

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК: 615.7:615.012.1-074

МПК: G01N30/00, A61K36/484

Желубаева Кайнеш Тургуновна

**АНАЛИЗ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА КОРНЯ СОЛОДКИ**

7М10104 – «Фармация»

Диссертационная работа
на соискание степени магистра медицинских наук

Научный руководитель: д.фарм.наук, профессор Арыстанова Танагуль
Акимбаевна

Астана 2024 г

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА КОРНЯ СОЛОДКИ	11
1.2 Современное состояние стандартизации сырья и лекарственных препаратов солодки	19
1.2.1 Сравнительный анализ фармакопейных методов стандартизации лекарственного сырья солодки	19
1.2.2 Стандартизация лекарственных препаратов солодки	23
Экспериментальная часть	26
Глава 2. Характеристика объектов и методов исследования	26
2.1 Материалы исследования	26
2.1.1. Лекарственные вещества	26
2.1.2. Неактивные ингредиенты	28
2.1.3 Реактивы	29
2.2. Методы исследования	32
2.2.1 Химические методы	32
2.2.2 Физические и физико-химические методы	32
Глава 3. Разработка спецификации качества и стандартизация комбинированного лекарственного препарата корня солодки	34
3.1 Разработка методик идентификации активных ингредиентов комбинированного лекарственного препарата химическими и физико- химическими методами	34
3.1.1 Методика идентификации активных ингредиентов с помощью химических реакций	34
3.1.2 Методика идентификации активных ингредиентов и их родственных примесей методом тонкослойной хроматографии	37
3.2 Методика количественного анализа активных ингредиентов методом УФ- спектрофотометрии	45
3.3 Разработка спецификации качества и стандартизация комбинированного лекарственного препарата	54
3.3.1 Спецификации качества комбинированного лекарственного препарата ...	54
3.3.2 Изучение стабильности и установление срока годности.	61
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	64
ПРИЛОЖЕНИЕ А	72

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

- В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
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

HSV – Herpes simplex virus
PhEur – European Pharmacopeia
VZV – Varicella zoster virus
АК – аскорбиновая кислота
АЦ – ацикловир
АНД – аналитический нормативный документ
БАВ – биологически активные добавки
ВАНД – временный аналитический нормативный документ
ВПГ – вирус простого герпеса
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГК – глицирризиновая кислота
ГФ – Государственная Фармакопея
ФЕАЭС – Фармакопея Евразийского экономического союза
ИК-СФ – спектрофотометрия в ИК-области
КЛП – комбинированный лекарственный препарат
МС – масс-спектрометрия
ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром
ПФ – подвижная фаза
РСО – рабочий стандартный образец
СО – стандартный образец
СОВС – стандартный образец вещества-свидетеля
ТКМ – традиционная китайская медицина
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФ-СФ – спектрофотометрия в УФ-области
ЭКС – экстракт корня молодки
ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Таблица 1 Препараты на основе активных компонентов солодки с противовирусным действием	15
Таблица 2 Методы количественного определения ГК по фармакопеям ведущих стран мира	20
Таблица 3 Идентификация ГК в корнях солодки методом тонкослойной хроматографии по фармакопеям ведущих стран мира	21
Таблица 4 Характеристики разрешения и селективности при определении активных ингредиентов в КЛП	40
Таблица 5 Значения коэффициента удерживания с учетом стандартного отклонения	41
Таблица 6 Прецизионность значений R_f , соответствующих ГК на лабораторных образцах КЛП	41
Таблица 7 Прецизионность значений R_f , соответствующих АК на лабораторных образцах КЛП	42
Таблица 8 Прецизионность значений R_f , соответствующих АЦ на лабораторных образцах КЛП	44
Таблица 9 Статистическая обработка результатов хроматографирования лабораторных образцов КЛП	45
Таблица 10 Значения для оценка линейной зависимости методики	50
Таблица 11 Значения для оценка правильности методики на модельной смеси	51
Таблица 12 Значения для оценка прецизионности методики на модельной смеси	52
Таблица 13 Оценка прецизионности методики количественного определения действующих веществ в пяти сериях лекарственного препарата	52
Таблица 14 Оценка правильности методики количественного определения действующих веществ в пяти сериях лекарственного препарата	53
Таблица 15 Спецификация качества КЛП	60
Таблица 16 Значения показателей качества КЛП в процессе хранения в процессе методики «ускоренное хранение»	61
Рисунок 1 А - Солодка голая, В – сухой экстракт корня солодки	12
Рисунок 2 Частота связывания ЛРС со спайковым S-белком SARS-CoV-2	13
Рисунок 3 Структурная формула глицирризиновой кислоты	14
Рисунок 4 Хроматограмма испытуемого раствора и растворов сравнения	39
Рисунок 5 Вероятностный график распределения значений R_f ГК, АК и АЦ	43
Рисунок 6 УФ-спектры испытуемого раствора лекарственного	46

препарата в виде диспергируемой таблетки (2) и РСО глицирама (1)

Рисунок 7 УФ- спектры поглощения РСО АК (1) и испытуемого 48
раствора (2) в соляной кислоте

Рисунок 8 УФ- спектры поглощения РСО АЦ (1) и испытуемого 49
раствора (2) в соляной кислоте

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В человеческой популяции вирусы являются причиной большого количества заболеваний, включая ряд болезней с крайне высокой летальностью, а также высоким эпидемическим потенциалом.

Противовирусные препараты воздействуют на всех этапах жизненного периода вирусов, от прикрепления вируса к клетке хозяина до полной репликации и удаления из клетки. Многие противовирусные препараты проявляют свой эффект путем блокирования работы некоторых ферментных и белковых систем в организме человека.

В настоящее время широкое применение для лечения вирусных инфекций находит ряд препаратов растительного происхождения, сочетающих клиническую эффективность с минимальной выраженностью нежелательных лекарственных реакций. Комбинация растительных препаратов с синтетическими субстанциями дает огромный шаг в лечении вирусной инфекции, а также нивелирует токсическое влияние на организм человека за счет снижения дозировки химической субстанции.

Одним из важных лекарственных растительных препаратов является Экстракт корня солодки (ЭКС). В китайской и индийской медицине с глубокой древности ЭКС ценится очень высоко. Подобно женьшеню, ЭКС – это средство, повышающее сопротивляемость организма, общеукрепляющее, способствует улучшению качества жизни и ее продлению. Широко используется в противовирусной терапии, как многофункциональное лекарственное средство. В советское время наша страна, наряду с другими странами Центральной Азии, входила в число ресурсных стран по добыче корня солодки.

В период пандемии коронавирусной инфекции ЭКС показал свою высокую эффективность в лечении вирусной инфекции и стимулировании иммунитета. Глицирризиновая кислота (ГК), входящая в состав корня солодки, в комплексной терапии оказала специфичное лечение благодаря фармакологическому механизму, заключающемуся в блокировании вирусного фермента киназы. Помимо собственной противовирусной активности, ГК потенцирует фармакологический эффект и снижает токсичность синтетических препаратов. Уникальные свойства основного компонента корня солодки использованы при создании ряда комбинированных лекарственных средств – фармацевтических композиций, обладающих противовирусной, иммуномодулирующей, гепатопротекторной активностью.

Противовирусная фармакотерапия как правило требует комплексного подхода. Аскорбиновая кислота (АК) является высокоэффективным лекарственным препаратом в комбинированном лечении вирусной инфекции за счет антиоксидантных, иммуномодулирующих свойств. Витамин С восстанавливает убихинон и витамин Е, стимулирует синтез интерферона.

Среди современных противовирусных препаратов ацикловир (АЦ) особенно востребован. АЦ как вирустатический препарат высокоселективно ингибирует HSV и VZV ДНК-полимеразы, обладает высокой специфичностью

в отношении вируса Herpes simplex (HSV), включая HSV тип 1 и HSV тип 2, вируса Varicella zoster (VZV), вируса Эпштейна-Барр.

Вместе с тем АЦ проявляет ряд побочных эффектов:

- почечная недостаточность. Необходимо соблюдать осторожность при назначении АЦ пациентам с почечной недостаточностью (84% препарата выводится почками в неизменном виде, поэтому при патологии почек есть необходимость снижения дозы до 400 мг в сутки, что снижает эффект противовирусной терапии);

- резистентность к ациклическим нуклеозидам (АЦ, валацикловир и др). При циклическом приеме данных препаратов у вируса вырабатывается устойчивость к ингибированию кодирующих белков ДНК-полимеразы, нарушается фосфорилирование АЦ;

- необходимость в иммуностимуляторах (вирус герпеса циркулирует в организме человека всю жизнь с момента первичного заражения, поэтому важно помимо специфичной противовирусной терапии использовать и иммуномодулирующую, что часто упускается при приеме самого АЦ).

Теоретически основываясь на фармакологических свойствах ГК, АК и АЦ, комбинация этих лекарственных средств может давать синергетические, аддитивные эффекты.

Комбинация природного адаптогена ГК, обладающего собственной противовирусной активностью с витамином С и АЦ усилит противовирусную, иммуномодулирующую активность последних, а также снизит побочные эффекты АЦ.

На кафедре фармацевтических дисциплин МУА разработан состав комбинированного лекарственного препарата (КЛП), содержащий глицирризинат аммония (глицирам), АК и АЦ.

Цель исследования: разработать спецификации качества и стандартизовать комбинированный лекарственный препарат, содержащий глицирам, аскорбиновую кислоту и ацикловир.

Задачи исследования:

1. Разработать методики идентификации глицирама, АК и АЦ в КЛП.
2. Разработать методику идентификации активных ингредиентов и их родственных примесей методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).
3. Разработать методику количественного анализа глицирам, АК и АЦ методом УФ-спектрофотометрии.
4. Провести валидацию разработанных методик.
5. Разработать спецификации качества и стандартизовать КЛП.

Объект и предмет исследования:

Объектом исследования является комбинированный лекарственный препарат в виде диспергируемых таблеток, содержащий глицирам, АК и АЦ.

Научная новизна:

Впервые были разработаны спецификации качества, методики идентификации и количественного определения активных компонентов комбинированного лекарственного препарата в виде диспергируемых таблеток, содержащий глицирам, АК и АЦ с помощью химических и физико-химических методов, будет проведена валидация методик.

Практическая значимость.

Разработанные спецификации качества, методики анализа комбинированного лекарственного препарата в виде диспергируемых таблеток, содержащий глицирам, АК и АЦ, химическими и физико-химическими методами будут рекомендованы для включения в проект нормативно-технического документа на препарат (ВАНД).

База проведения исследования.

Кафедра фармацевтических дисциплин НАО “Медицинский университет Астана”

Положения, выносимые на защиту:

- Методики идентификации активных ингредиентов химическими реакциями в комбинированной лекарственной композиции в форме диспергируемых таблеток.

- Методики идентификации активных ингредиентов и их родственных примесей методом тонкослойной хроматографии.

- Методики количественного определения активных ингредиентов методом УФ-спектрофотометрии при их совместном присутствии.

- Спецификация качества КЛП.

Объем и структура диссертации:

Полный объем диссертации составляет 75 страниц, в том числе 16 таблиц и 8 рисунков. Список литературы содержит 98 наименований. Описание представляемого исследования включает введение, 3 главы, заключение, список цитируемой литературы и приложение. Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечена новизна и практическая значимость проведенных исследований, а также изложены основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы о лекарственных препаратах на основе компонентов корня солодки. В разделе 1.1 представлены литературные данные использования компонентов корня солодки в создании лекарственных средств для профилактики и лечения иммунодефицитного состояния при вирусных инфекциях. В разделе 1.2 обобщены литературные данные о современном состоянии стандартизации сырья и лекарственных препаратов солодки.

В главе 2 представлена характеристика объектов и методов исследования. Описаны аналитические методики химического и физико-химического исследования индивидуальных веществ и КЛП.

В главе 3 экспериментальной части приводятся результаты настоящих исследований по разработке методик идентификации химическими и физико-химическими методами активных ингредиентов, количественного определения,

разработке спецификации качества и стандартизации КЛП в виде диспергируемых таблеток по данным, полученным в следствие собственных экспериментов.

В заключении представлены сформулированные основные результаты проведенных исследований.

В приложение включены материалы по разработке проекта нормативной документации.

Статистически обработанные итоговые результаты исследований представлены в тексте диссертации в виде рисунков, таблиц и соответствующих формул.

Апробация диссертации:

Обзорные и экспериментальные статьи опубликованы в материалах конференции III Международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», 26-27 октября 2023 года, НАО «МУА», Астана, IV Международной научно-практической конференция «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики», Кемеровский государственный медицинский университет министерства здравоохранения российской федерации 24 мая 2024 года, г. Кемерово, РФ.

Основные положения работы обсуждены и опубликованы в сборниках материалов:

- Bukovinian state medical university, Abstract book of the Bukovinian International Medical Congress 2022-2023, Ukraine, Chernivtsi;

- сборник материалов международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и молодежь: открытия и перспективы», 2023, НАО «МУА», Астана;

- материалы III Международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», 26-27 октября 2023 года, НАО «МУА», Астана;

- материалы международной научно-практической конференции «Врач. Лекарство. Пациент.», 30-31 марта 2023 года, РФ, Татарстан, г. Казань - Казанская государственная медицинская академия;

- материалы XVIII научно-практической конференции молодых ученых и студентов ГОУ ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Наука и инновации в медицине – 2023» с международным участием;

- Казахстанский журнал медицины и фармации, X международная научная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» 7-8 декабря 2023 года;

- материалы IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики», Кемеровский государственный медицинский университет министерства здравоохранения российской федерации 24 мая 2024 года, г. Кемерово, РФ.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА КОРНЯ СОЛОДКИ

Разработка эффективных средств терапии вирусных заболеваний, в том числе коронавирусной инфекции, остается одной из важнейших задач медицинской химии и фармации [1]. Современная ситуация с распространением социально опасного вируса из рода Coronavirus (SARS-CoV-2) требует создания новых противовирусных препаратов, поскольку специфические противовирусные средства для лечения или профилактики этого заболевания пока не найдены [2-5].

В развитии патологического процесса, вызванного коронавирусами, можно выделить две ранние и поздние стадии. На ранней стадии, когда вирус накапливается, назначают средства, блокирующие размножение коронавирусов. Химиотерапевтические подходы на этом этапе направлены на различные мишени репликации коронавирусов и включают ингибиторы вирусной РНК-полимеразы, ингибиторы вирусной протеазы, ингибиторы протеолитической активации вирусного белка S, попадающего в клетку-мишень, ингибиторы вирусной протеазы, депротенинизация в эндосомах клеток, а также препараты экзогенного интерферона, препараты природных и рекомбинантных вируснейтрализующих антител, а также комбинации вышеуказанных препаратов. На втором этапе, патогенетическом, когда размножение вируса падает и начинают доминировать угрожающие патологические процессы: избыточное воспаление, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), отек легочной ткани, гипоксия, угроза сепсиса, рекомендуется применять экстракорпоральную оксигенацию крови и назначают дезинтоксикационные, противовоспалительные и антибактериальные лечебные средства [2]. Поэтому для предотвращения развития тяжелых патогенетических последствий COVID-19 необходимо купировать заболевание на первой, ранней стадии. Следовательно, исследования по созданию новых противовирусных препаратов столь актуальны.

Доступные в настоящее время в арсенале фармакотерапии противовирусные препараты представляют собой соединения природного или синтетического происхождения, действие которых направлено либо на стимуляцию иммунной системы, либо на нарушение различных стадий развития вирусной инфекции или жизненного цикла вирусов, процесса адсорбции вируса на клеточной мембране, проникновения в цитоплазму клетки, внутриклеточного синтеза вирусных компонентов, сборки вирусов, выхода дочерних вирионов из клетки-хозяина [3]. На основе химических соединений растительного происхождения синтезируются различные современные

лекарственные средства. Многолетний опыт применения лекарственных растений в народной медицине, химическое разнообразие их компонентов, доступность, а главное, натуральность делают растительные компоненты приоритетным направлением современных производственных и фармакотерапевтических методик [4].

Среди лекарственных растений, издавна используемых человеком, широко распространенных и имеющих богатую документированную фармакотерапевтическую историю, следует отметить солодку (*Glycyrriza glabra* L.) [5] (Рис. 1). Солодка имеет долгую историю в традиционной китайской медицине (ТКМ), особенно в отношении ее противовирусных и антибактериальных эффектов [6]. В медицине чаще всего используются корни солодки, как указано на Рис. 1.



Рисунок 1 А - Солодка голая, В – сухой экстракт корня солодки

ТКМ сыграла решающую роль в лечении острой респираторной вирусной инфекции, гриппа и других острых респираторных инфекционных заболеваний [7]. Клинические данные показали хороший терапевтический эффект ТКМ при лечении коронавирусных инфекций, вызванных атипичной пневмонией, а из-за сходства геномики и клинических особенностей COVID-19 2019 г. и SARS-CoV 2003 г. традиционная китайская медицина широко используется в терапии COVID-19. Более 85% пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 в период пандемии 2019 г. в Китае, получили лечение ТКМ [8]. Лечение ТКМ пациентов с SARS-CoV-2 в контролируемом клиническом исследовании показало значительное улучшение симптомов и сокращение течения заболевания [7]. Лабораторные исследования подтвердили положительный клинический эффект ТКМ, в частности использование ЭКС значительно снижало репликацию вируса атипичной пневмонии, выделенного от пациентов [9,10].

В исследованиях Yuying Zhu и др. [11] на моделях виртуального скрининга была исследована молекулярная стыковка со спайковым S-белком SARS-CoV-2 (основной домен прикрепления вируса к мембране клетки организма) на более 30 лекарственных растительных средств (ЛРС),

применяемых для лечения вирусных инфекций в Китае. Среди положительных кандидатов солодка (*Gl.uralensis* Fisher) в соответствии Рис. 2 заняла первое место по частоте связывания с данным белком и последующим блокированием репликации вируса.

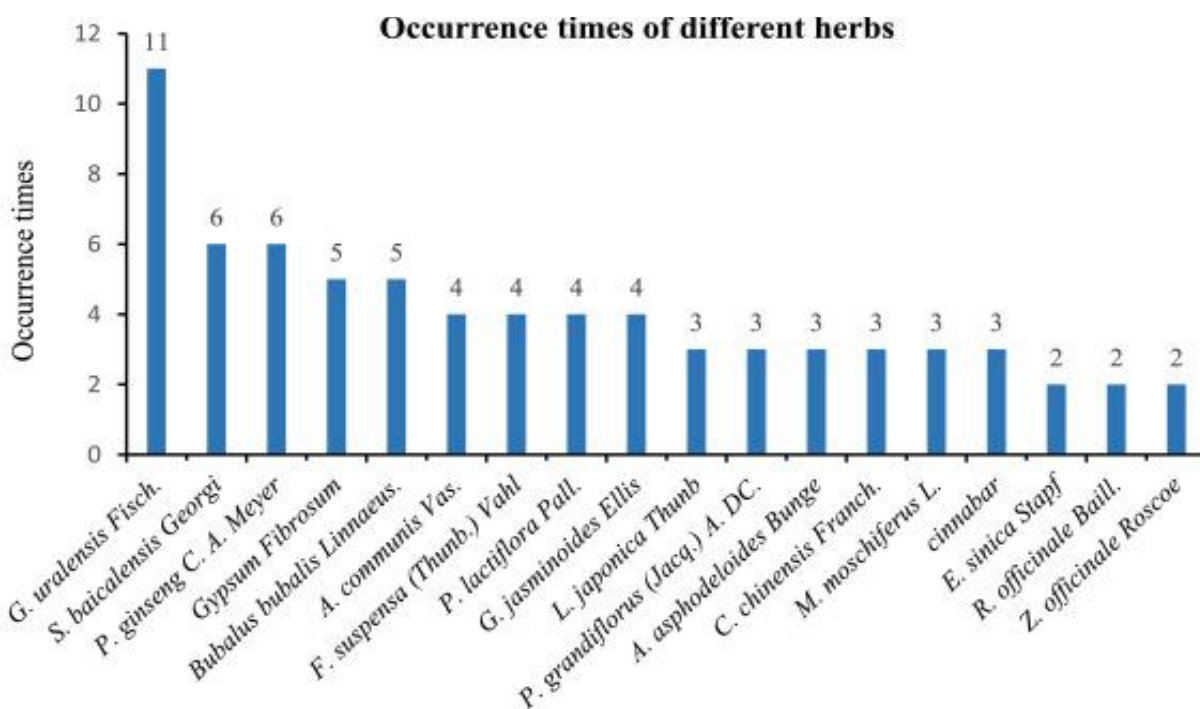


Рисунок 2 Частота связывания ЛРС со спайковым S-белком SARS-CoV-2

Основным фармакологическим компонентом корней солодки голой (*Glycyrriza glabra* L.) и уральской (*Gl.uralensis* Fisher) является глицирризиновая кислота (ГК) – соединение, состоящее из агликона, представленного тритерпеновым производным ГК и дисахаридного фрагмента (2 молекулы глюконовой кислоты) как указано на Рис. 3. Уникальность ГК заключается в ее строении, благодаря которому она обладает комплексом биологической активности, в том числе собственной противовирусной и иммуномодулирующей активностью [12,13].

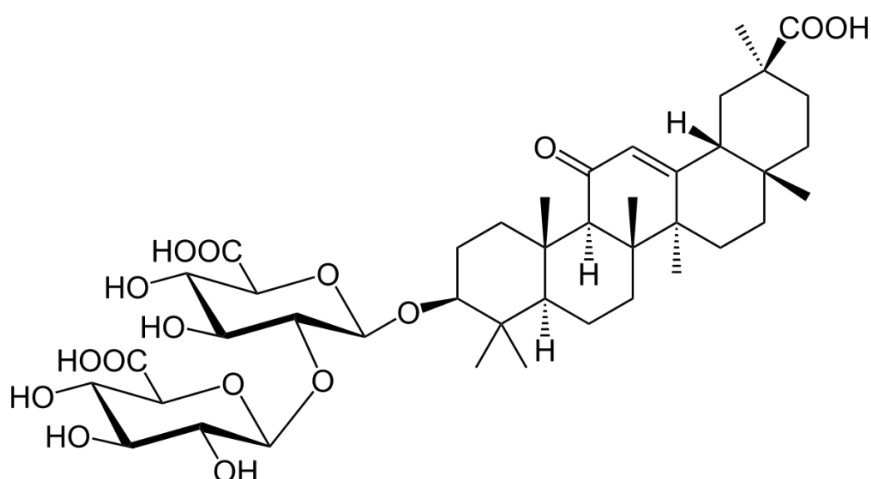


Рисунок 3 Структурная формула глицирризиновой кислоты

Обычно солодка содержит более 20 тритерпеноидов и около 300 флавоноидов. Помимо производных гликозидов, солодка содержит несколько других минорных тритерпеновых агликонов (ликёритигенин, ликохалкон А, ликохалкон Е и глабридин, которые вместе с ГК обозначаются термином «глицирризин»). Таким образом, глицирризин не является химически чистым соединением, а представляет собой смесь родственных веществ, основным активным компонентом которой является ГК [14].

ГК давно и широко изучена. В результате этих исследований выявлены следующие эффекты ГК: антигемолимфокоагулянтный, лимфостимулирующий, противовоспалительный, анальгезирующий, противоаллергический, гиполипидемический, антитоксический, гепатопротекторный, противомикробный, противоопухолевый и, что особенно важно в современный период, противовирусный, антиоксидантный и иммуноотропный [4,15].

Официальные публикации о противовирусной активности ГК появились более 30 лет назад, а публикации об активности ГК против SARS-ассоциированного коронавируса – более 20 лет назад. Основной противовирусный эффект ГК и его производных обусловлен нарушениями репродуктивного цикла вируса. ГК применяют для лечения хронических вирусных гепатитов В и С в Китае, Японии и др. странах, ее производные применяют против вирусов герпеса, альфа- и флавивирусов, вируса иммунодефицита человека, вакцинного вируса, полиовируса I типа, вируса папилломы, вируса везикулярного стоматита, вируса Эпштейна-Барра, SARS-ассоциированные коронавирусы, вызывающие SARS и вирус гриппа А/Н1N1 [4,16].

Поскольку ГК обладает иммуноотропной способностью, долгое время считалось, что вещество оказывает противовирусное действие, потенцируя продукцию интерферона γ *in vitro* и *in vivo* и стимулируя секрецию интерлейкина-2, индуцируя продукцию интерферона периферическими лимфоцитами [4]. В своих исследованиях *in vivo* Utsunomiya и др. [17] доказали, что снижение титра вирусов у животных при применении ГК происходит за счет инициации их противовирусной активности, т.е. за счет активации Т-клеток и выработки ими интерферона α и γ [18,19]. ГК может способствовать пролиферации Т-клеток и обладает Th1 иммунологической адьювантной активностью, тем самым повышая устойчивость иммунной системы к SARS-CoV-2 на ранней стадии [20].

Рассматривая противовирусные механизмы ГК, следует также отметить его антиоксидантное действие. В результате исследований А.И. Файрушина, Л.А. Балтиной и др. было показано, что ГК предотвращает индукцию окислительного стресса при гриппе А, а как антиоксидант ингибирует репликацию вируса и экспрессию вызываемых вирусом провоспалительных генов [20].

Также исследования показали, что ГК проявляет антиоксидантную активность на модели перекисного окисления липидов в печени мышей. ГК, взаимодействуя, в частности, с синглетным O₂, является ловушкой для свободных радикалов и, взаимодействуя с дыхательной цепью митохондрий печени, генерирует перекись водорода, которая, в свою очередь, окисляет критические тиоловые группы и эндогенные пиримидиновые нуклеотиды [25].

В качестве спасательной терапии для улучшения течения ОРДС, вызванного COVID-19, использовалась ингаляционная терапия оксидом азота (NO) [21]. NO может подавлять репликацию коронавируса и уменьшать повреждение легких, опосредованное воспалительными клетками, а также эффективно и избирательно расслабляет легочные кровеносные сосуды. Эти эффекты NO могут еще больше снизить легочное сосудистое сопротивление, уменьшить отек альвеолярной полости и в конечном итоге облегчить ОРДС [22]. ГК может стимулировать и усиливать выработку NO макрофагами через повышение экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы [23].

Противовирусная активность ГК подтверждена работами по функциональному дизайну его производных. В результате таких исследований получены эфиры с d-аминокислотами, никотинаты, 4-метоксициннамат 18α-глицирризиновой кислоты, сочетание глицирризиновой кислоты с дипептид-глутамил-триптофаном (препарат Орвилакс), конъюгируют тритерпеновые кислоты с аминосохарарами и моногликозидами, саперризные амиды. Вышеуказанные модифицированные производные считаются перспективными природными соединениями с противовирусным действием, на основе которых могут быть созданы противовирусные препараты [25,26,27,28].

Перспективным направлением является создание комбинированных лекарственных препаратов на основе сочетания производных ГК с препаратами различных фармакологических групп. Оптимальная комбинация природных и синтетических лекарственных препаратов обеспечит синергизм и многонаправленность фармакологического действия и снижение побочных реакций последних.

ГК усиливает (взаимно) эффект других противовирусных препаратов. При одновременном применении ГК и других противовирусных препаратов (ацикловира, йодоуридина, интерферона) отмечается потенцирование противовирусного действия [29].

В настоящее время в арсенал противовирусных препаратов, содержащих компоненты солодки, входят препараты, представленные в Таблице 1.

Таблица 1 Препараты на основе активных компонентов солодки с противовирусным действием

Лекарство		Состав	Лекарственная форма	Страна производитель
SNMC		0,2% глицирризин, 0,1% цистеин, 2,0%	Раствор	Япония

		глицин.		
Эпиген		0,1% активированная глицирризиновая кислота	Гель, спрей, суппозитории	Испания
Ниглизин		Пентоникотинат глицирризиновой кислоты	Таблетки	Россия
Глицирам		Моноаммониевая соль глицирризиновой кислоты	Таблетки, капсулы, суппозитории	Россия
Фосфоглив		глицирризиновая кислота и фосфолипиды	Капсулы, таблетки	Россия
Лакринат		Порошок корня солодки	Таблетки	Россия
Виусид		Глицирризиновая кислота, глюкозамин, яблочная кислота, микроэлементы.	Порошок для внутреннего применения	Испания
Карбенексолон натрия		Динатриевая соль сукцината ГК	Таблетки, капсулы	Великобритания
Герпиген		Активированная глицирризиновая кислота	Крем, спрей	Испания
Глэсол		сухой экстракт солодки, глауцина гидрохлорид и эстифан	Гранулы	Россия
Рувимин		биосластилин	Таблетки	Казахстан
Глиаспин		гидеринин (18-дегидроглицирретовая кислота 18-ДГЛК), акорбиновая кислота, ацетилсалициловая кислота	Капсулы	Казахстан
Биорем		ремантадин, глицирризиновая кислота, аскорбиновая кислота	Капсулы	Казахстан
Лакримант		18-дегидроглицирретовой кислоты и ремантадина	Мазь	Казахстан
Вирустат		биосластилин, цинка сульфат, глицин, витамины С, В ₆ , В ₁₂ , фолиевую кислоту, кальция пантотенат	Сироп	Казахстан
Вирустат Е		биосластилин, цинка сульфат, глицин, витамины С, В ₆ , В ₁₂ , Е фолиевую кислоту, кальция пантотенат	Капсулы	Казахстан

Препарат SNMC, уникальная композиция из глицирризина, цистеина, глицина, созданная учеными Японии, применяется внутривенно для лечения вирусных гепатитов В и С, цирроза печени [30-33]. Резистентные к интерферону формы вирусного гепатита С [34-38] и параллельные инфицирования вирусами гепатита С и ВИЧ [6] эффективно лечатся комплексным подходом, сочетая препарат SNMC с интерфероном.

Лекарственный препарат «Эпиген» для местного применения в виде спрея по 125 мл и 0,1 % мази, применяется для местного лечения различных форм вирусных инфекций (HSV-1, HSV-2, VZV). Основным действующим веществом препарата является ГК, активированная в составе Эпигена физико-химическими методами [39].

Ниглизин – пента-О-никотинат глицирризиновой кислоты, 3-(β-D-2,3,4-три-о-никотинилглюкуронпиранозил)12(α-D3,4-ди-О-никотинилглюкуронпиранозил) глицирретовой кислоты. Ниглизин в комбинации с другими лекарствами предлагается использовать как основной препарат для лечения ВИЧ-инфекции [40]. Особый интерес к этому препарату вызван тем, что он является индуктором интерферона гамма. Благодаря этому свойству, отсутствующему у других известных анти-ВИЧ препаратов, терапевтический потенциал лекарственных комбинаций, включающих ниглизин, повышается. Кроме того, Толстиков и др. обнаружили, что ниглизин и другие производные глицирризиновой кислоты обладают высокой активностью в качестве ингибиторов опасных вирусов Марбург и Эбола [41].

Глицирам представляет собой моноаммонийную соль глицирризиновой кислоты, получаемой из густого экстракта солодкового корня или корней и корневищ солодки голой - *Glycyrrhiza glabra* L. и солодки уральской - *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Глицирам обладает противовоспалительными свойствами, стимулирует функцию коры надпочечников, оказывает умеренное отхаркивающее действие [42].

Фосфоглив - комбинированное средство на основе фосфолипидов (основной компонент фосфатидилхолин) и натрия глицирризината. Оказывает мембраностабилизирующее, гепатопротекторное и противовирусное действие [43].

Также в России из солодкового корня выпускаются густой и сухой экстракт, грудной элекси́р, сироп, препараты ликвиритон, флакарбин [44].

Препарат Виусид ("Catalysis S.L.", Испания) создан с помощью новой оригинальной технологии и представляет собой активированный ортомолекулярный комплекс, состоящий из безопасных природных веществ, аминокислот и витаминов. Виусид оказывают ярко выраженное иммуномодулирующее, противовоспалительное, антиоксидантное и антиаллергическое действие и с успехом применяется при лечении целого ряда вирусных и бактериальных инфекций в особенности при ослаблении организма и сниженном иммунитете [45].

"Герпиген" представляет собой спрей содержащий глицирризиновую, яблочную, аскорбиновую кислоты и микроэлементы и применяется для местной терапии и санации половых органов [46].

Комбинированный фитопрепарат «Глэсол» представляет собой гранулы, содержащие сухой экстракт солодки, глауцина гидрохлорид и эстифан [47].

Препараты «Каскарутол» и препарат «Солодка» при совместном применении обладают широким спектром иммуномодулирующей активности и могут быть использованы для коррекции вторичных иммунодефицитов, вызванных противоопухолевыми препаратами [48].

В Казахстане выпускается густой (8-9% глицирризина), сухой (12-14% глицирризина) экстракты [49] и сироп солодкового корня (<http://www.ndda.kz>) [50].

Получен очищенный сухой экстракт под условным названием биосластин с высоким содержанием глицирризина 80%, зарегистрирован в Казахстане как гепатопротекторное, иммуномодулирующее, антиоксидантное средство (рег. уд. РК-ЛС-3-№004554) [51].

Противовоспалительные лекарственные препараты отечественной разработки таблетки «Гликардин», проявляющие высокую противовоспалительную и противоревматическую активность [52], «Глиаспин», содержащее в качестве действующих веществ глидеринин (18-дегидроглицирретовая кислота 18-ДГЛК), аскорбиновую кислоту и ацетилсалициловую кислоту [53].

Комплекс ГК с ремантадином, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и В с низкой токсичностью [54], противовирусный комплекс 18-дегидроглицирретовой кислоты с ремантадином в отношении вирусов гриппа типа А и В [55], фармацевтическая композиция в виде капсул «Биорем», которая содержит три активных ингредиента – ремантадин, глицирризиновую кислоту и антиоксидант – аскорбиновую кислоту, обладающая противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А и В [56] композиция в виде мази под условным названием «Лакримант» – комплексное соединение 18-дегидроглицирретовой кислоты и ремантадина [57].

Созданы комбинированные лекарственные препараты в виде сиропа для детей «Вирустат» и капсул для взрослых «Вирустат Е», которые содержат одновременно несколько активных ингредиентов - антивирусный компонент биосластин, микроэлемент цинка сульфат, аминокислоту глицин, витамины: С, В₆, В₁₂, фолиевую кислоту, кальция пантотенат, обуславливающие наличие противовирусной, иммунокорректирующей, антиоксидантной активности. В отличие от сиропа капсулы содержат дополнительно витамин Е. Препараты могут успешно применяться для лечения иммунной недостаточности при ВИЧ, коронавирусной и др. вирусных инфекциях [58].

1.2 Современное состояние стандартизации сырья и лекарственных препаратов солодки

Солодка содержит целый ряд комплексов биологически активных веществ (БАВ), а также сотни индивидуальных природных соединений, отнесенных к различным химическим классам веществ с разнообразными фармакотерапевтическими свойствами. В корнях и корневищах солодки содержатся такие группы биологически активных веществ, как сапонины (глицирризин в виде калиевых и кальциевых солей глицирризиновой кислоты), флавоноиды, халконы (изоликвиритигенин, изоликвиритин, ликуразид и др.) [4,59-62]. Особую ценность среди компонентов солодки представляют глицирризиновая кислота (ГК) и ее производные, которые обладают широким спектром действия: противовоспалительным, иммуномодулирующим, гепатопротекторным, антиоксидантным, антитоксическим и др. [59,62,63]. Поэтому методики контроля качества основаны на анализе ГК в составе препаратов солодки.

Глицирризиновая кислота (20 β -карбокси-11-оксо-30-норолеан-12-ен-3 β -ил-2-О- β -D-глюкопирануронозил- α -D-глюкопиранозидуриновая кислота) – основной фармакологически активный компонент корня солодки, содержание которого может достигать 25% от массы сухого материала. Общее содержание экстрактивных веществ может достигать 40% [63]. Температура плавления (Т пл.) – ГК (220°C). УФ-спектр ГК показывает, что максимальный пик ее поглощения находится в области 254 нм [49,64-66]. Агликоном ГК является одноосновная β – глицирретиновая (глицирретовая) кислота с характерной для нее кетогруппой, которая находится в 11 положении. Ее сахаристая часть представляет собой 2 молекулы глюкуроновой кислоты. Кроме β -формы в корнях солодки голый присутствуют следы α -формы глицирретиновой кислоты, однако она не обладает фармакологической активностью [67].

ГК в корнях солодки находится в виде смешанных калиево-кальциево-магниевых солей, а также образует органические соли с металлами и аммонием. Самая распространенная ее соль: глицирризинат аммония – глицирам [42]. Соли щелочных металлов растворимы в воде, а соли тяжелых металлов нерастворимы и легко разлагаются сероводородом с образованием свободной ГК и это свойство используется часто при очистке ГК [68].

1.2.1 Сравнительный анализ фармакопейных методов стандартизации лекарственного сырья солодки.

Качество корня солодки регламентируется ведущими фармакопеями мира, которые включают в себя солодку обыкновенную (*G. glabra*) и солодку уральскую *G. uralensis* [50,67-74].

Для оценки соответствия действующей нормативной документации на корни солодки современным требованиям сравнили отечественную монографию «Солодки корни» и доступную зарубежную нормативную документацию, регламентирующую качество корней солодки. Были

проанализированы фармакопейные статьи на корни солодки, входящие в Европейскую Фармакопею 9.0 [69], Китайскую Государственную Фармакопею 2005 и 2010 [70], Американскую Фармакопею [71], Государственную Фармакопею Японии XVII [72], Государственную Фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) XIV (Россия) 2018 г [67], Государственную Фармакопею Республики Беларусь 1 и 2 издания [68], Британскую фармакопею [73]. Кроме корней солодки голой и солодки уральской, в ряде стран допускается также заготовка корней солодки вздутой (*Glycyrrhiza inflata* Vat.).

Как указано в таблице 2, процентное содержание ГК в корне солодке варьируется от 2,0% (Фармакопея Китай) до 6,0% (ГФ СССР X, ныне ГФ РФ XIV). Такое низкое содержание в фармакопее КНР можно пояснить наличием солодки вздутой, а также тем, что китайские виды *G. uralensis* и *G. glabra* содержат ГК 2,1-6,1% [70]. Фармакопеи USP (США) [71] и Японии [72] разрешают, также как ГФ РФ - только солодку голую и солодку уральскую, при этом в ГФ РФ нормируемое содержание ГК 6% спектрофотометрия в УФ-области (СФ в УФ- области) на аналогичные виды солодки, что на 40% выше, чем в других странах. Фармакопеи Республик Казахстан и Беларусь [50,68] гармонизированы с Европейской Фармакопеей [69] и предел содержания ГК установлен на уровне 4% методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Помимо солодки голой (*G. glabra*) и солодки уральской (*G. uralensis*), государственные фармакопеи ЕС [69], Казахстана [50], Китая [70] и Великобритании [73] включают в себя солодку вздутую (*Glycyrrhiza inflata* Vat.)

Фармакопея Великобритании, кроме указанных в таблице 1 видов солодки, также содержит отдельные монографии на аммониевую соль ГК (*Ammonium Glycyrrhizinate*), сухой экстракт солодки с содержанием ГК от 5% до 7% (*Liquorice Dry Extract for Flavouring Purposes*), жидкий экстракт солодки (*Liquorice Liquid Extract*), корень используемый в традиционной китайской медицине (ТКМ) (*Liquorice Root for use in TCM*), обработанный корень солодки для использования в ТКМ 2% и стандартизированный жидкий спиртовой экстракт 3-5% (*Standardised Liquorice Ethanolic Liquid Extract*)

Все перечисленные фармакопеи при определении количественного содержания ГК используют метод ВЭЖХ; только ГФ РФ XIV [67], рекомендует использовать метод СФ в УФ-области.

Основные условия методов хроматографирования, указанные в фармакопеях Европейского Союза, США, Китая и Японии свидетельствуют, что длина волны, при которой определяется ГК составляет 254 нм; 250 нм – Китай; 258 нм – РФ методом СФ в УФ-области.

Таблица 2 Методы количественного определения ГК по фармакопеям ведущих стран мира

	ГФ РФ XIV (Россия). 2018 г	ГФ РК, 2 том (Казахстан) 2008 г.	Европейская Фармакопея ЕС EP 8.0 2014 г.	Фармакопея КНР	Фармакопея США USP 38 2015 г.	Фармакопея Япония XV 2007 г.	Фармакопея Великобритании
Виды солодки	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis F., Glycyrrhiza inflata Bat.	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis F., Glycyrrhiza inflata Bat.	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis F., Glycyrrhiza inflata Bat.	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis	Glycyrrhiza glabra L., Glycyrrhiza uralensis F., Glycyrrhiza inflata Bat.
Метод контроля	СФ в УФ области	ВЭЖХ	ВЭЖХ	ВЭЖХ	ВЭЖХ	ВЭЖХ	ВЭЖХ
Концентрация глицирризиновой кислоты, %	не менее 6%	не менее 4%	не менее 4%	не менее 2%	не менее 2,5%	не менее 2,5%	не менее 4%
Длина волны	258 нм	254 нм	254 нм	250 нм	254 нм	254 нм	254 нм

Для определения подлинности ГК в образцах солодки обыкновенной (*G. glabra*) и солодки уральской *G. uralensis* согласно приведенным в таблице 3 фармакопейным методикам используют метод ТСХ.

Как показал сравнительный анализ фармакопейных методик идентификации ГК и определения посторонних примесей методом ТСХ, хроматографирование проводится в системах полярных растворителей нейтрального и основного характера [67-73]. В качестве детектирующего устройства используют УФ-спектр, позволяющий идентифицировать с высокой чувствительностью как активные компоненты, так и их примеси. В качестве раствора сравнения используют кислоту глицирретинтовую и тимол [50]. Зоны проявляются в УФ-свете в виде соответствующих фиолетовых пятен кислоты глицирретовой, красных пятен тимолла и желтых пятен примеси изоликвиридингена. Допускается при этом присутствие других зон [50, 67-73]. Значение R_f для ГК в пределах $0,3 \pm 0,02$ [49].

Таблица 3 Идентификация ГК в корнях солодки методом тонкослойной хроматографии по фармакопеям ведущих стран мира

Фармакопея	Метод идентификации	Система растворителей	Детектирование
ГФ РФ XIV 2018 г.	ТСХ водно-этанольного извлечения на силикагеле F 254	н-бутанол-ледяная уксусная кислота – вода (7:1:2)	При длине волны 254 нм
Фармакопея ЕС EP 8.0	ТСХ эфирного извлечения из водного гидролизата на силикагеле F 254	аммиака р-р, вода, этанол 96%, этилацетат (1:9:25:65)	После обработки р-ром анисового альдегида при 254 нм.
Фармакопея США USP 38	ТСХ водно-этанольного извлечения. на силикагеле F 254	н-бутанол-ледяная уксусная кислота – вода (7:1:2)	При длине волны 254 нм
Фармакопея Великобритании BP	ТСХ эфирного извлечения из водного гидролизата на силикагеле F 254	Ледяная уксусная кислота, безводная муравьиная кислота, вода, этилацетат (1:1:2:15)	После обработки р-ром анисового альдегида при 254 нм.
Фармакопея Японии XV	ТСХ водно-этанольного извлечения. на силикагеле F 254	н-бутанол-ледяная уксусная кислота – вода (7:1:2)	При длине волны 254 нм
ГФ РБ	ТСХ эфирного извлечения из водного гидролизата на силикагеле F 254	аммиака р-р, вода, этанол 96%, этилацетат (1:9:25:65)	После обработки р-ром анисового альдегида при 254 нм.
ГФ РК	ТСХ эфирного извлечения из водного гидролизата на силикагеле F 254	аммиака р-р, вода, этанол 96%, этилацетат (1:9:25:65)	После обработки р-ром анисового альдегида при 254 нм.
Фармакопея КНР	ТСХ н-бутанольного экстракта из метанольного извлечения на силикагеле F 254	этилацетат, муравьиная кислота, ледяная уксусная кислота, вода (15:1:1:2).	После обработки 1% раствором серной кислоты в этаноле.

Номенклатура показателей качества на примеси идентичны во всех фармакопеях (влажность, зола общая и зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте). Однако раздел «Посторонние примеси» приведен не во всех статьях, а только в ГФ РБ и ГФ РФ, подробно описан в ГФ XIV. Следует отметить, что только в European Pharmacopoeia 9.0 [69] (и гармонизированной с ней ГФ РБ) нормируется содержание охратоксина (не более 20 мкг/кг). Статьи Ф ЕС, ГФ РБ и ГФ РК гармонизированы. Практически идентичны фармакопейные статьи на корни солодки Ф Японии [72] и Ф США [71].

Для оценки соответствия действующей нормативной документации на корни солодки современным требованиям было проведено сравнение

отечественной монографии на «Солодки корни» с доступной зарубежной нормативной документацией, регламентирующую качество корней солодки. Сравнительный анализ показал, корни солодки входят практически во все ведущие мировые фармакопеи. Фармакопейные методики стандартизации сырья корней солодки в некоторых странах отличаются и отсутствует нормативная документация на отдельные препараты солодки. Монография ГФ РК на «Солодки корни» отвечает современным требованиям по полноте и качеству испытаний.

1.2.2 Стандартизация лекарственных препаратов солодки

Растительные материалы, используемые в биологически активных добавках, обычно идентифицируются с помощью макроскопических и микроскопических исследований, выполняемых на сырье, с последующим применением химических методов идентификации, обычно выполняемых на сырых экстрактах. Такие химические методы включают ТСХ или ВЭЖХ в сочетании с УФ- или масс-спектрометрическим детектированием. Эти методы идентификации могут быть дополнены методами штрих-кодирования ДНК, которые предпочтительно выполняются на растительном сырье, поскольку экстракты и высоко обработанные растительные материалы обычно имеют низкое качество ДНК, непригодное для точной идентификации ДНК [74,75]. Контроль качества пищевых добавок также требует количественного измерения химических компонентов в исходном материале и в готовом продукте.

В случае солодки для измерения химических компонентов в сырых экстрактах, но редко в сложных растительных пищевых добавках, использовались различные аналитические методы, такие как электрофорез в капиллярной зоне [76], ВЭЖХ-УФ 18-22, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [77], ВЭЖХ–масс–спектрометрия (МС) [78], и ВЭЖХ-танDEMная масс-спектрометрия (МС/МС) [79,80]. В случае солодки для измерения химических компонентов в сырых экстрактах использовались различные аналитические методы, такие как ВЭЖХ-УФ [81-85], ЯМР [84], ВЭЖХ-масс-спектрометрия (МС/МС). Метод ВЭЖХ-МС/МС оказался более специфичен, чувствителен и позволяет проводить более быстрое разделение ГК, чем методы ВЭЖХ-УФ в растительных пищевых добавках [86].

Гель для местного применения с алоэ вера и экстрактом солодки используют в качестве ранозаживляющего, антибактериального и противовоспалительного средства. Физико-химические методы стандартизации позволяют анализировать каждый компонент при совместном присутствии при низких концентрациях [86]. Уровень поглощения определенного количества порошка экстракта солодки после процесса соединения измеряли с помощью спектрофотометра при 640 нм. Результаты показали $7,36 \pm 0,1\%$ ГК на каждый грамм порошка экстракта солодки [87].

В работе Егорова М. В. [88] для количественного содержания ГК был исследован ряд различных лекарственных препаратов солодки голой (сухой, густой экстракт) методом СФ в УФ-области. Оптическую плотность

определяли при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм в качестве раствора сравнения использовали стандартный образец (СО) глицирама [88]. Содержание ГК в сырье было определено в пределах 10,51% до 15,24 в сухом экстракте от 18,35% до 21,80%, в густом экстракте 7,08% до 13,92% и 0,25% до 0,73% в сиропе.

В работе Ш. М. Халед [89] подобраны оптимальные условия экстракции шрота корня солодки этанолом, позволяющие дополнительно получить 4,66% флавоноидов и 0,88% ГК и определен качественный состав веществ, извлекаемых из шрота этанолом.

Для одновременного определения ГК и глицирретиновой кислоты из экстракта корня *Glycyrrhiza glabra* используется метод разделения ВЭЖХ с обращенной фазой на фотодиодном матричном детекторе (RPLC-PDA) [90]. Разработанный метод был апробирован в соответствии с Международной конференцией по гармонизации. Метод продемонстрировал хорошую линейность ($r^2 > 0,9989$) с высокой точностью и достиг хорошей точности от 97,5 до 101,3 % количественных результатов. Метод является более чувствительным и быстрым (решается в течение десяти минут), чем ранее разработанные методы с использованием обычных ЖК-колонок [90].

В работе [91] теоретически и экспериментально подтверждены технология и стандартизация дермальной мази, состоящей из густого экстракта корня солодки и эфирных масел ромашки и чайного дерева, предназначенных для лечения атопического дерматита. Количественное определение ГК в мази заключалось в экстрактивном выделении ГК из препарата, получении его аммонийной соли и измерении оптической плотности этого раствора при 258 ± 2 нм. Содержание ГК в грамме мази рассчитывали с использованием стандартного образца глицирама в шести параллельных определениях. Содержание ГК на грамм мази должно составлять 0,0028 г в пересчете на глицирам. ГК в мази идентифицировали параллельно с ее спектрофотометрическим определением с использованием ТСХ и ультрафиолетового света с длиной волны 254 нм (желтое пятно с $R_f \sim 0,3$ на уровне стандарта глицирама) [91].

Для доказательства подлинности экстракта корня солодки в суппозиториях оптимальным решением является система хлороформ-метанол-вода (26:14:3). Установлено, что основные активные соединения экстракта корня солодки имели значения R_f для ГК около 0,3; для ликуразида – около 0,5. Проведенные исследования количественного определения ГК показали, что ее содержание в одном суппозитории составляет не менее 0,035 г в пересчете на глицирам [92].

Анализ Аювердческих препаратов [93] на основе компонентов солодки проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой оптимизирован для одновременного выделения глицирризина, глабридина и 18 β -глицирретиновой кислоты при времени удерживания 6,6, 8,1 и 10,2 мин соответственно. Сырье, его отвар и остатки, образовавшиеся на стадиях приготовления, экстрагировали в метаноле, в то время как липидные композиции экстрагировали с использованием бинарной системы

растворителей метанола и н-гексана. Разделение проводили на колонке Hypersil gold при температуре 40°C, с использованием 0,2% ортофосфорной кислоты с рН 3,5 в воде и ацетонитрила в качестве подвижной фазы. Соединения были обнаружены при длинах волн 230 нм (глабридин) и 254 нм (глицирризин и 18β-глицирретиновая кислота). Метод позволил разделить деглицированные готовые продукты, содержащие глабридин и 18β-глицирретиновую кислоту, обладающие лекарственной ценностью [93].

Выводы к главе 1

1. Анализ данных литературы показал, что солодка и ее компоненты являются перспективными и актуальными лекарственными растительными средствами для лечения и профилактики вирусных заболеваний, включая коронавирусные инфекции. Проведено множество научных исследований по изучению биологической активности солодки на различных стадиях заболевания.

2. Анализ литературных источников показал, что наиболее перспективным направлением в современной фармакотерапии является использование комбинированных лекарственных препаратов на основе сочетания производных ГК с препаратами различных фармакологических групп. Оптимальная комбинация природных и синтетических лекарственных препаратов обеспечит синергизм и многонаправленность фармакологического действия и снижение побочных реакций последних.

3. Проведение информационно-аналитического исследования методов анализа по фармакопеям ведущих стран мира и других литературных источников показал, что для идентификации и количественного определения биологически активных веществ корня солодки используются современные инструментальные методы как ВЭЖХ, СФ в УФ и ИК- областях и ТСХ.

Экспериментальная часть

Глава 2. Характеристика объектов и методов исследования

Материалы и методы, использованные для проведения научных исследований, соответствуют требованиям ГФ РК I том [94], Фармакопее ЕАЭС I том, 1 и 2 часть [95], ГФ РФ XIV изд., аналитического нормативного документа (АНД), ВАНД и других нормативных документов, регламентирующих качество лекарственных средств в Республике Казахстан.

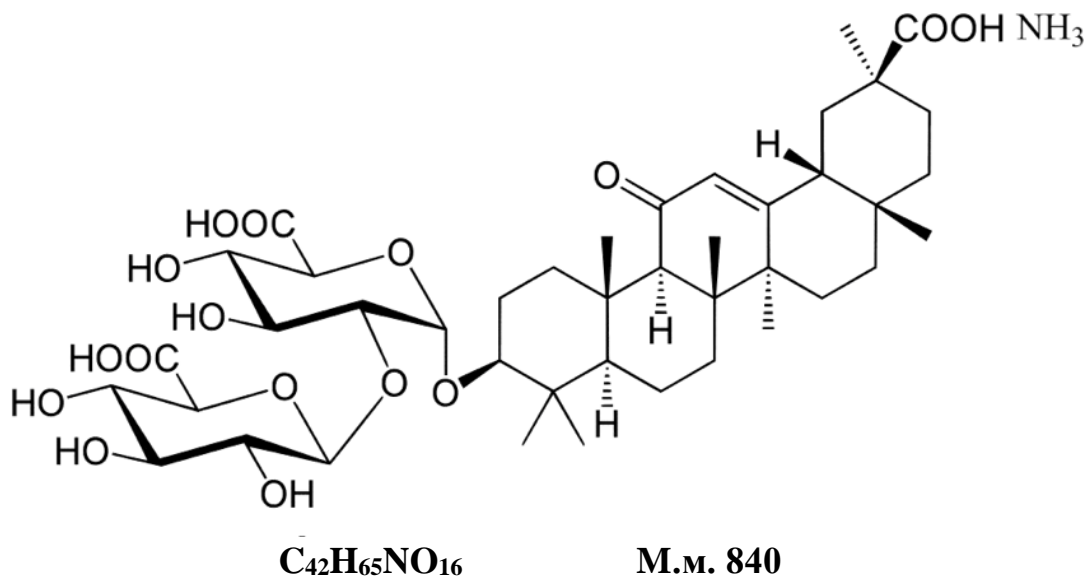
В работе использованы химические, физико-химические методы исследования.

2.1 Материалы исследования

2.1.1. Лекарственные вещества

Glycyrrhizic acid ammonium salt

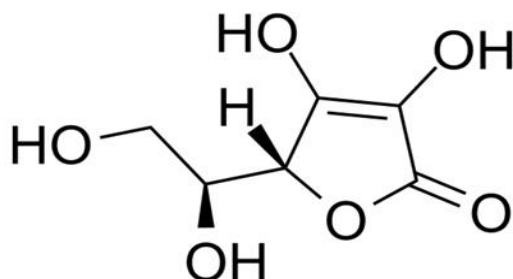
Моноаммония глицирризинат (глицирам) (ФСГФ РФ, XIV изд. – 2018)- монозамещенная аммониевая соль глицирризиновой кислоты, получаемой из корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.)



Мелкокристаллический порошок от светло-кремового до кремового цвета, без запаха, со сладким вкусом. Растворим в воде с образованием вязкого раствора, растворяется в разбавленных растворах кислот и гидроксидов щелочных металлов, очень мало растворим в этаноле.

Ascorbic acid (Vitamin C)

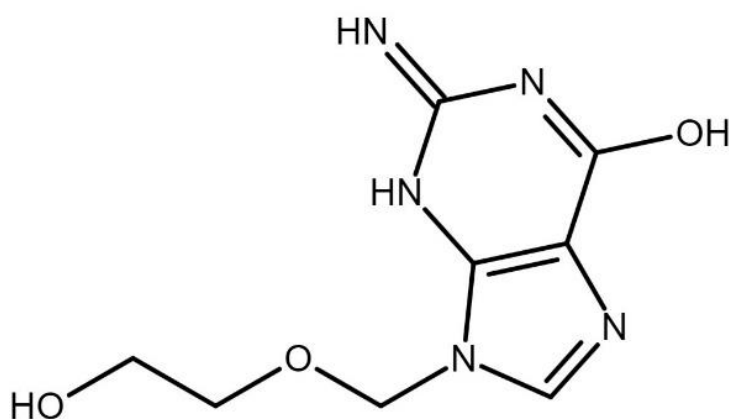
Аскорбиновая кислота (витамин С) (ФСГФ РК, том II – 2008) – витаминное средство, которое выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов, является антиоксидантом.



Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы; на свету постепенно темнеет. Легко растворим в воде, практически нерастворим в хлороформе.

Aciclovir

Ацикловир (ФСГФ РК, том II – 2008) – противовирусный препарат - синтетический аналог ациклического пуринового нуклеозида, обладающего высоко избирательным действием на вирусы герпеса.



Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в диметилсульфоксиде, очень мало растворим в 96 %

спирте. Растворяется в разбавленных растворах минеральных кислот и гидроксидов

2.1.2. Неактивные ингредиенты

Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (Е460) (ГОСТ 9105-74)

Microcrystalline cellulose

$(C_6H_{10}O_5)_n$ М.м.324,3

Белый кристаллический порошок, не растворимый в воде и в слабых кислотах. Применяется как стабилизатор (вещество-текстуратор), а также как эмульгатор, препятствующий слеживанию и комкованию лекарственной субстанции.

Лактоза моногидрат (ГОСТ 33567-2015)

Lactose monohydrate

$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ М. м. 360,31

Белый кристаллический порошок, без запаха, температура плавления равна $202,8^{\circ}C$. Используется как наполнитель при таблетировании, улучшает прессуемость и увеличивает прочность таблеток на раздавливание.

Крахмал кукурузный (ГФ РК II том - 2008)

Maize starch

$(C_6H_{10}O_5)_n$ М. м. около 10^5

Аморфный порошок белого или слегка желтоватого оттенка, практически нерастворим в холодной воде и этаноле, применяется в качестве дезинтегратора.

Поливинилпирролидон К-30 (ГОСТ 9003-39-8)

Polyvinylpyrrolidone

C_6H_9NO М.м. 2.500–2.500.000

Слоеный гигроскопичный порошок желтоватого или белого цвета. Используется в качестве стабилизатора для пероральных форм лекарственных, солюбилизующего агента, диспергатора для пигментов, стабилизатора ферментов и для улучшения биодоступности.

Натрия стеарил фумарат (PRUV®) (ГОСТ 4070-80-8)

Sodium stearyl fumarate

$C_{22}H_{39}NaO_4$ М.м. 390,53

Инертный гидрофильный порошок белого цвета, используется в качестве лубриканта для высокоскоростного прямого прессования.

Кремния диоксид (ГОСТ ГОСТ 9428-73)

Silicon dioxide

SiO_2 М.м.60,08

Бесцветные кристаллы практически нерастворимые в воде, обладающие высокой твёрдостью и прочностью. Используется в качестве наполнителя таблетки.

2.1.3 Реактивы

Аммиака раствор концентрированный (ГФ РК, I том– 2008)

Ammonia solution concentrated

NH_3 М.м. 17,03

Настоящий стандарт распространяется на реактив - аммиака раствор концентрированный, представляющий собой прозрачную бесцветную летучую жидкость с резким запахом. Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Ацетонитрил (ГФ РК, I том– 2008)

Acetonitrile

$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ М.м. 41,05

Настоящий стандарт распространяется на реактив - ацетонитрил, представляющий собой прозрачную, бесцветную жидкость. Смешивается с водой, ацетоном и метанолом.

Бутанол (ГФ РК, I том– 2008)

Butanol

$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ М.м. 74,1

Настоящий стандарт распространяется на реактив - бутанол, представляющий собой прозрачную, бесцветную жидкость, которая смешивается с 96 % спиртом.

Вода дистиллированная (ГФ РК, I том– 2008)

Distilled water

Настоящий стандарт распространяется на реактив - вода Р, полученная путём перегонки.

Вода для хроматографии (ГФ РК, I том– 2008)

Water for chromatography

Настоящий стандарт распространяется на реактив – деионизированная вода, имеющая сопротивление не менее 0.18 МОм-м.

Диметилсульфоксид (ГФ РК, I том – 2008)

Dimethyl sulfoxide

$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ М.м. 78,13

Настоящий стандарт распространяется на реактив – диметилсульфоксид, представляющий собой бесцветную жидкость без запаха со специфическим сладковатым вкусом. Смешивается с водой и со многими органическими растворителями, такими как спирты, эфиры карбоновых кислот, кетоны и хлорированные углеводороды.

Кислота хлороводородная (ГФ РК, I том – 2008)

Hydrochloric acid

HCl М.м. 36,46

Настоящий стандарт распространяется на реактив – соляную кислоту (водный раствор хлористого водорода), представляющий собой бесцветную

жидкость с резким запахом, дымящую на воздух; смешивается с водой, бензолом и эфиром.

Метанол (ГФ РК, I том – 2008)

Methanol

CH_3OH М.м. 32,04

Настоящий стандарт распространяется на метанол, представляющий собой бесцветную жидкость с запахом и вкусом, напоминающим этиловый спирт.

Метиленхлорид (ГФ РК, I том – 2008)

Dichloromethane

CH_2Cl_2 М.м. 84,9

Настоящий стандарт распространяется на реактив – метиленхлорид, представляющую собой прозрачную легкоподвижную и легколетучую жидкость с характерным для галогенпроизводных запахом. Умеренно растворим в воде, смешивается с 96 % спиртом.

Натрия гидроксид (ГФ РК, I том – 2008)

Sodium hydroxide

NaOH М.м. 40,0

Настоящий стандарт распространяется на реактив - гидроксид натрия, который представляет собой белые чешуйки, куски или цилиндрические палочки с кристаллической структурой на изломе; сильно гигроскопичен, хорошо растворим в воде и спирте; быстро поглощает из воздуха углекислоту и воду и постепенно переходит в углекислый натрий.

Серная кислота (ГФ РК, I том – 2008)

Sulfuric acid

H_2SO_4 М.м. 98,0

Настоящий стандарт распространяется на реактив – серная кислота, который представляет собой бесцветную, едкую, маслянистой консистенции, очень гигроскопичную жидкость. Смешивается с водой и 96 % спиртом с интенсивным выделением тепла.

Серебра нитрата (ГФ РК, I том – 2008)

Silver nitrate

AgNO_3 М.м. 169,87

Настоящий стандарт распространяется на реактив – серебра нитрат, который представляет собой бесцветные ромбические кристаллы, легко растворимые в воде.

Спирт этиловый (ГФ РК, I том – 2008)

Ethyl alcohol

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ М.м. 46,05

Настоящий стандарт распространяется на этиловый спирт, используемый в качестве растворителя в медицинской практике, в промышленности и представляет собой бесцветную летучую жидкость с характерным запахом.

Концентрация этилового спирта марки А – не менее 95%.

Трихлоруксусная кислота (ГФ РК, I том – 2008)

Trichloroacetic acid

$C_2HCl_3O_2$ М.м. 163,4

Настоящий стандарт распространяется на реактив - трихлоруксусная кислота, который представляет собой бесцветные гигроскопичные кристаллы, существующие в α - и β -кристаллических формах. Имеет специфический уксусный неприятный запах. Хорошо растворима в воде.

Уксусный ангидрид (ГФ РК, I том – 2008)

Acetic anhydride

$C_4H_6O_3$ М.м. 102,1

Настоящий стандарт распространяется на реактив – уксусный ангидрид, который представляет собой прозрачную бесцветную жидкость.

Фосфатный буферный раствор (ГФ РК, I том – 2008)

Phosphate buffer solution

Приготовление буферного раствора: смешивают 82,4 мл раствора 71,5 г/л натрия гидрофосфата с 17,6 мл раствора 21 г/л кислоты лимонной.

Хлороформ (ГФ РК, I том – 2008)

Chloroform

$CHCl_3$ М.м. 119,37

Настоящий стандарт распространяется на реактив - хлороформ, который представляет собой бесцветную прозрачную жидкость с характерным запахом. Используется в производстве и в химическом анализе, в качестве растворителя в медицинской практике, в производстве душистых веществ и других областях промышленности.

Марка реактива х.ч., массовая для хлороформа не менее 99,5%.

2-Пропанол (Изопропиловый спирт) (ГФ РК, I том – 2008)

Isopropanol

C_3H_8O М.м. 60,1

Настоящий стандарт распространяется на реактив – изопропиловый спирт, который представляет собой прозрачную, бесцветную, воспламеняющуюся жидкость. Смешивается с водой и 96 % спиртом

2.2. Методы исследования.

2.2.1 Химические методы

1. Определение подлинности лекарственных веществ

а) Глицирама

Для идентификации глицирама в комбинированном препарате корня солодки были применены специфические реакции для тритