биодоступностью и действием против только активно реплицирующих вирусов [16-20].

3. Показано, что натрия глицирризинат и аскорбиновая кислота обладают противовирусными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, что обосновывает перспективность их совместного применения в составе комбинированного лекарственного препарата [26-35].
4. Анализ современных методов стандартизации показал, что для контроля качества комбинированных лекарственных форм наиболее обоснованным является применение селективных хроматографических методов анализа [38-42].
5. Установлено, что метод ВЭЖХ-УФ/DAD обеспечивает возможность одновременного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината и может рассматриваться как перспективный метод стандартизации комбинированного суспензионного сиропа [38-42].

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования являлся модельный образец комбинированного суспензионного сиропа, приготовленный по ранее разработанной рецептуре [80]. Указанная рецептура и технология получения были предложены в предшествующей магистерской диссертационной работе. В настоящем исследовании данный образец использован для разработки спецификации качества, проведения стандартизации и валидации методики одновременного количественного определения действующих веществ методом ВЭЖХ-DAD.

В состав модельного сиропа входили следующие активные фармацевтические ингредиенты:

- Натрия глицирризинат -0,8 г/100 мл;
- Ацикловир -4,0 г/100 мл;
- Аскорбиновая кислота -2,0 г/100 мл.

В качестве вспомогательных веществ использованы компоненты, характерные для жидких лекарственных форм для приема внутрь, обеспечивающие формирование и стабильность суспензионной системы, органолептические свойства и технологичность препарата, а именно:

- Подсластитель (сорбит);
- Структурообразователи и стабилизаторы (микрокристаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, гуаровая камедь);
- Консервант (метилпарабен);
- Регулятор кислотности (натрия цитрат);
- Ароматизатор;
- Вода очищенная.

Используемые вспомогательные вещества являются фармакопейными и применяются в составе лекарственных форм [21-24]. Их выбор обоснован функциональной ролью в обеспечении стабильности суспензионной системы, однородности дозирования и приемлемых органолептических характеристик препарата.

Выбор объекта исследования обусловлен тем, что препарат представляет собой многокомпонентную систему, содержащую вещества с различными физико-химическими свойствами. Ацикловир характеризуется низкой растворимостью в воде, аскорбиновая кислота является высокополярным и химически лабильным соединением, натрия глицирризинат обладает хорошей растворимостью и поверхностно-активными свойствами. Такое сочетание компонентов требует применения селективных методов анализа при разработке спецификации качества [38-42].

2.2. Получение модельного образца комбинированного сиропа

Для проведения экспериментальных исследований был воспроизведен модельный образец комбинированного сиропа по рецептуре, описанной в ранее выполненной магистерской диссертационной работе.

Процесс приготовления включал получение водной основы, растворение водорастворимых компонентов и введение вспомогательных веществ с последующим внесением порошкообразных субстанций активных ингредиентов и перемешиванием до образования однородной суспензионной системы.

Полученный сироп представлял собой: однородную суспензию белого цвета, без видимых механических включений, с характерным запахом ароматизатора, без признаков расслоения при визуальном контроле.

Приготовленный образец использовали для проведения физико-химических, хроматографических и микробиологических исследований.

2.3. Оборудование, реактивы и материалы

2.3.1 Оборудование и материалы:

- Высокоэффективный жидкостный хроматограф 1260 Infinity II с диодно-матричным детектором DAD WR (Agilent Technologies, США);
- рН-метр 914 (Metrohm, Швейцария);
- Весы аналитические ХА 220.3Y.A (Radwag, Польша);
- Высокоскоростная центрифуга ВКС-TH21RHD (Biobase, Китай);
- Ультразвуковая ванна UC-224D (Biobase, Китай);
- Система очистки воды I типа PureLAB Quest (ELGA Veolia, Великобритания);
- Мерная посуда класса А.

2.3.2 Стандартные образцы (референс-субстанции)

- Аскорбиновая кислота (Ascorbic Acid), чистота $\geq 99\%$, кат. № A103533 (Aladdin Scientific Corporation, Китай);
- Ацикловир (Acyclovir), чистота $\geq 99,8\%$, кат. № A126073 (Aladdin Scientific Corporation, Китай);
- Натрий глицирризинат (Trisodium Glycyrrhizinate Hydrate) чистота $\geq 80\%$, кат. № T161877 (Aladdin Scientific Corporation, Китай).

2.3.3 Реактивы

- дигидрофосфат калия 1-замещенный, квалификация ЧДА, чистота $\geq 99,8\%$ (ТОО «Лаборфарма», Казахстан);
- ортофосфорная кислота, квалификация ЧДА, чистота $\geq 85,00\%$ (ТОО «Лаборфарма», Казахстан);
- ацетонитрил класса ВЭЖХ, чистота $\geq 99,9\%$, (Sigma Aldrich, Германия);
- метанол класса ВЭЖХ, чистота $\geq 99,99\%$, (Sigma Aldrich, Германия).

2.4 Методы исследования

Для оценки качества и стандартизации комбинированного сиропа применяли физико-химические, хроматографические и микробиологические методы анализа.

2.4.1 Органолептические показатели

Оценивали внешний вид, цвет, запах и однородность суспензии визуально [21-24].

2.4.2 Определение показателей pH

Определение pH проводили потенциометрическим методом с использованием калибровочного pH-метра при температуре 20 ± 2 °C в соответствии с требованиями Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАС), том I, раздел 2.1.2.3

2.4.3 Относительная плотность

Определение проводили с использованием пикнометра при температуре $20 \pm 0,5$ °C в соответствии с требованиями ФЕАЭС I том, 2.1.2.5.

2.4.4 Вязкость

Вязкость определяли методом ротационной вискозиметрии при температуре $20 \pm 0,5$ °C. Перед измерением тщательно перемешивали [23].

2.4.5 Однородность дозирования

Оценку проводили путем определения массы отдельных доз, отобранных из многодозовой упаковки, с расчетом среднего значения и отклонений в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС I том, раздел 2.1.9.12 «Однородность массы доз, отмеренных из многодозовой упаковки».

2.4.6 Устойчивость

Оценку устойчивости суспензионного сиропа проводили в соответствии с требованиями ФЕАЭС, том I, раздел 2.5.1.33 «Суспензии».

2.4.7 Дисперсность

Оценку дисперсности суспензионного сиропа проводили в соответствии с требованиями ФЕАЭС, том I, 2 часть, раздел 2.1.9.25 «Определение размера частиц»

2.4.8 Объем содержимого контейнера

Определение проводили путем полного опорожнения флакона в мерный цилиндр с последующим измерением объема согласно требованиям Фармакопеи ЕАЭС I том, раздел 2.1.9.17 «Определение объема содержимого контейнера».

2.4.9 Хроматографический анализ (ВЭЖХ-DAD)

Качественное и количественное определение ацикловира, натрия глицирризината и аскорбиновой кислоты проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-DAD).

Метод обеспечивал селективное разделение компонентов, их идентификацию по времени удерживания и спектрам поглощения, а также количественное определение действующих веществ [38-42].

2.4.10 Микробиологическая чистота

Исследование проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Казахстан (раздел 2.6.12). Определяли общее количество аэробных микроорганизмов (ТАМС), общее количество дрожжей и плесневых грибов (ТУМС), а также проводили испытания на отсутствие патогенных микроорганизмов, включая *Escherichia coli*, бактерии группы кишечной палочки (БГКП), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. и *Bacillus cereus*.

2.5 Статистическая обработка результатов

Обработка результатов проводилась с использованием стандартных методов описательной статистики [41,42]. Все измерения выполнялись не менее чем трех параллельных определений, результаты выражали в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Выводы

1. Подобраны условия проведения физико-химических и микробиологических исследований комбинированного суспензионного сиропа.
2. Разработаны условия ВЭЖХ-УФ/DAD анализа и пробоподготовки, обеспечивающие возможность совместного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината [38-42].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты физико-химических исследований

В рамках стандартизации комбинированного лекарственного препарата в форме суспензионного сиропа были проведены исследования основных физико-химических показателей, характеризующих качество и свойства исследуемого образца.

Органолептическая оценка показала, что исследуемый образец представляет собой суспензию белого или светло-желтого цвета со сладким вкусом и характерным запахом ароматизатора. При хранении допускается образование мелкодисперсного осадка, который полностью ресуспендируется при легком встряхивании. Образование осадка является характерной особенностью суспензионных лекарственных форм и связано с присутствием в составе малорастворимого ацикловира [23].

3.1.1 Определение pH

Значение pH исследуемого суспензионного сиропа находилось в пределах 3,9-4,1, что соответствует слабокислой среде. Указанный диапазон является оптимальным с точки зрения стабильности аскорбиновой кислоты, склонной к окислению в нейтральной и щелочной среде [35,36,60-64]. Кроме того, поддержание слабокислого значения способствует сохранению физико-химических свойств исследуемого образца и снижает риск деградации действующих веществ в процессе хранения.

3.1.2 Определение относительной плотности

Относительная плотность исследуемого образца находилась в диапазоне 1,230- 1,240 г/мл. Полученные значения обусловлены высоким содержанием сиропной основы и вспомогательных веществ, формирующих вязкую дисперсионную среду [23].

Показатель относительной плотности имеет значение для обеспечения воспроизводимости дозирования, однородности распределения действующих веществ и стабильности суспензионной системы при хранении.

3.1.3 Определение вязкости

Вязкость суспензионного сиропа составляла $130 \pm \text{мПа} \cdot \text{с}$. Полученный показатель обеспечивает достаточную устойчивость дисперсной системы, препятствуя быстрому оседанию частиц ацикловира, и одновременно сохраняет удовлетворительные свойства суспензионной лекарственной формы, включая возможность дозирования и удобство применения.

Поддержание оптимальной вязкости особенно важно для суспензионных препаратов, поскольку чрезмерно низкая вязкость может приводить к ускоренному оседанию частиц, тогда как чрезмерно высокая вязкость ухудшает распределение препарата и его дозирование [23,39].

3.1.4 Оценка устойчивости суспензионной системы

При оценке устойчивости суспензионного сиропа установлено, что время ресуспендирования не превышало 1 минуты. После встряхивания образец образовывал равномерную суспензионную систему без видимых агломератов и признаков необратимого расслоения. Полученные результаты свидетельствуют о достаточной агрегативной и седиментационной устойчивости исследуемой лекарственной формы [23].

Таким образом, результаты проведенных физико-химических исследований подтверждают соответствие исследуемого образца основным фармакопейным требованиям, предъявляемым к жидким лекарственным формам для перорального применения. Полученные данные свидетельствуют об удовлетворительных характеристиках суспензионного сиропа и возможности использования исследуемого образца для дальнейшей стандартизации и аналитического контроля.

3.1.5 Определение дисперсности (размера частиц)

Оценку дисперсности суспензионного сиропа проводили в соответствии с требованиями ФЕАЭС, том I, 2 часть, раздел 2.1.9.25 «Определение размера частиц».

Размер частиц дисперсной фазы является одним из важнейших показателей качества суспензионных лекарственных форм, поскольку оказывает влияние на устойчивость системы, равномерность распределения действующего вещества, скорость оседания частиц и воспроизводимость дозирования препарата [23].

Проведенная оценка показала, что визуально система характеризовалась однородностью распределения частиц без признаков выраженной агрегации и быстрого оседания частиц, что обеспечивает воспроизводимость дозирования препарата.

3.1.6 Однородность дозирования

Испытание однородности массы доз, извлекаемых из многодозового контейнера, проводили в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС I том, раздел 2.1.9.12 «Однородность массы доз, отмеренных из многодозовой упаковки».

В ходе исследования из одной или нескольких упаковок суспензионного сиропа с помощью стандартного дозирующего устройства последовательно отбирали 20 отдельных доз. Для каждой дозы определяли массу, после чего вычисляли среднее значение и оценивали соответствие индивидуальных результатов установленным фармакопейным допускам.

Полученные результаты свидетельствовали о соответствии исследуемого препарата требованиям по однородности дозирования. Масса отдельных доз находилась в пределах допустимых отклонений, что подтверждает стабильность распределения суспензионной системы и воспроизводимость дозирования лекарственного препарата при применении [23].

3.2 Результаты ВЭЖХ-анализа

Для идентификации и количественного определения ацикловира, натрия глицирризината и аскорбиновой кислоты в составе комбинированного суспензионного сиропа использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием и использованием диодно-матричного детектора (ВЭЖХ-УФ/DAD) [22-24, 38-42].

Хроматографические исследования проводились на базе лаборатории ProLubSupport в рамках договора оказания услуг №TRAIN-2025-530. Анализ выполняли на жидкостном хроматографе 1260 Infinity II с диодно-матричным детектором DAD WR (Agilent Technologies, США) и программного обеспечения OpenLab CDS Workstation.

3.2.1 Условия хроматографирования

Разделение компонентов осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием [38-40, 47-50]. Условия хроматографирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Условия хроматографирования

Параметр	Описание
Колонка	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 150 мм, 2.7 μм (кат. № 693975-302)
Температура колонки	25°C ± 2°C
Температура автосамплера	4°C
Объем ввода	5 мкл
Промывка иглы	Метанол:вода 1:1 + 0,1% H ₃ PO ₄
Подвижная фаза	1) Фаза А: фосфатный буфер 0,02 М KH ₂ PO ₄ , pH=3,0 2) Фаза В: ацетонитрил
Скорость потока	0,5 мл/мин
Время анализа	15 минут
Эквилибрация	10 минут
Детектирование	– аскорбиновая кислота: 245 нм; – ацикловир: 252 нм; – натрий глицирризинат: 252 нм; – диапазон сканирования спектров: 190-400 нм; – частота сбора данных: 10 Гц

Программа градиентного элюирования представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Программа градиентного элюирования

Время, мин.	Фаза А, %	Фаза В, %
0-2	100	0
2-3	90	10
3-7	70	30
7-10	55	45
10-11,5	55	45
11,5-12	90	10
12-15	90	10

Буферный раствор с рН 3,0 выбран как компромиссное условие, обеспечивающее стабильность анализируемых веществ и воспроизводимость результатов анализа.

В кислой среде аскорбиновая кислота находится преимущественно в недиссоциированной форме, благодаря чему менее подвержена окислительной деградации. Ацикловир при данных условиях находится преимущественно в молекулярной форме, что способствует стабильному удержанию. Для натрия глицирризината снижение степени диссоциации приводит к уменьшению вторичных взаимодействий с остаточными силанольными группами поверхности сорбента, что обеспечивает улучшение симметрии хроматографических пиков [38-40].

Кроме того, кислая среда способствует снижению влияния компонентов матрицы сиропа за счет уменьшения их взаимодействия с неподвижной фазой и предотвращения коэлюции с аналитами.

Ацетонитрил использовали в качестве органического модификатора благодаря его низкой вязкости, хорошей УФ-прозрачности и высокой элюирующей способности в обращенно-фазовой хроматографии [38,39,47].

Регистрацию сигнала проводили с использованием диодно-матричного детектора в ультрафиолетовой области на выбранных аналитических длинах волн.

Дополнительно выполняли регистрацию спектров в диапазоне 190-400 нм для подтверждения идентичности аналитических пиков и отсутствие наложения посторонних сигналов.

Начальный участок градиента создавал условия для удержания и разделения раннеэлюируемых полярных компонентов. Постепенное увеличение доли ацетонитрила обеспечивало элюирование более удерживаемого натрия глицирризината. Заключительный этап градиента использовали для возврата системы к исходным условиям и последующей эквilibрации хроматографической колонки.

Для защиты аналитической колонки от компонентов сиропной матрицы, включая сахарную основу, загустители и консервант (нипагин), использовали защитную предколонку с аналогичным типом сорбента C18 [38-40].

Количественное определение осуществляли по площади пика соответствующего компонента с использованием калибровочной зависимости «площадь пика – концентрация».

3.2.2 Приготовление растворов и пробоподготовка

Приготовление подвижной фазы А (фосфатный буфер 0,02 М KH_2PO_4 , рН 3,0)

2,72 г дигидрофосфата калия помещают в мерную колбу объемом 1 л и доводят до метки водой I типа. Доводят до значения рН=3,0 добавлением ортофосфорной кислоты при постоянном перемешивании. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм и дегазируют в ультразвуковой ванне в течение 10-15 мин [38-40].

Приготовление стандартных растворов

Исходные стандартные растворы готовят путем растворения точной навески стандартного образца в подвижной фазе А с последующим доведением объема до метки в мерной колбе 100 мл. Исходные стандартные растворы хранить при 2–8 °С.

- натрий глицирризинат – 10 мг/100 мл
- аскорбиновая кислота – 10 мг/100 мл
- ацикловир – 10 мг/100 мл

Приготовление калибровочных растворов

Для построения калибровочных графиков зависимости аналитического сигнала от концентрации действующих веществ в сиропе были приготовлены рабочие калибровочные растворы (модельные смеси), содержащие одновременно натрий глицирризинат, аскорбиновую кислоту и ацикловир. Калибровочные растворы готовили по пяти уровням концентраций в диапазонах:

- натрий глицирризинат: 2-10 мг/л
- аскорбиновая кислота: 5-25 мг/л
- ацикловир: 10-50 мг/л

Каждый калибровочный уровень готовили в мерной колбе 25 мл путем внесения рассчитанных объемов стандартных растворов каждого компонента с последующим доведением объема до метки подвижной фазой А. Объемы добавляемых стандартных растворов рассчитывали исходя из линейной зависимости для обеспечения заданных концентраций в конечном объеме 25 мл. Перед переносом приготовленных растворов в флаконы выполняли фильтрацию через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, при этом первые порции фильтрата отбрасывали.

Концентрации действующих веществ и соответствующие объемы стандартных растворов, использованные при приготовлении модельных смесей, приведены в таблице 4.

Таблица 4. Калибровочные уровни

№	Натрий глицирризат, мг/л	Аскорбиновая кислота, мг/л	Ацикловир, мг/л	Объем исходного раствора натрия глицирризата, мл	Объем исходного раствора аскорбиновой кислоты, мл	Объем исходного раствора ацикловира, мл
1	2	5	10	0,5	1,25	2,5
2	4	10	20	1	2,5	5
3	6	15	30	1,5	3,75	7,5
4	8	20	40	2	5	10
5	10	25	50	2,5	6,25	12,5

Как видно из данных Таблицы 4, объемы вносимых стандартных растворов для всех трех компонентов строго пропорциональны целевым концентрациям. Для выбранной схемы приготовления коэффициент пропорциональности составил 0,25 мл на 1 мг/л конечной концентрации (для объема мерной колбы 25 мл), что подтверждает корректность расчетов и воспроизводимость подхода к приготовлению калибровочных растворов.

Подготовленные калибровочные уровни охватывают диапазон концентраций, соответствующий ожидаемому содержанию действующих веществ в анализируемом сиропе и предназначенный для оценки линейности в рабочем интервале (ориентировочно 80-120% от номинального содержания).

Пробоподготовка образца сиропа и плацебо

Для исключения перегрузки колонки и детектора, а также для обеспечения концентраций аналитов в рабочем диапазоне методики [38-42], образцы сиропа и плацебо разбавляют в 1000 раз – 0,1 мл сиропа, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки подвижной фазой.

Подготовленный раствор центрифугируют при 6000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость отбирают в чистую емкость и при необходимости дополнительно фильтруют через фильтр PVDF 0,45 мкм, отбросив первые 1-2 мл фильтрата.

Анализ подготовленных растворов выполняют непосредственно после пробоподготовки. Процедура пробоподготовки одинакова для стандартов, образцов и плацебо.

3.2.3 Идентификация действующих веществ методом ВЭЖХ-УФ/DAD

Идентификацию действующих веществ проводили по времени удерживания и спектральным характеристикам пиков, зарегистрированным с использованием диодно-матричного детектора [38-42].

Сравнение хроматограмм исследуемого образца и стандартных растворов подтверждало присутствие всех трех действующих веществ в составе комбинированного суспензионного сиропа.

На полученных хроматограммах наблюдалось селективное разделение аналитических пиков без выраженного наложения сигналов [38-41].

Использование диодно-матричного детектора позволяло дополнительно оценивать спектральную чистоту аналитических пиков и снижало вероятность ошибочной идентификации компонентов [38-41].

Хроматограммы стандартных растворов и исследуемого образца представлены на рисунках 1-2.

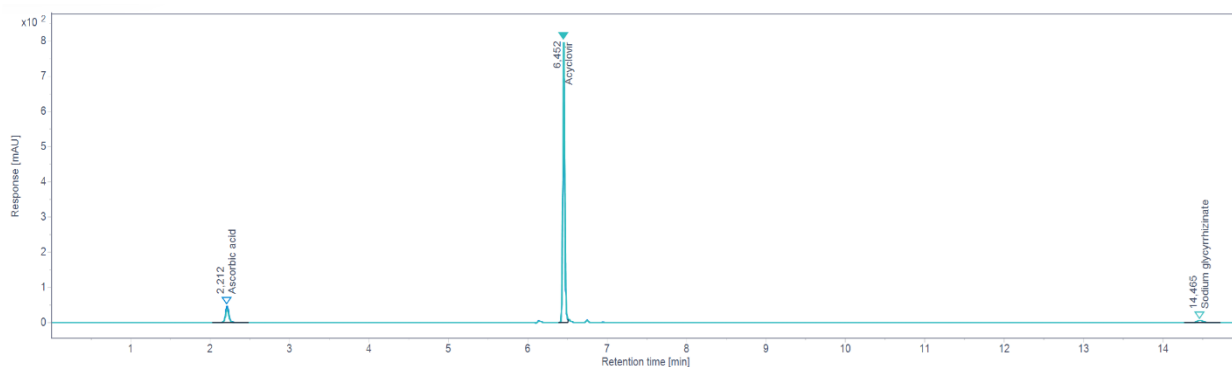


Рисунок 1– хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)

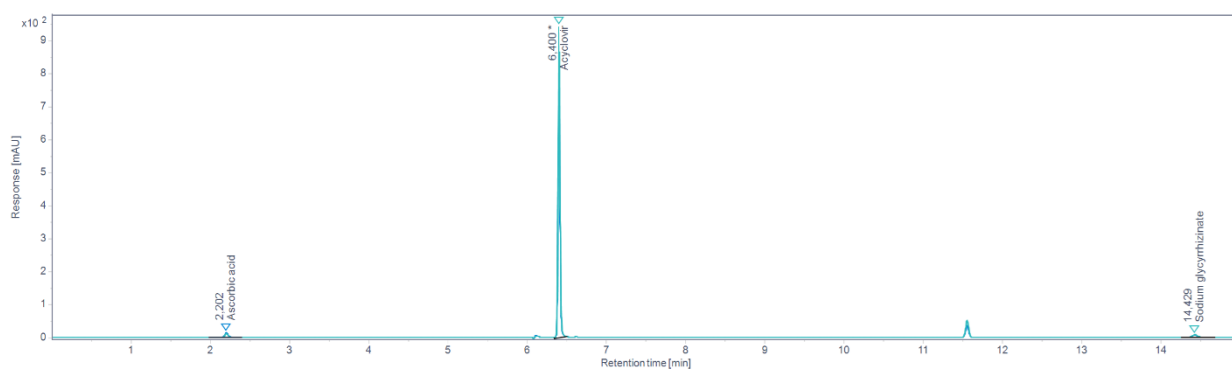


Рисунок 2 – хроматограмма рабочего раствора образца сиропа

3.2.4 Количественное определение действующих веществ

Количественное определение аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината выполняли методом внешнего стандарта с использованием калибровочной зависимости «площадь пика-концентрация» [38-42].

Расчет содержания исследуемых компонентов осуществляли по площади соответствующих аналитических пиков, полученных при анализе стандартных растворов и исследуемого образца сиропа.

Применение метода ВЭЖХ-УФ/DAD обеспечивало возможность одновременного количественного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината в присутствии компонентов сиропной матрицы.

3.3 Валидация методики ВЭЖХ-УФ/DAD

Валидация методики выполнена для одного метода, обеспечивающего определение трех аналитов в одной хроматограмме. Оценивали следующие характеристики:

1. пригодность хроматографической системы;
2. специфичность;
3. линейность;
4. повторяемость;
5. правильность (точность);
6. робастность [41,42,51,52,65,66,70,71].

3.3.1 Пригодность хроматографической системы

Цель испытания: подтвердить, что хроматографическая система (насос, автосамплер, детектор), колонка и подвижные фазы обеспечивают стабильные параметры разделения и детектирования до выполнения количественного анализа образцов и проведения валидационных исследований.

Условия проведения: оценку пригодности системы выполняли после кондиционирования колонки и установления стационарного состояния методом последовательных вводов стандартного раствора уровня 100% в количестве 5 вводов подряд.

Оцениваемые параметры: для каждого аналита (аскорбиновая кислота, ацикловир, натрий глицирризинат) рассчитывали:

- среднее время удерживания t_R (мин);
- относительное стандартное отклонение времени удерживания RSD (t_R), % (критерий: $\leq 1,0$ %);
- среднюю площадь пика Area (mAU·s);
- относительное стандартное отклонение площади пика RSD (Area), % (критерий: $\leq 2,0$ %);
- фактор формы пика (Asymmetry factor, AS) (критерий: $\leq 2,0$);

- эффективность колонки N (число теоретических тарелок) (критерий: > 5000) [22-24,51].

Результаты исследования пригодности системы приведены в таблицах 5-7.

Таблица 5- Пригодность системы для аскорбиновой кислоты (n = 5)

	1	2	3	4	5	Среднее	SD	RSD, %
t_R , мин	2,212	2,217	2,215	2,214	2,211	2,21	0,002	0,108
Area, mAU·s	127,45	129,51	126,88	126,11	130,32	128,05	1,787	1,396
A_s	1,151	1,162	1,149	1,147	1,16	1,154		
N, среднее	11 786							

Таблица 6- Пригодность системы для ацикловира (n = 5)

	1	2	3	4	5	Среднее	SD	RSD, %
t_R , мин	6,452	6,304	6,324	6,348	6,35	6,35	0,057	0,898
Area, mAU·s	1358,1	1322,5	1334,81	1365,3	1349,55	1346,05	17,385	1,292
A_s	1,163	1,148	1,151	1,172	1,157	1,158		
N, среднее	386 781							

Таблица 7- Пригодность системы для натрий глицирризината (n = 5)

	1	2	3	4	5	Среднее	SD	RSD, %
t_R , мин	14,465	14,347	14,285	14,369	14,283	14,35	0,075	0,520
Area, mAU·s	35,019	34,94	35,72	35,61	36,21	35,50	0,527	1,484
A_s	1,083	1,074	1,098	1,092	1,103	1,09		
N, среднее	285 735							

Хроматограммы: на рисунках 3-7 приведены хроматограммы пригодности хроматографической системы:

Рисунок 3 – хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%) – 1 повторение

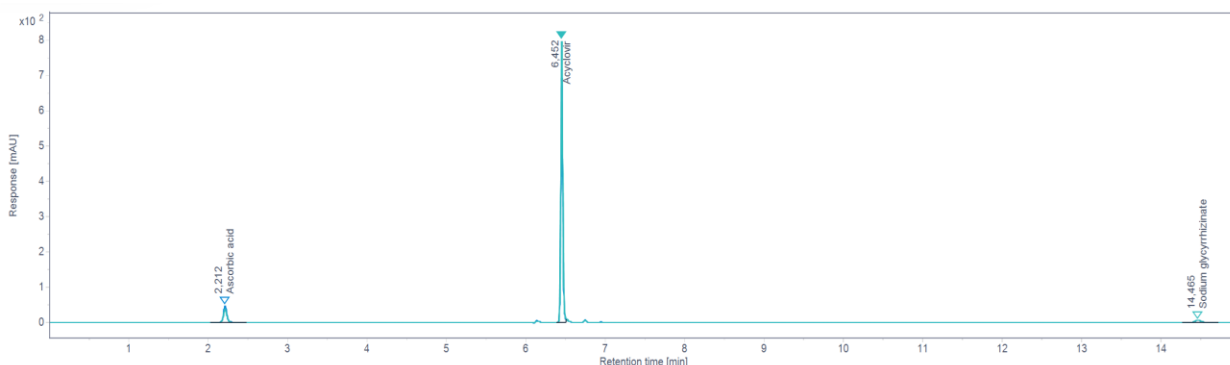


Рисунок 4 – хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%) – 2 повторение

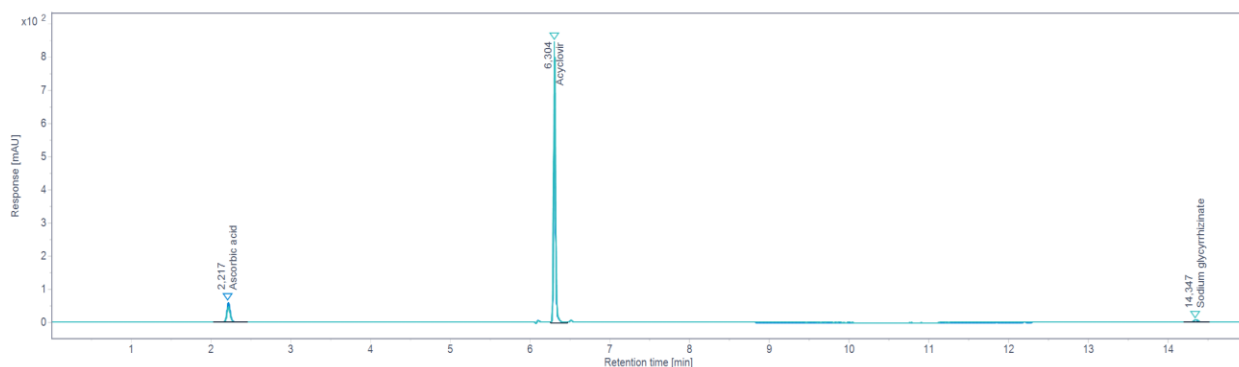


Рисунок 5 – хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%) – 3 повторение

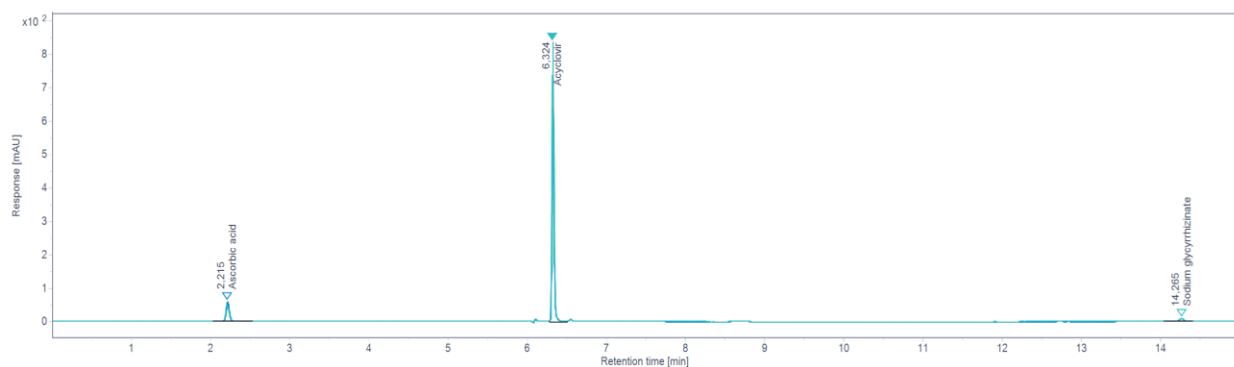


Рисунок 6 – хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%) – 4 повторение

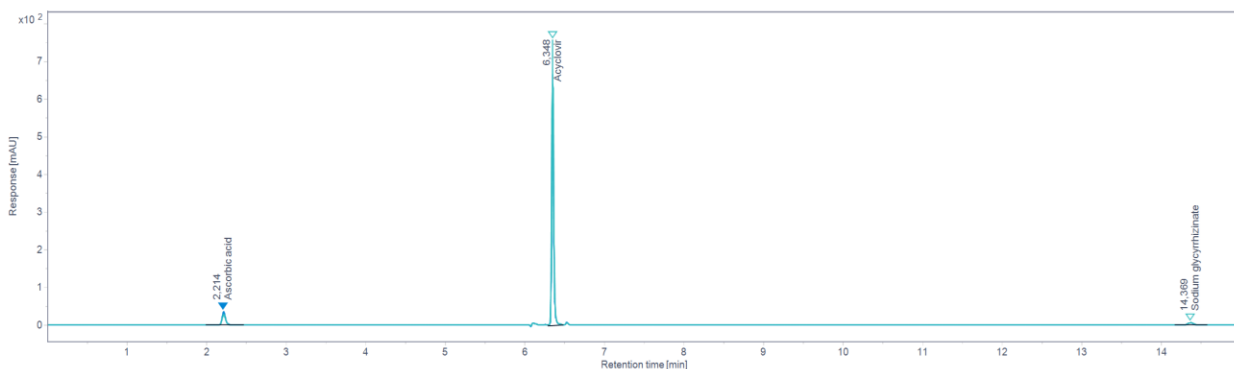
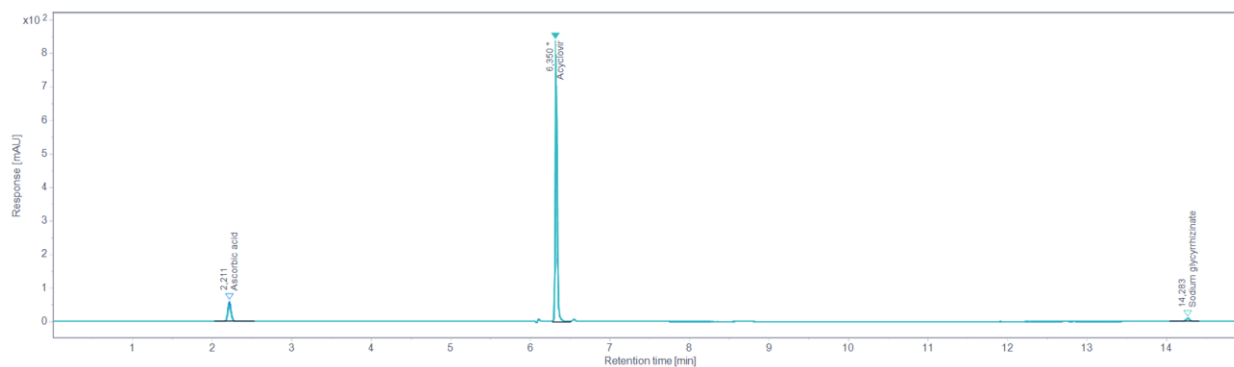


Рисунок 7 – хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%) – 5 повторение



Вывод по пригодности хроматографической системы.

По результатам пяти последовательных вводов стандартного раствора уровня 100% установлено:

- RSD времени удерживания для всех аналитов $\leq 1,0$ %;
- RSD площади пика $\leq 2,0$ %;
- фактор асимметрии A_s находится в диапазоне 1,07-1,16;
- эффективность колонки превышает 5000 теоретических тарелок для каждого соединения.

Полученные данные свидетельствуют о стабильной работе насоса, автосамплера и детектора, отсутствии флуктуаций градиента и корректной интеграции пиков [38-42].

Хроматографическая система признана пригодной для проведения количественного анализа и дальнейших этапов валидации.

3.3.2 Специфичность

Цель испытания: подтвердить возможность однозначного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината в присутствии компонентов матрицы сиропа (сахара, загустители, консерванты, ароматизаторы) без мешающих перекрытий в области удерживания целевых соединений [41,42,51,70,71].

Порядок исследования:

- растворитель (холостой);
- модель плацебо сиропа, содержащая ключевые вспомогательные вещества;
- стандартный раствор (уровень 100%);
- образец сиропа (рабочий раствор);
- растворитель (холостой) для оценки переноса.

Критерии специфичности.

Специфичность методики считается подтвержденной при одновременном выполнении следующих условий:

- Отсутствие мешающих сигналов: на хроматограммах растворителя и плацебо отсутствуют пики (или любые значимые отклики) в пределах временных окон удерживания целевых аналитов, которые могут затруднить идентификацию.
- Сопоставимость времени удерживания: в хроматограмме образца сиропа пики аналитов идентифицируются по совпадению времени удерживания со стандартным раствором; допустимое отклонение составляет $\Delta t_R = \pm 0,2-0,3$ мин.
- Подтверждение идентичности по спектрам: УФ-спектры для соответствующих пиков в образце и в стандарте, согласуются между

собой.

- Контроль переноса (carry-over): после анализа образца сиропа выполняют ввод растворителя. Специфичность считается подтвержденной при отсутствии пика в областях удерживания аналитов либо при уровне отклика в растворителе $\leq 0,1$ % от отклика соответствующего аналита в образце [38-42].

Результаты исследования специфичности приведены в таблице 8.

Таблица 8 Результаты оценки специфичности методики

Аналит	t _R стандарт (мин)	t _R сироп (мин)	Δt _R	Мешающий пик в растворителе / плацебо (Да/Нет)	Подтверждение спектра
Аскорбиновая кислота	2,204	2,202	0,002	Нет	Да
Ацикловир	6,431	6,400	0,031	Нет	Да
Натрий глицирризинат	14,444	14,429	0,015	Нет	Да

Хроматограммы и УФ-спектры: на рисунках 8-15 приведены хроматограммы пригодности хроматографической системы.

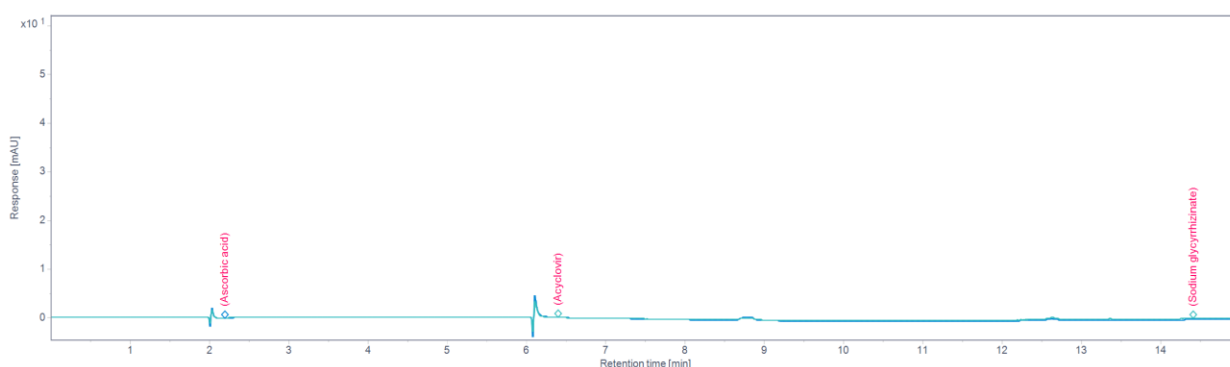


Рисунок 8 – хроматограмма холостой пробы перед проведением анализов

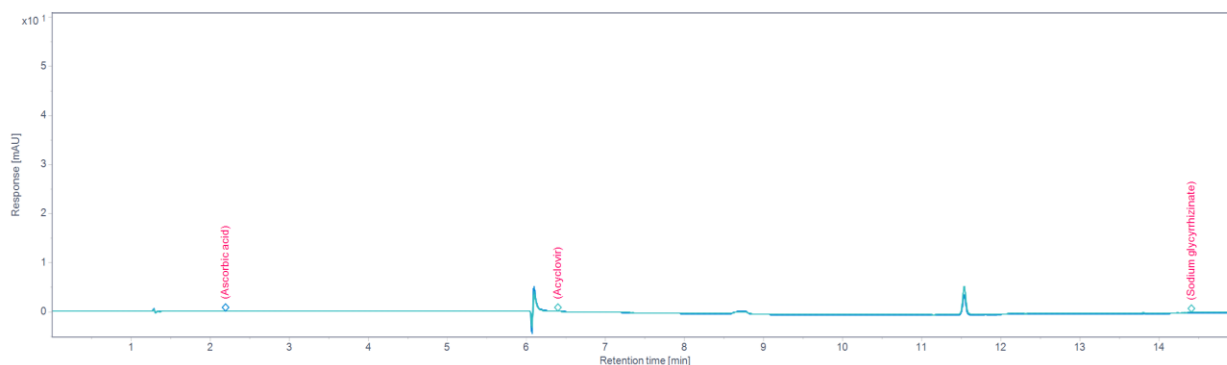


Рисунок 9 – хроматограмма модели плацебо сиропа

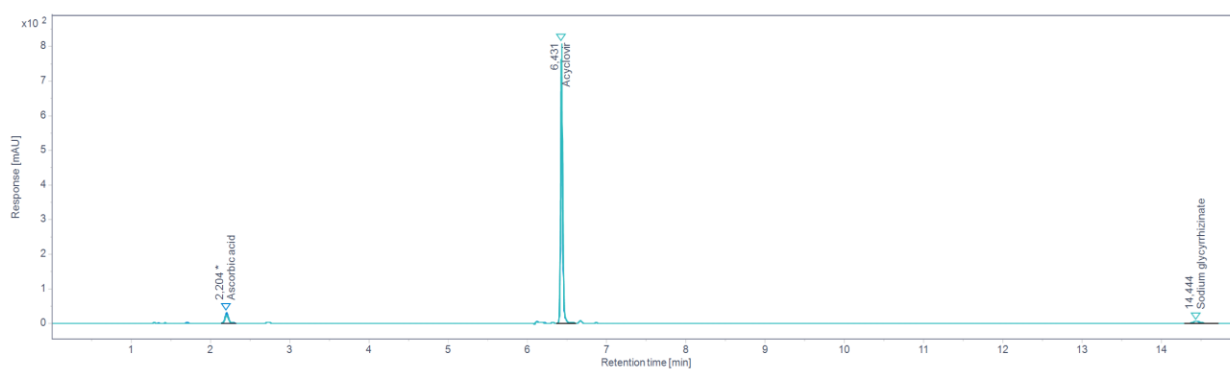


Рисунок 10 – хроматограмма стандартного раствора (уровень 100%)

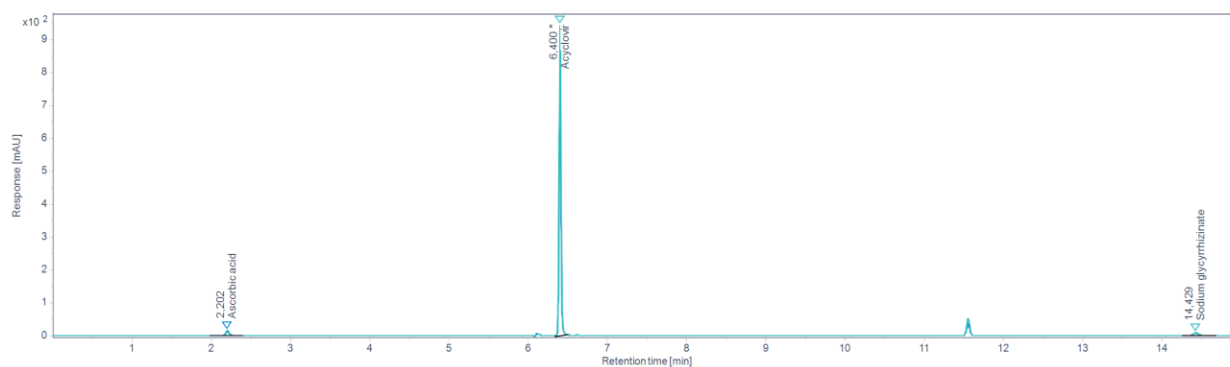


Рисунок 11 – хроматограмма рабочего раствора образца сиропа

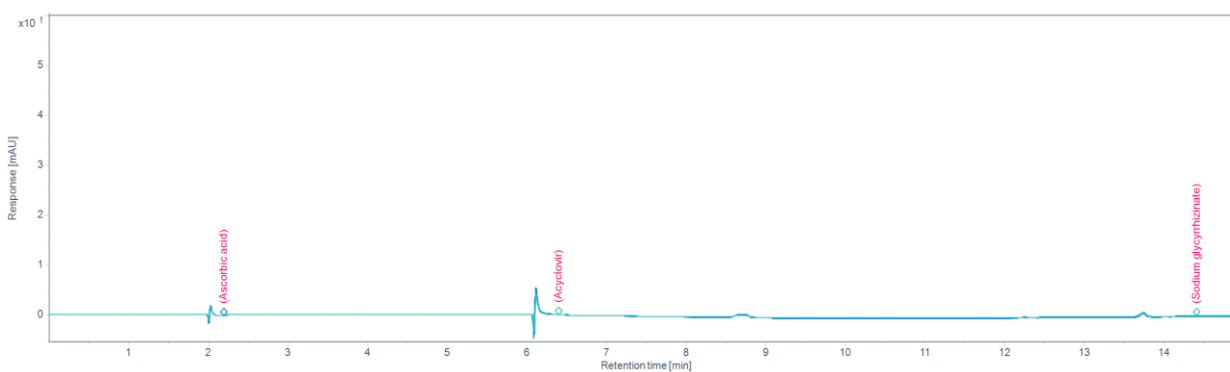


Рисунок 12 – хроматограмма холостой пробы для оценки переноса

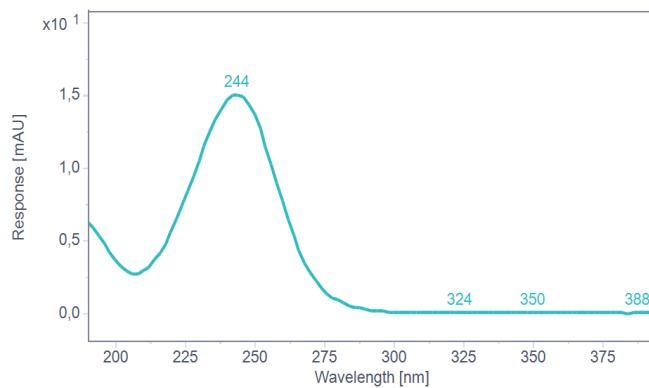
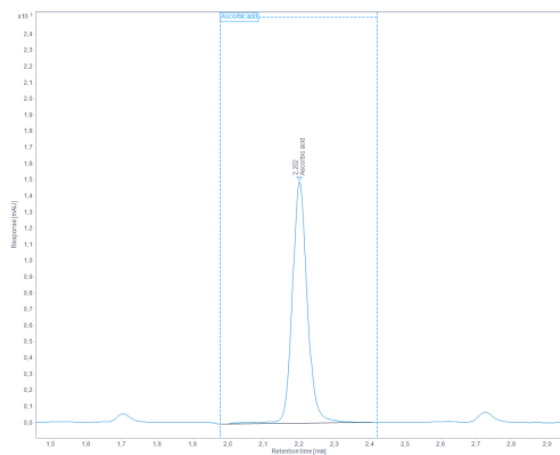


Рисунок 13 – хроматограмма пика и УФ-спектра аскорбиновой кислоты

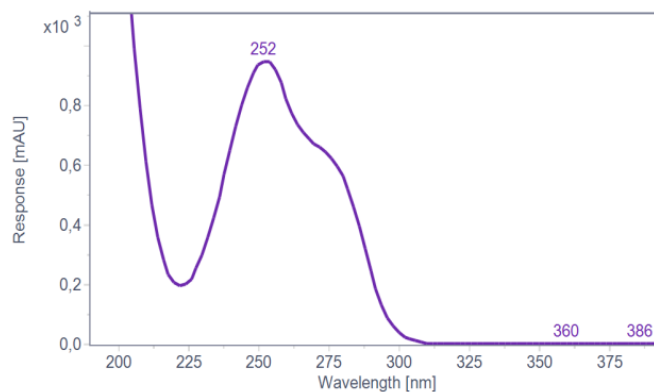
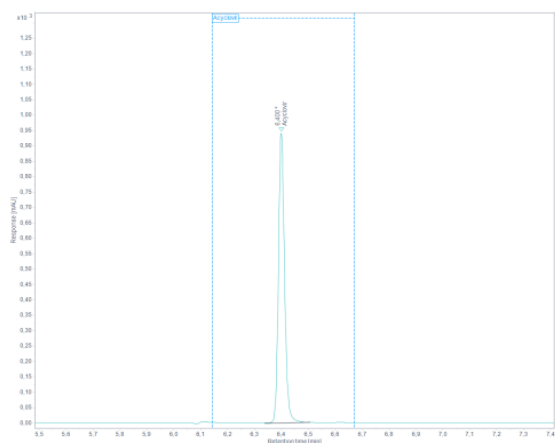


Рисунок 14 – хроматограмма пика и УФ-спектра ацикловира

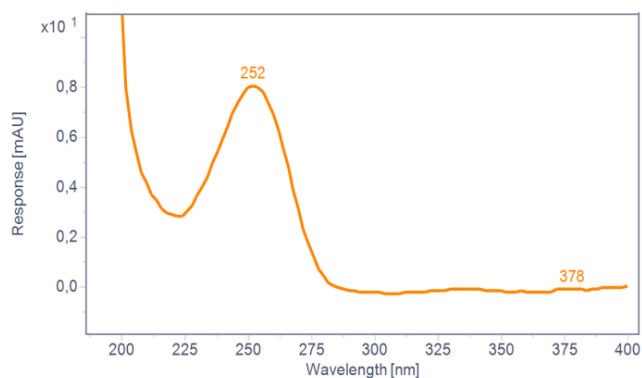
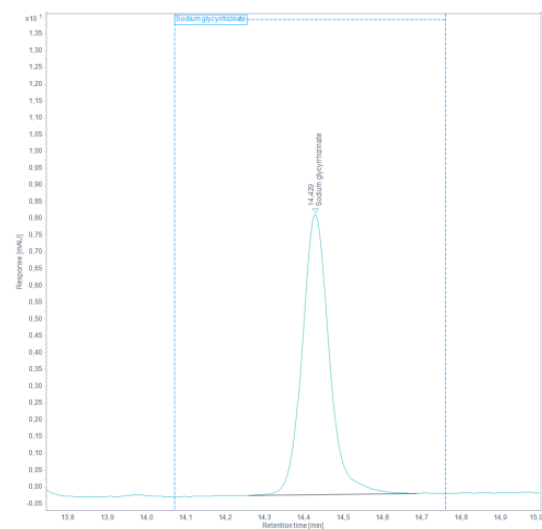


Рисунок 15 – хроматограмма пика и УФ-спектра натрий глицирризината

Вывод по специфичности.

В ходе исследования установлено:

- отсутствие мешающих пиков в области удерживания целевых аналитов в растворителе и плацебо;
- совпадение времени удерживания стандартов и аналитов в сиропе ($\Delta t_R \leq 0,03$ мин);
- подтверждение идентичности по УФ-спектрам DAD;
- отсутствие переноса (carry-over) после анализа высококонцентрированного образца.

Таким образом, метод обеспечивает селективное определение аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината в сложной матрице сиропа.

Специфичность методики подтверждена.

3.3.3 Линейность

Цель испытания. Подтвердить линейную зависимость аналитического отклика (площадь пика) от концентрации аналита в установленном диапазоне [41,42,65,70].

Дизайн эксперимента. Линейность методики исследована в диапазоне 25-125% от номинальной концентрации аналитов, что соответствует концентрациям 2-10 мг/л для глицирризината натрия, 5-25 мг/л для аскорбиновой кислоты и 10-50 мг/л для ацикловира.

Расширенный диапазон калибровки выбран для оценки линейности отклика детектора в условиях значительных вариаций концентрации и для проверки устойчивости методики к возможному переносу аналита при анализе высококонцентрированных образцов. Включение пониженных концентраций позволяет дополнительно охарактеризовать чувствительность метода и его пригодность для определения аналитов при снижении их содержания в исследуемой матрице.

Каждый уровень анализировали 3 раза. Результаты оценки линейности представлены в таблицах 9-11.

Критерии линейности:

- $r \geq 0,999$;
- $R^2 \geq 0,99$;
- относительное отклонение по уровням не превышает 2 %.

Таблица 9- Результаты оценки линейности для аскорбиновой кислоты

Уровень	Концентрация исходная (мг/л)	Площадь пика средняя (mAU·s)	Концентрация рассчитанная (мг/л)	Отклонение, %
1	5	30,482	5,02	0,43
2	10	61,867	9,88	-1,18
3	15	94,461	14,93	-0,47
4	20	127,062	19,98	-0,11
5	25	160,155	25,10	0,41

Таблица 10- Результаты оценки линейности для ацикловира

Уровень	Концентрация исходная (мг/л)	Площадь пика средняя (mAU·s)	Концентрация рассчитанная (мг/л)	Отклонение, %
1	10	331,118	10,13	1,27
2	20	667,559	20,25	1,23
3	30	1005,961	30,42	1,41
4	40	1342,175	40,53	1,34
5	50	1653,258	49,89	-0,22

Таблица 11- Результаты оценки линейности для натрия глицирризината

Уровень	Концентрация исходная (мг/л)	Площадь пика средняя (mAU·s)	Концентрация рассчитанная (мг/л)	Отклонение, %
1	2	8,593	2,04	1,94
2	4	17,115	3,94	-1,63
3	6	26,342	5,99	-0,20
4	8	35,035	7,92	-0,98
5	10	44,752	10,08	0,84

Хроматограммы подтверждения линейности методики (рисунки 16-18):

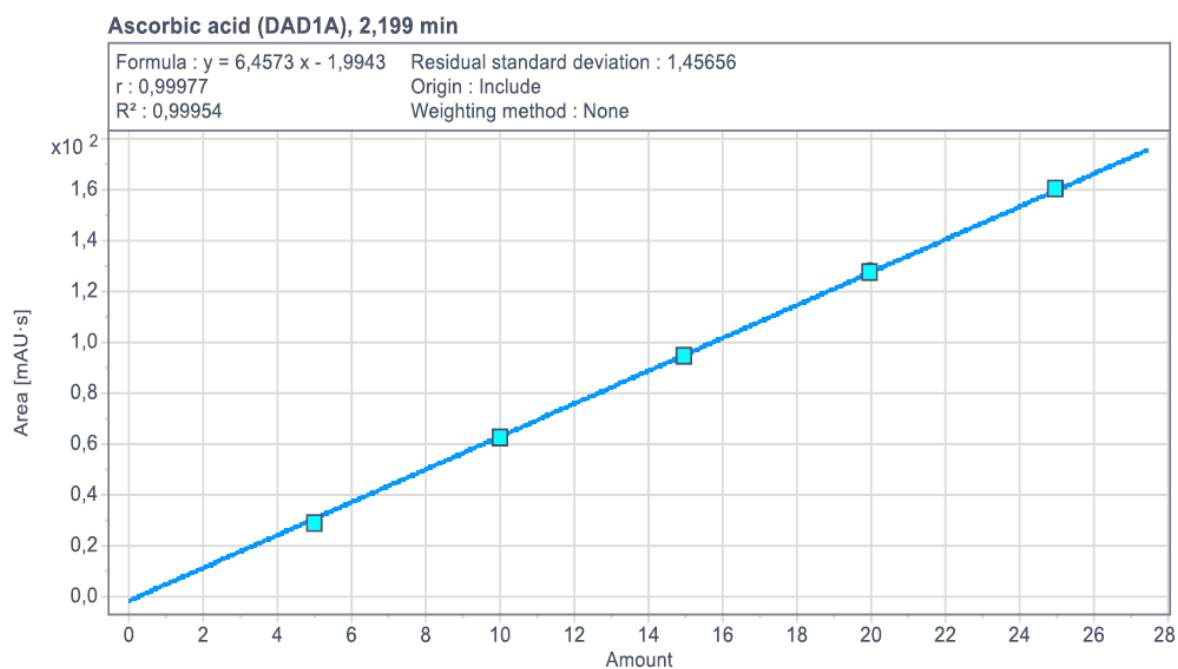


Рисунок 16 – график калибровочной кривой аскорбиновой кислоты

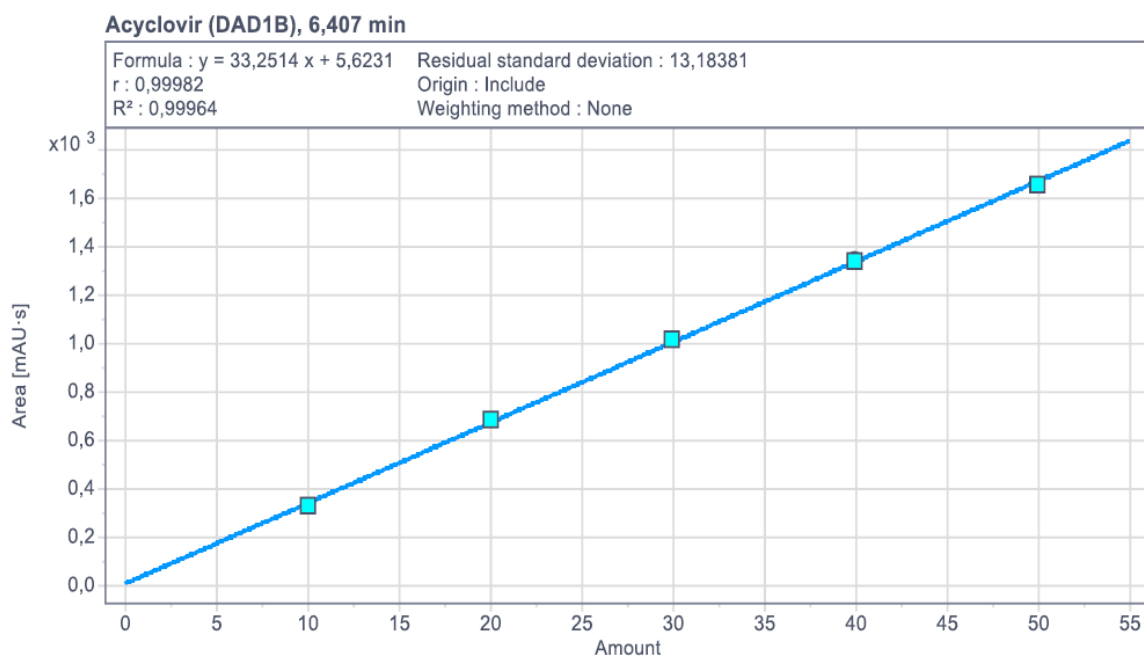


Рисунок 17 – график калибровочной кривой ацикловира

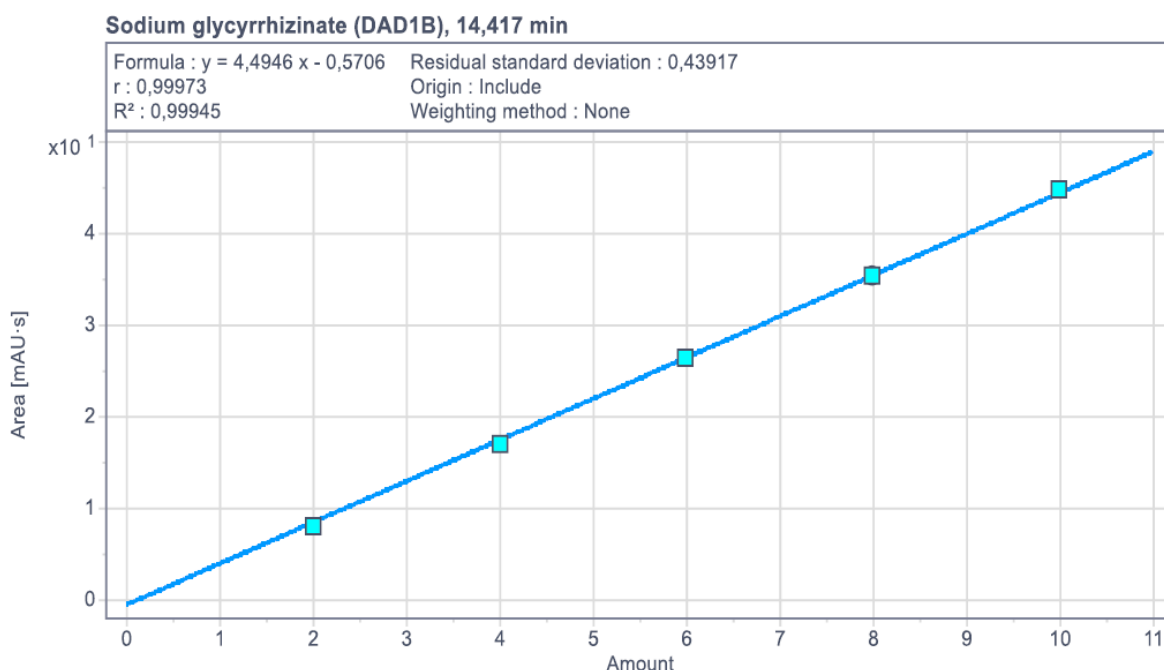


Рисунок 18 – график калибровочной кривой натрий глицирризината

Во всех исследованных диапазонах концентраций установлена линейная зависимость площади пика от концентрации:

- коэффициент корреляции $r \geq 0,999$;
- коэффициент детерминации $R^2 \geq 0,999$;
- отклонение рассчитанной концентрации от номинальной не превышает $\pm 2 \%$.

Линейность сохраняется во всем рабочем диапазоне 80–120 % от номинала, что подтверждает пригодность метода для количественного анализа при вариациях содержания действующих веществ.

Линейность методики подтверждена.

3.3.4 Повторяемость

Цель испытания: подтвердить воспроизводимость результатов при повторных определениях образца комбинированного сиропа в одинаковых условиях (одна серия, короткий интервал времени) [41,42].

Дизайн эксперимента. Выполнено 6 повторных определений на уровне 100% при одинаковой пробоподготовке.

Критерий: RSD результата $\leq 2,0 \%$.

Таблица 12- Повторяемость для аскорбиновой кислоты

	1	2	3	4	5	6	Среднее	SD	RSD, %
Площадь пика (mAU·s)	129,44	132,35	130,12	131,78	131,15	135,71	132,22	2,118	1,602

Таблица 13- Повторяемость для ацикловира

	1	2	3	4	5	6	Среднее	SD	RSD, %
Площадь пика (mAU·s)	1467,5	1428,44	1448,78	1433,18	1462,12	1457,72	1446,05	14,812	1,024

Таблица 14- Повторяемость для натрий глицирризината

	1	2	3	4	5	6	Среднее	SD	RSD, %
Площадь пика (mAU·s)	37,421	36,723	37,11	37,82	38,07	37,74	37,49	0,557	1,485

Хроматограммы повторяемости результатов (рисунки 19-24):

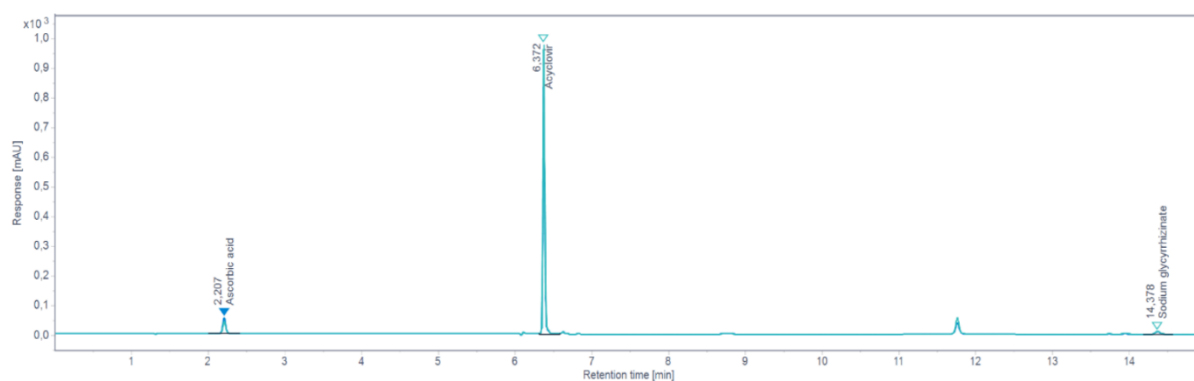


Рисунок 19 – хроматограмма образца сиропа (1)

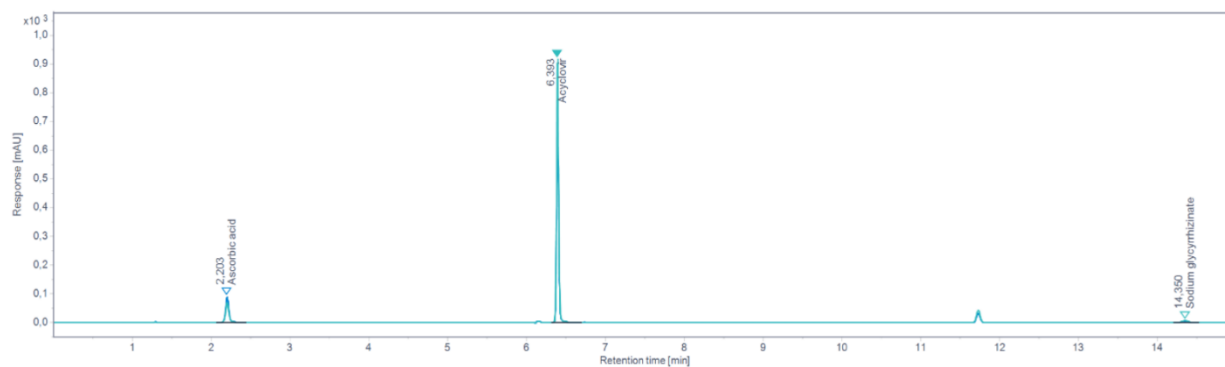


Рисунок 20 – хроматограмма образца сиропа (2)

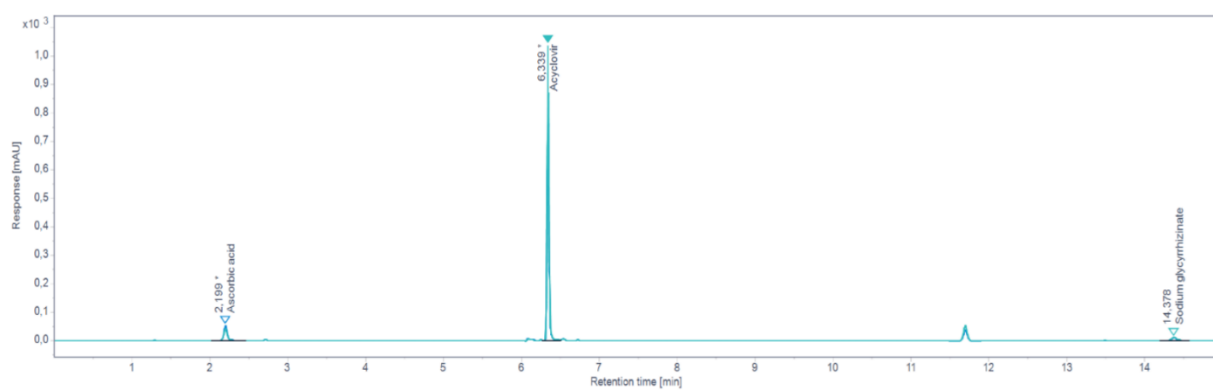


Рисунок 21 – хроматограмма образца сиропа (3)

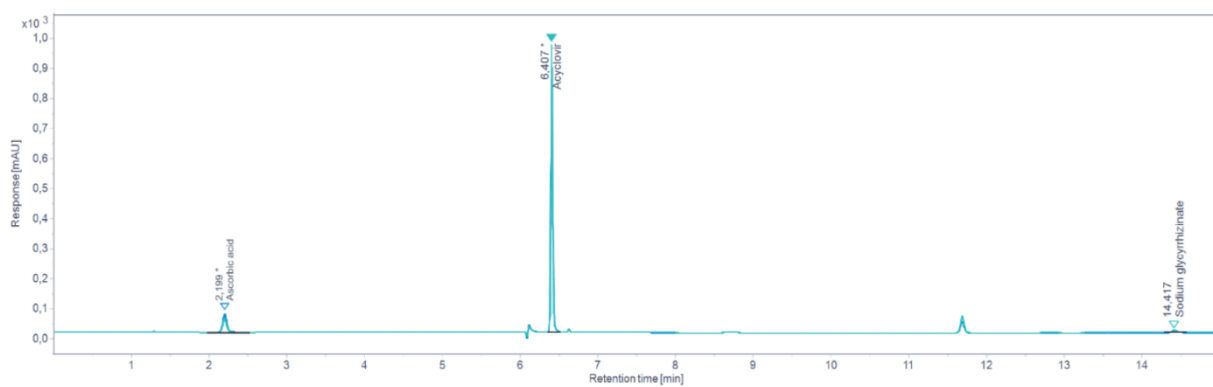


Рисунок 22 – хроматограмма образца сиропа (4)

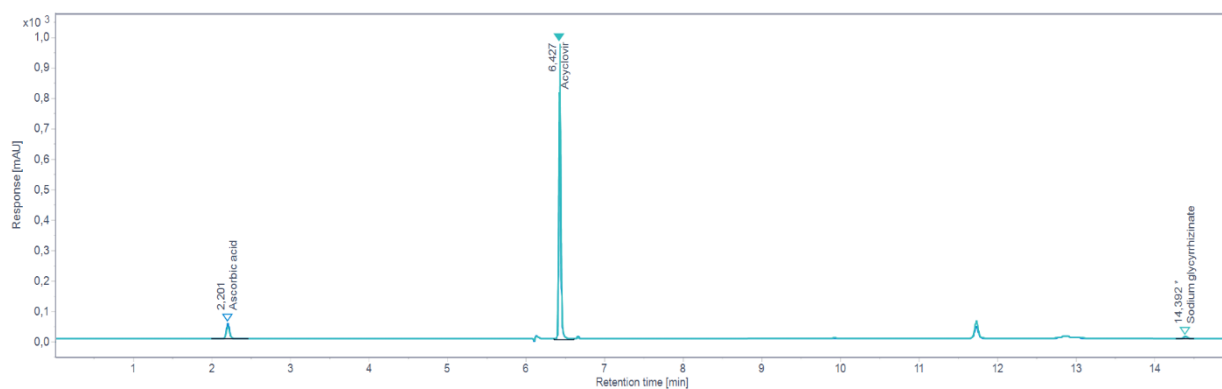


Рисунок 23 – хроматограмма образца сиропа (5)

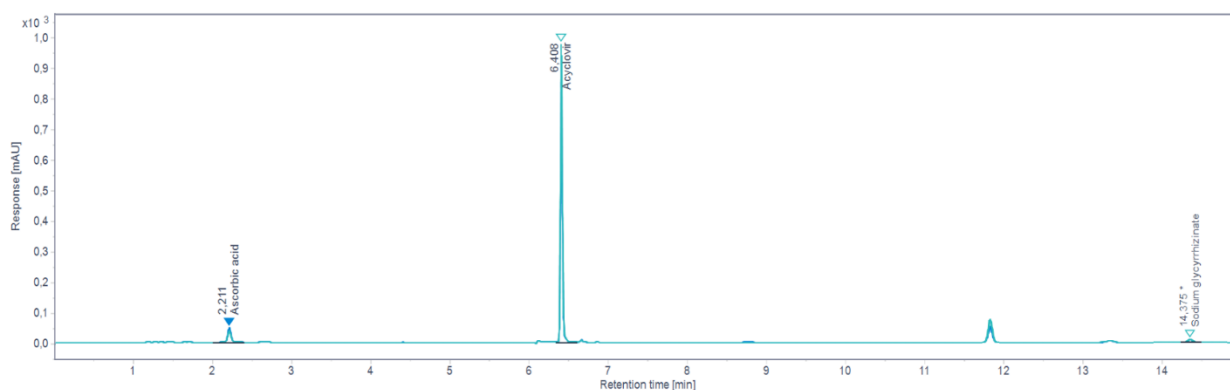


Рисунок 24 – хроматограмма образца сиропа (6)

Вывод по повторяемости.

Для шести параллельных определений уровня 100% получены значения RSD площади пика:

- аскорбиновая кислота – 1,60 %
- ацикловир – 1,02 %
- натрий глицирризинат – 1,49 %

Все значения не превышают установленного предела 2,0 %. Это подтверждает воспроизводимость пробоподготовки, стабильность хроматографической системы и корректность интеграции пиков.

Повторяемость методики подтверждена.

3.3.5 Правильность

Цель испытания: оценить степень соответствия полученного результата истинному значению в условиях анализа реальной матрицы сиропа [41,42,65].

Дизайн эксперимента. Оценку правильности проводили методом добавок на уровнях 80 / 100 / 120 % от номинала. Для каждого уровня выполняли 3 независимых приготовлений, всего 3 определений на аналит (данные приведены в таблицах 15-17).

Критерии правильности

Восстановление должно находиться в пределах 98-102 %.

Таблица 15- Правильность для аскорбиновой кислоты

Уровень	С _{теор} , мг/л	Площадь пика (mAU·s)	С _{найд} , мг/л	Recovery, %	SD	RSD, %
80%	16	102,89	16,24	101,47	0,79	0,78
100%	20	128,1	20,14	100,7	0,61	0,61
120%	24	153,1	24,01	100,04	1,01	1,01

Таблица 16- Правильность для ацикловира

Уровень	С _{теор} , мг/л	Площадь пика (mAU·s)	С _{найд} , мг/л	Recovery, %	SD	RSD, %
80%	32	1074,33	32,48	101,50	0,94	0,93
100%	40	1350,87	40,80	101,99	0,24	0,23
120%	48	1618,77	48,85	101,78	0,31	0,30

Таблица 17- Правильность для натрий глицирризината

Уровень	С _{теор} , мг/л	Площадь пика (mAU·s)	С _{найд} , мг/л	Recovery, %	SD	RSD, %
80%	6,4	28,53	6,48	101,18	1,40	1,39
100%	8,0	35,90	8,11	101,43	0,83	0,82
120%	9,6	42,30	9,54	99,36	1,39	1,40

Хроматограммы оценки степени соответствия (правильности) (рисунки 25-27):

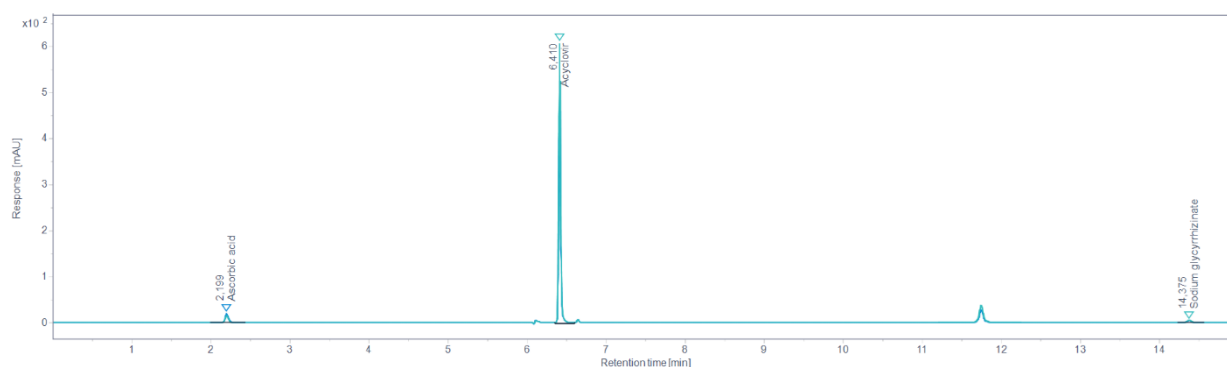


Рисунок 25 – хроматограмма образца сиропа на уровне 80%

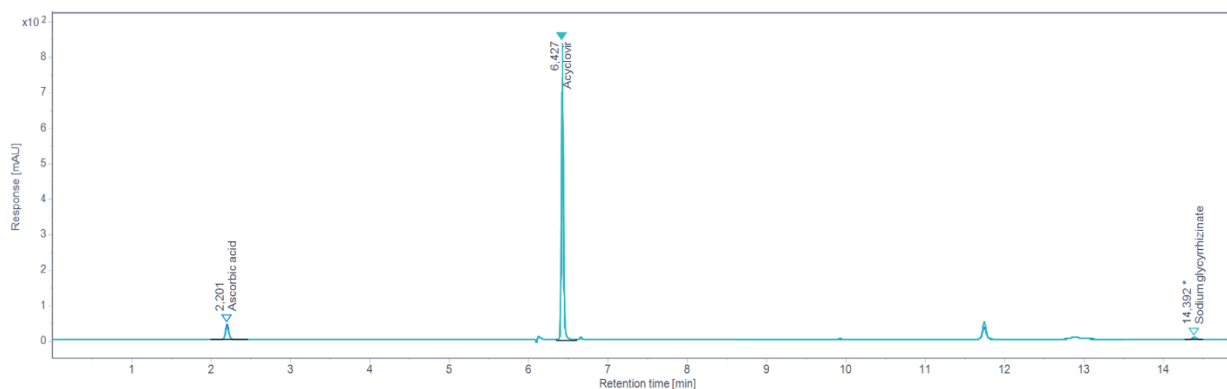


Рисунок 26 – хроматограмма образца сиропа на уровне 100%

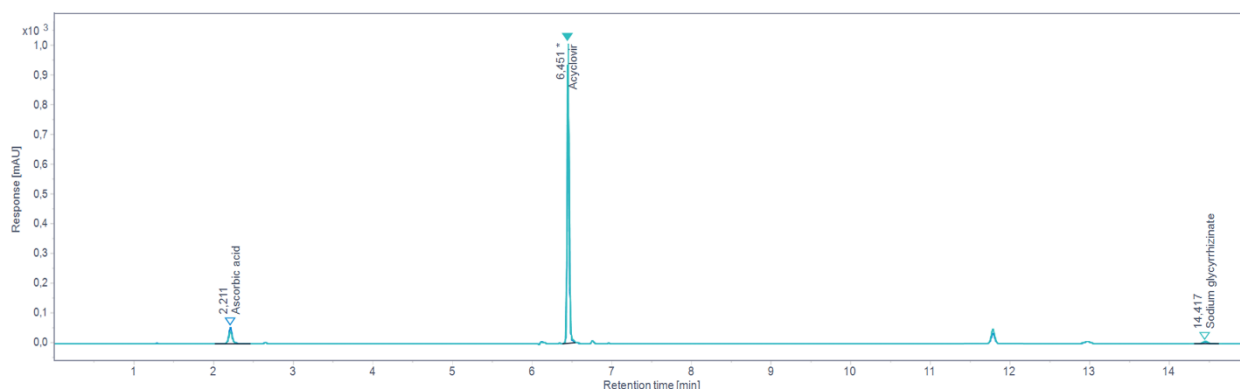


Рисунок 27 – хроматограмма образца сиропа на уровне 120%

Вывод по правильности.

При проведении оценки методом добавок получены значения восстановления:

- 99,36-101,99 % для всех аналитов;
- $RSD \leq 1,4 \%$.

Результаты находятся в пределах установленного критерия 98-102 %, что подтверждает отсутствие систематической ошибки и корректность количественного расчета в присутствии матрицы сиропа.

Правильность методики подтверждена.

3.3.6 Робастность

Цель испытания: оценить устойчивость методики к небольшим преднамеренным изменениям параметров анализа, которые могут возникать при рутинной эксплуатации (данные указаны в таблицах 18-20) [41,42,65,66]. Выбор параметров для исследования робастности обусловлен их потенциальным влиянием на удерживание и ионизацию аналитов (pH) и на кинетику массообмена (скорость потока).

Дизайн эксперимента. Проводили анализ образца сиропа при изменении одного параметра за раз:

- скорость потока: 0,45 мл/мин и 0,55 мл/мин ($\pm 10\%$);
- pH фазы А: 2,95 и 3,05 (± 0.5).

Оцениваемые показатели.

- При изменении условий должны сохраняться:
- $RSD (Area)$ в пределах 2,0 %;
- асимметрия пиков ($As \leq 2,0$);
- изменение результата активного вещества не превышает 5 %.

Таблица 18- Робастность для аскорбиновой кислоты

Условие	t _R (мин)	Площадь пика (mAU·s)	A _s	Результат (%)	Оценка (соответствует/не соответствует)
Номинал	2,202	130,12	1,153	100	соответствует
Поток 0,45 мл/мин	2,214	132,68	1,19	101,97	соответствует
Поток 0,55 мл/мин	2,083	129,11	1,07	99,22	соответствует
pH 2,95	2,221	135,27	1,23	103,96	соответствует
pH 3,05	2,082	127,35	1,16	97,87	соответствует

Таблица 19- Робастность для ацикловира

Условие	t _R (мин)	Площадь пика (mAU·s)	A _s	Результат (%)	Оценка (соответствует/не соответствует)
Номинал	6,400	1448,78	1,155	100	соответствует
Поток 0,45 мл/мин	6,348	1483,96	1,22	102,43	соответствует
Поток 0,55 мл/мин	6,309	1441,52	1,05	99,5	соответствует
pH 2,95	6,510	1512,14	1,27	104,37	соответствует
pH 3,05	6,317	1458,22	1,13	100,65	соответствует

Таблица 20- Робастность для натрий глицирризината

Условие	t _R (мин)	Площадь пика (mAU·s)	A _s	Результат (%)	Оценка (соответствует/не соответствует)
Номинал	14,429	37,11	1,09	100	соответствует
Поток 0,45 мл/мин	14,478	37,98	1,13	102,35	соответствует
Поток 0,55 мл/мин	14,301	36,44	1,02	98,19	соответствует
pH 2,95	14,500	38,31	1,20	103,24	соответствует
pH 3,05	14,233	36,94	1,11	99,54	соответствует

Хроматограммы устойчивости методики к небольшим преднамеренным изменениям параметров анализа (робастность) (рисунки 28-31):

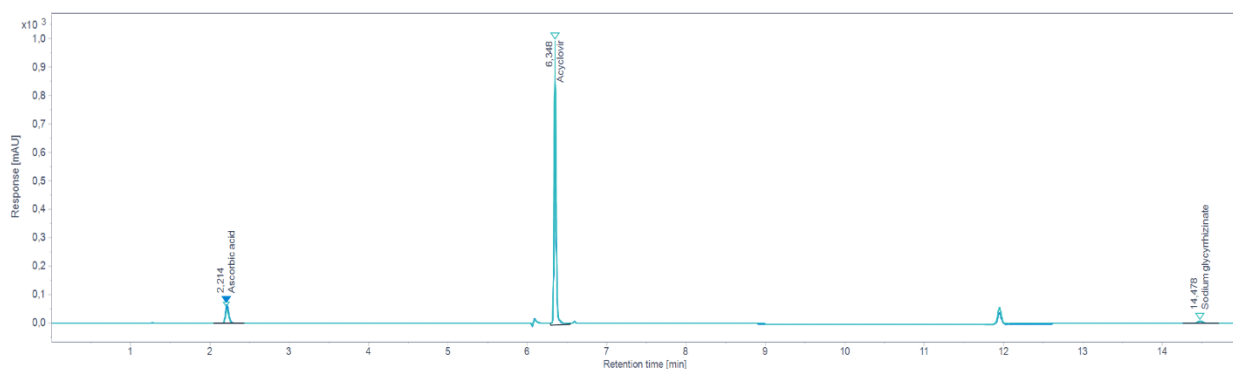


Рисунок 28 – хроматограмма образца сиропа при скорости подвижной фазы 0,45 мл/мин

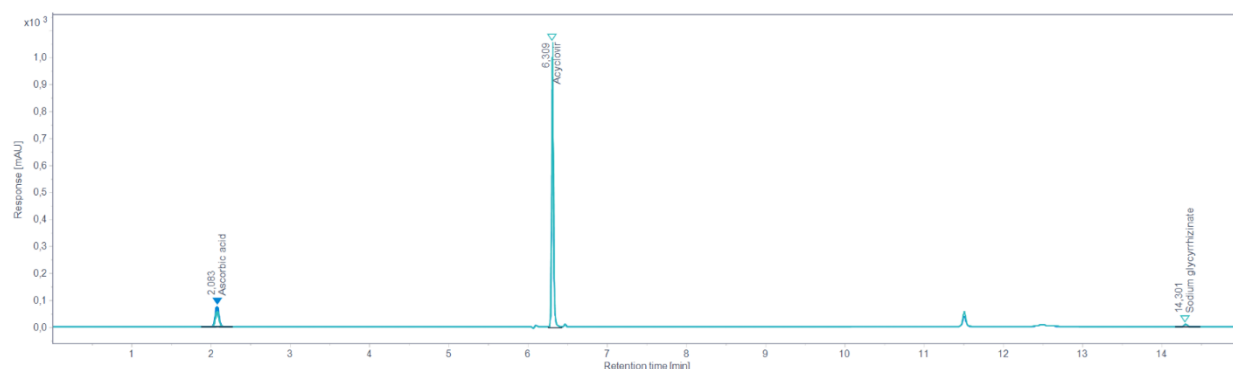


Рисунок 29 – хроматограмма образца сиропа при скорости подвижной фазы 0,55 мл/мин

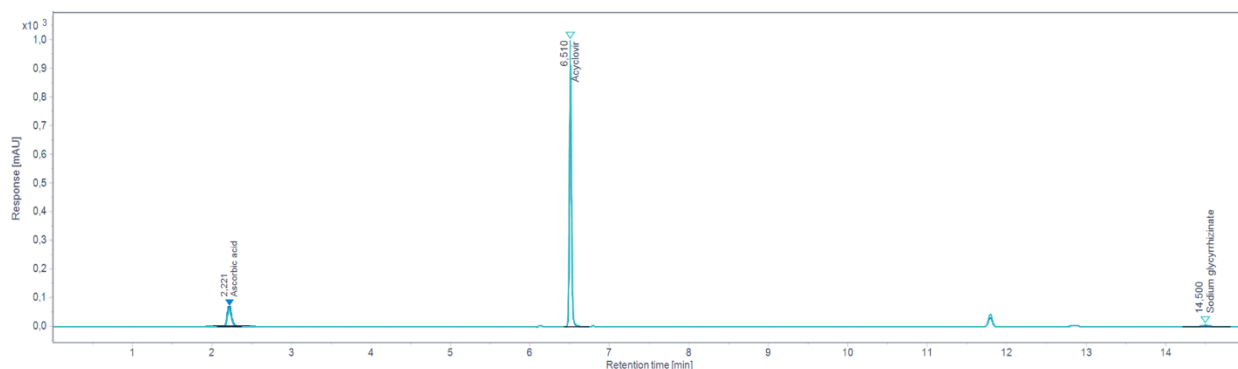


Рисунок 30 – хроматограмма образца сиропа при pH подвижной фазы 2,95

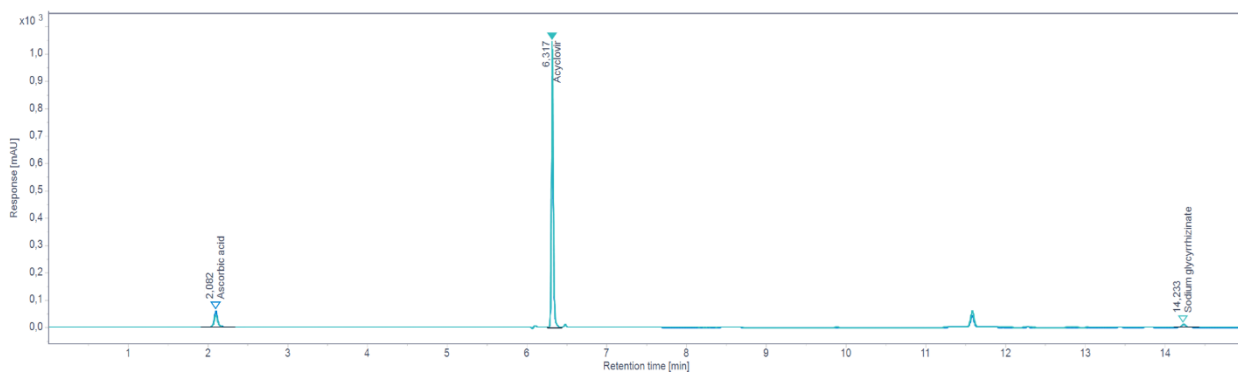


Рисунок 31 – хроматограмма образца сиропа при pH подвижной фазы 3,05

Вывод по робастности.

- При варьировании скорости потока ($\pm 10\%$) и pH ($\pm 0,05$):
- отклонение количественного результата не превышает 5% ;
- $As \leq 1,3$ во всех условиях;
- ухудшения формы пиков не наблюдается.

Изменения параметров не оказывают статистически значимого влияния на результаты анализа.

Разрешение между пиком натрия глицирризината и пиком нипагина ($t_R \sim 11,5-12,0$ мин) составляло не менее $5,0$ во всех испытанных условиях, что значительно превышает минимально допустимое значение $RS \geq 1,5$ [22-24,51]. Перекрывание пиков отсутствовало.

Методика демонстрирует удовлетворительную робастность.

3.4. Результаты исследования микробиологической чистоты

Микробиологические исследования проводились в санитарно-эпидемиологической лаборатории с использованием стандартизованных методов анализа [21,23].

Исследование суспензионного сиропа проводили спустя $3,5$ месяца хранения с целью оценки микробиологической стабильности лекарственной формы в процессе хранения и подтверждения соответствия препарата требованиям, предъявляемым к нестерильным жидким лекарственным средствам для перорального применения.

В ходе исследования определяли:

- Общее количество аэробных микроорганизмов (ТАМС);
- Общее количество дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС);
- бактерии группы кишечной палочки (БГКП);
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Salmonella* spp.;
- *Bacillus cereus*.

Контроль *Bacillus cereus* проводили дополнительно, поскольку данный микроорганизм может присутствовать в сырье растительного происхождения [46]. Натрия глицирризинат, входящий в состав исследуемого сиропа, является производным компонентом корня солодки, что обуславливало необходимость оценки данного показателя при исследовании микробиологической чистоты препарата.

Результаты исследования микробиологической чистоты представлены в таблице 21.

**Таблица 21 – Результаты исследования микробиологической чистоты
суспензионного сиропа**

Показатель	Результат	Нормативные требования
Общее количество аэробных микроорганизмов (ТАМС)	$< 1 \times 10^2$ КОЕ/г	$\leq 1 \times 10^3$ КОЕ/г
Общее количество дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС)	$< 1 \times 10^1$ КОЕ/г	$\leq 1 \times 10^2$ КОЕ/г
<i>Escherichia coli</i>	Не обнаружено	отсутствие
бактерии группы кишечной палочки (БГКП)	Не обнаружено	отсутствие
<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	отсутствие
<i>Salmonella</i> spp	Не обнаружено	отсутствие
<i>Bacillus cereus</i>	$< 1 \times 10^2$ КОЕ/г	$\leq 2 \times 10^2$ КОЕ/г

Полученные результаты показали соответствие исследуемого суспензионного сиропа требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан, т. I, раздел 2.6.12. по показателям микробиологической чистоты [21].

Значения ТАМС и ТУМС находились в пределах допустимых нормативных значений, а санитарно-показательные патогенные микроорганизмы в исследуемом образце не обнаружены.

Полученные данные свидетельствуют о микробиологической стабильности исследуемой лекарственной формы в процессе хранения и подтверждают соответствие препарата установленным требованиям безопасности.

3.5 Разработка спецификации качества

Разработка спецификации качества комбинированного лекарственного препарата проводилась с учетом требований нормативных документов, регламентирующих показатели качества лекарственных средств для перорального применения, включая Приказ МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 [21-24].

В соответствии с положениями указанного документа, а также требованиями Государственной фармакопеи Республики Казахстан и Фармакопеи Евразийского экономического союза, для жидких лекарственных форм предусмотрен комплекс показателей, обеспечивающих контроль качества, безопасности и стабильности лекарственного препарата [21-24].

С учетом состава суспензионного сиропа, включающего ацикловир, натрия глицирризинат и аскорбиновую кислоту, а также результатов проведенных экспериментальных исследований, сформирована спецификация качества, представленная в таблице 22

При выборе показателей учитывались особенности лекарственной формы и физико-химические свойства действующих веществ. В частности,

наличие в составе малорастворимого ацикловира обуславливает необходимость контроля размера частиц и устойчивости суспензии, тогда как присутствие аскорбиновой кислоты требует контроля pH среды ввиду ее склонности к окислению. Натрия глицирризинат, обладая поверхностно-активными свойствами, оказывает влияние на стабильность дисперсной системы, что также учитывалось при формировании показателей качества [23,38-40].

В разработанную спецификацию качества включены органолептические, физико-химические, микробиологические показатели, позволяющие всесторонне охарактеризовать качество препарата и обеспечить его соответствие фармакопейным требованиям.

Таблица 22- Спецификация качества комбинированного лекарственного препарата

Показатель	Требования к качеству	Метод испытания
Внешний вид	Однородная непрозрачная суспензия белого или светло-желтого цвета; Допускается образование осадка, полностью ресуспендируемого при встряхивании.	Визуальная оценка, ФЕАЭС, т. I, 2.5.1.33
Идентификация действующих веществ	Подтверждение наличия ацикловира, натрия глицирризината и аскорбиновой кислоты	ВЭЖХ-УФ/DAD, ФЕАЭС, т. I, 2.1.2.28
Кислотность (pH)	3,9-4,1	Потенциометрический метод, ФЕАЭС, т. I, 2.1.2.3
Стабильность суспензии	Восстановление однородности при встряхивании не более чем за 1 минуту	ФЕАЭС, т. I, 2.5.1.33
Дисперсность	Соответствие требованиям к суспензионным формам (не более 22 мкм)	ФЕАЭС, т. I, 2.1.9.25
Относительная плотность	1.230-1.240 г/мл	Пикнометрический метод, ФЕАЭС, т. I, 2.1.9.17
Однородность дозирования	Соответствует установленным фармакопейным пределам для многодозовых контейнеров	ФЕАЭС, т. I, 2.1.9.12
Микробиологическая чистота	ТАМС не более 10^3 КОЕ/мл; ТУМС не более 10^2 КОЕ/мл; Отсутствие патогенных микроорганизмов	ГФ РК, т. I, 2.6.12
Количественное содержание действующих веществ	90-110 % от заявленного содержания	ВЭЖХ-УФ/DAD, ФЕАЭС, т. I, 2.1.2.28

Упаковка	Флаконы из светонепроницаемого материала, обеспечивающие защиту от внешних факторов	ФЕАЭС, т. I, 2.4.2.1
Маркировка	Соответствие требованиям нормативной документации	Решение Совета ЕЭК №76 от 03.11.2016
Условия хранения	В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	В соответствии с Решением Коллегии ЕЭК №151 от 07.09.2018
Срок годности	Предварительно рекомендуемый срок годности — 2 года	В соответствии с Решением Коллегии ЕЭК №151 от 07.09.2018

Выводы

1. Результаты проведенных исследований подтвердили соответствие физико-химических и микробиологических показателей исследуемого суспензионного сиропа установленным требованиям.
2. Разработанная методика ВЭЖХ-УФ/DAD обеспечивала селективное разделение и количественное определение активных компонентов суспензионного сиропа.
3. Результаты валидации подтвердили пригодность разработанной методики для стандартизации и контроля качества комбинированного суспензионного сиропа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе настоящего исследования разработан проект спецификации качества комбинированного лекарственного препарата в форме суспензионного сиропа, содержащего ацикловир, аскорбиновую кислоту и натрия глицирризинат.
2. Проведен анализ литературных данных, посвященных современным подходам к терапии герпесвирусных инфекций, фармакологическим свойствам действующих веществ и методам стандартизации комбинированных лекарственных препаратов.
3. Разработана методика обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ/DAD для одновременного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината в составе комбинированного суспензионного сиропа.
4. Подобраны условия хроматографирования и пробоподготовки, обеспечивающие селективное разделение аналитов и минимизацию влияния компонентов сиропной матрицы на результаты анализа.
5. Результаты валидации подтвердили пригодность разработанной методики для количественного определения действующих веществ в составе комбинированного лекарственного препарата.
6. Установлено соответствие исследуемого суспензионного сиропа требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан по физико-химическим и микробиологическим показателям качества.
7. На основании полученных результатов сформирован проект спецификации качества комбинированного суспензионного сиропа, который может быть рекомендован при разработке нормативной документации и проведении дальнейшей стандартизации лекарственного препарата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанную методику ВЭЖХ-УФ/DAD для одновременного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрия глицирризината рекомендуется использовать для идентификации и количественного определения в составе исследуемого комбинированного суспензионного сиропа.
2. Предложенные подходы к стандартизации могут быть использованы при разработке проектов нормативной документации и спецификаций качества для многокомпонентных лекарственных препаратов в жидких лекарственных формах.
3. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейших исследованиях стабильности и совершенствовании состава комбинированного суспензионного сиропа.
4. Разработанные условия хроматографического анализа и пробоподготовки могут быть применены в практике фармацевтического анализа при исследовании многокомпонентных лекарственных форм, содержащих вещества с различными физико-химическими свойствами.
5. Материалы диссертационной работы рекомендуется использовать в образовательном процессе при изучении дисциплин «Фармацевтический анализ», «Фармацевтическая химия» и «Стандартизация лекарственных средств».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Whitley R.J., Roizman B. Herpes simplex viruses // *Lancet*. – 2001. – Vol. 357. – P. 1513–1518.
2. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*. 1998 Mar;26(3):541-53; quiz 554-5. doi: 10.1086/514600. PMID: 9524821.
3. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015 Oct 28;10(10):e0140765. doi: 10.1371/journal.pone.0140765. PMID: 26510007; PMCID: PMC4624804.
4. Corey L, Holmes KK. Genital herpes simplex virus infections: current concepts in diagnosis, therapy, and prevention. *Ann Intern Med*. 1983 Jun;98(6):973-83. doi: 10.7326/0003-4819-98-6-973. PMID: 6344713.
5. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*. 2010 Jun 16;143(1):52-69. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.014. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20346601; PMCID: PMC2995426.
6. Kennedy PG, Rovnak J, Badani H, Cohrs RJ. A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation. *J Gen Virol*. 2015 Jul;96(Pt 7):1581-602. doi: 10.1099/vir.0.000128. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25794504; PMCID: PMC4635449.
7. Mocarski E.S., Shenk T., Pass R.F. Cytomegaloviruses // *Fields Virology*. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. – P. 1960–2014.
8. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):757-68. doi: 10.1038/nrc1452. PMID: 15510157.
9. Heldwein EE, Krummenacher C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jun;65(11):1653-68. doi: 10.1007/s00018-008-7570-z. PMID: 18351291; PMCID: PMC11131758.
10. Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 May;36(3):684-705. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00320.x. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22150699; PMCID: PMC3492847.
11. Paludan, Søren Riis and Andrew G. Bowie. “Immune sensing of DNA.” *Immunity* 38 5 (2013): 870-80.
12. Rasmussen SB, Sørensen LN, Malmgaard L, Ank N, Baines JD, Chen ZJ, Paludan SR. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol*. 2007 Dec;81(24):13315-24. doi: 10.1128/JVI.01167-07. Epub 2007 Oct 3. PMID: 17913820; PMCID: PMC2168887.

13. De Clercq, Erik. (2004). De Clercq E Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 30: 115-133. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 30. 115-33. 10.1016/j.jcv.2004.02.009.
14. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Feb;55(2):459-72. doi: 10.1128/AAC.00615-10. Epub 2010 Nov 15. PMID: 21078929; PMCID: PMC3028810.
15. Miller RL, Tomai MA, Harrison CJ, Bernstein DI. Immunomodulation as a treatment strategy for genital herpes: review of the evidence. *Int Immunopharmacol*. 2002 Mar;2(4):443-51. doi: 10.1016/s1567-5769(01)00184-9. PMID: 11962724.
16. Elion GB. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother*. 1983 Sep;12 Suppl B:9-17. doi: 10.1093/jac/12.suppl_b.9. PMID: 6313600.
17. De Clercq E. Selective anti-herpesvirus agents. *Antivir Chem Chemother*. 2013 Jan 23;23(3):93-101. doi: 10.3851/IMP2533. PMID: 23343513.
18. Soul-Lawton, Jean, Emma J. Seaber, N On, Raymond Wootton, Paul Rolan and John Posner. "Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (1995): 2759 - 2764.
19. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):114-28. doi: 10.1128/CMR.16.1.114-128.2003. PMID: 12525428; PMCID: PMC145299.
20. Balfour HH Jr, Bean B, Mitchell CD, Sachs GW, Boen JR, Edelman CK. Acyclovir in immunocompromised patients with cytomegalovirus disease. A controlled trial at one institution. *Am J Med*. 1982 Jul 20;73(1A):241-8. doi: 10.1016/0002-9343(82)90099-7. PMID: 6285715.
21. Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Т. I. – Алматы, 2008.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. ОФС.1.2.1.2.0005. Высокоэффективная жидкостная хроматография. – М., 2023.
23. Фармакопея Евразийского экономического союза. – Т. I. – Минск, 2020.
24. European Pharmacopoeia. – 11th ed. – Strasbourg: EDQM, 2023.
25. Жиялкова Е.Т., Баскакова А.В., Новикова М.Ю., Кузьмичева О.А. Сравнительная характеристика методов анализа ацикловира // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – №25(168). – Вып. 24/1. – С. 100–103.

26. Fiore C, Eisenhut M, Krausse R, Ragazzi E, Pellati D, Armanini D, Bielenberg J. Antiviral effects of Glycyrrhiza species. *Phytother Res.* 2008 Feb;22(2):141-8. doi: 10.1002/ptr.2295. PMID: 17886224; PMCID: PMC7167979.
27. Pompei R, Flore O, Marccialis MA, Pani A, Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature.* 1979 Oct 25;281(5733):689-90. doi: 10.1038/281689a0. PMID: 233133.
28. Chirumbolo S. Commentary: The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Front Microbiol.* 2016 Apr 18;7:531. doi: 10.3389/fmicb.2016.00531. PMID: 27148220; PMCID: PMC4834445.
29. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res.* 2008 Jun;22(6):709-24. doi: 10.1002/ptr.2362. PMID: 18446848; PMCID: PMC7167813.
30. Baltina LA. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Curr Med Chem.* 2003 Jan;10(2):155-71. doi: 10.2174/0929867033368538. PMID: 12570715.
31. Pastorino G, Cornara L, Soares S, Rodrigues F, Oliveira MBPP. Liquorice (Glycyrrhiza glabra): A phytochemical and pharmacological review. *Phytother Res.* 2018 Dec;32(12):2323-2339. doi: 10.1002/ptr.6178. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30117204; PMCID: PMC7167772.
32. Hemilä H. Vitamin C and Infections. *Nutrients.* 2017 Mar 29;9(4):339. doi: 10.3390/nu9040339. PMID: 28353648; PMCID: PMC5409678.
33. Carr, Anitra C. and Silvia Maggini. "Vitamin C and Immune Function." *Nutrients* 9 (2017): n. pag.
34. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(4):301-23. doi: 10.1159/000107673. Epub 2007 Aug 28. PMID: 17726308.
35. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;86(16):6377-81. doi: 10.1073/pnas.86.16.6377. PMID: 2762330; PMCID: PMC297842.
36. Padayatty SJ, Levine M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* 2016 Sep;22(6):463-93. doi: 10.1111/odi.12446. Epub 2016 Apr 14. PMID: 26808119; PMCID: PMC4959991.
37. Гаибназарова Д.Т., Тиллаева Г.У., Касимова Д.Б., Тиллаева У.М. Сравнительный анализ методик количественного определения аскорбиновой кислоты в субстанции // *International Academy Journal Web of Scholar.* – 2019. – №11(41). – Vol. 1. – С. 32–36.
38. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* – 3rd ed. – Hoboken: Wiley, 2010. – 912 p.

39. Dong M.W. Modern HPLC for Practicing Scientists. – Hoboken: Wiley-Interscience, 2006. – 288 p.
40. Kazakevich Y., LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. – New York: Wiley, 2007. – 1112 p.
41. Swartz, M.E., & Krull, I.S. (Eds.). (1997). Analytical Method Development and Validation (1st ed.). CRC Press. – 616 p.
<https://doi.org/10.1201/9781315275161>
42. ICH Q2(R2). Validation of Analytical Procedures. International Council for Harmonisation, 2023.
43. Бровченко И.А., Куркин В.А., Правдивцева О.Е. Оптимизация ВЭЖХ-методики количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки // Фармация и фармакология. – 2018. – Т. 6. – №2. – С. 120–128.
44. Бровченко И.А., Куркин В.А. Применение ВЭЖХ-DAD для стандартизации растительного сырья солодки // Фармация. – 2019. – №5. – С. 34–39.
45. Моисеев Д.В., Краснюк И.И., Беляцкая А.В. Разработка ВЭЖХ-методики определения ацикловира // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39. – №7. – С. 43–46.
46. Павлова Л.И., Толстикова Т.Г., Сорокина И.В. Глицирризиновая кислота: биологическая активность и перспективы применения // Химия растительного сырья. – 2018. – №4. – С. 5–20.
47. Snyder L.R. Classification of the solvent properties of common liquids // Journal of Chromatography. – 1974. – Vol. 92. – P. 223–230.
48. Johnson AR, Vitha MF. Chromatographic selectivity triangles. J Chromatogr A. 2011 Jan 28; 1218(4):556-86. doi: 10.1016/j.chroma.2010.09.046. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21067756.
49. Poole C.F. The Essence of Chromatography. – Amsterdam: Elsevier, 2003. – 1012 p.
50. Meyer V.R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. – 5th ed. – Chichester: Wiley, 2010. – 456 p.
51. USP General Chapter <621> Chromatography // USP 47–NF 42. – Rockville, 2024.
52. EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation. – European Medicines Agency, 2023.
53. ICH Q1A(R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Council for Harmonisation, 2003.
54. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В., Успенская Е.В. Аналитическая химия. – М.: Академия, 2014. – 688 с.
55. Stahl E. Thin-Layer Chromatography. – Berlin: Springer, 1969. – 1041 p.

- 56.Cohen JI. Herpesvirus latency. *J Clin Invest.* 2020 Jul 1;130(7):3361-3369. doi: 10.1172/JCI136225. PMID: 32364538; PMCID: PMC7324166.
- 57.Steiner I, Benninger F. Manifestations of Herpes Virus Infections in the Nervous System. *Neurol Clin.* 2018 Nov;36(4):725-738. doi: 10.1016/j.ncl.2018.06.005. PMID: 30366551.
- 58.Gnann JW Jr, Whitley RJ. Clinical practice. Herpes zoster. *N Engl J Med.* 2002 Aug 1;347(5):340-6. doi: 10.1056/NEJMc013211. PMID: 12151472.
- 59.Safrin S, Crumpacker C, Chatis P, Davis R, Hafner R, Rush J, Kessler HA, Landry B, Mills J. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. The AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1991 Aug 22;325(8):551-5. doi: 10.1056/NEJM199108223250805. PMID: 1649971.
- 60.Davey, Mark & Van Montagu, Marc & Inze, Dirk & Sanmartin, Maite & Kanellis, Angelos & Smirnoff, Nicholas & Benzie, Iris & Strain, John & Favell, Derek & Fletcher, John. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80. 825 - 860. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6.
- 61.Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA.* 1999 Apr 21;281(15):1415-23. doi: 10.1001/jama.281.15.1415. PMID: 10217058.
- 62.Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.* 2003 Aug 21; 2:7. doi: 10.1186/1475-2891-2-7. PMID: 14498993; PMCID: PMC201008.
- 63.Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J Pharm.* 2005 Apr 11;293(1-2):101-25. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.12.013. PMID: 15778049.
- 64.Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review. *J Pharm Anal.* 2014 Jun;4(3):159-165. doi: 10.1016/j.jpha.2013.09.003. Epub 2013 Sep 17. PMID: 29403878; PMCID: PMC5761119.
- 65.Ermer J., Miller J.H.M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis.* – Weinheim: Wiley-VCH, 2005. – 403 p.
- 66.Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods--critical review. *J Pharm Biomed Anal.* 2002 Jun 15;28(6):1011-40. doi: 10.1016/s0731-7085(02)00047-x. PMID: 12049968.
- 67.Dong M.W. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists.* – 2nd ed. – Hoboken: Wiley, 2019. – 424 p.
- 68.Poole C.F. *Chromatography Today.* – Amsterdam: Elsevier, 2012. – 702 p.

69. Sherma J., Fried B. Handbook of Thin-Layer Chromatography. – 3rd ed. – New York: Marcel Dekker, 2003. – 998 p.
70. USP General Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures // USP 43–NF 38. – Rockville, 2020.
71. European Medicines Agency. Guideline on analytical method validation. – London: EMA, 2024.
72. The Japanese Pharmacopoeia. – 18th ed. – Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2021.
73. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. – Beijing: China Medical Science Press, 2020.
74. Государственная фармакопея Республики Беларусь. – Минск, 2016. – Т. 2.
75. Sun ZG, Zhao TT, Lu N, Yang YA, Zhu HL. Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(10):826-832. doi: 10.2174/1389557519666190119111125. PMID: 30659537.
76. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008 Feb;37(2):107-21. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00586.x. PMID: 18197856.
77. Gershon, Anne A., Judy Breuer, Jeffrey I. Cohen, Randall J. Cohrs, Michael D. Gershon, Donald H. Gilden, Charles Grose, Sophie Hambleton, Peter G. E. Kennedy, Michael N. Oxman, Jane F. Seward and Koichi Yamanishi. "Varicella zoster virus infection." *Nature Reviews Disease Primers* (2015): n. pag.
78. Douglas RM, Chalker EB, Treacy B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD000980. doi: 10.1002/14651858.CD000980. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2004 Oct 18;(4):CD000980. doi: 10.1002/14651858.CD000980.pub2. PMID: 10796569.
79. Padayatty, Sebastian & Katz, Arie & Wang, Yaohui & Eck, Peter & Kwon, Oran & Lee, Je-Hyuk & Chen, Shenglin & Corpe, Christopher & Dutta, Anand & Dutta, Sudhir & Levine, Mark. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition.* 22. 18-35. doi:10.1080/07315724.2003.10719272.
80. Эпсамет Н. С. Разработка состава и технологии приготовления комбинированного препарата с антивирусной активностью: дис. Магистра медицинских наук: 7М10104-«Фармация». – Астана: НАО «Медицинский университет Астана», 2024.- 80 с.



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ **12199**

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2026/0608.2

(22) 16.03.2026

(45) 08.05.2026

(54) Сироптағы аскорбин қышқылын, ацикловирді және натрий глицирризинатын бірлесіп анықтау тәсілі
Способ совместного определения аскорбиновой кислоты, ацикловира и натрий глицирризината в сиропе
Method for the combined determination of ascorbic acid, acyclovir and sodium glycyrrhizinate in syrup

(73) «ProLabSupport (ПроЛабСаппорт)» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі (KZ);
Товарищество с ограниченной ответственностью «ProLabSupport (ПроЛабСаппорт)» (KZ);
«ProLabSupport (ПроЛабСаппорт)» Limited Liability Partnership (KZ);
Жусупова Махаббат Богумбаевна (KZ);
Zhusupova Mahabbat Bogumbaevna (KZ)

(72) Жусупова Махаббат Богумбаевна (KZ) Zhusupova Mahabbat Bogumbaevna (KZ)
Кадралиева Назгуль Сериковна (KZ) Kadralieva Nazgul Serikovna (KZ)
Адилбеков Ерлан Нурланович (KZ) Adilbekov Yerlan Nurlanovich (KZ)



ЭЦҚ кол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. Ахметов
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE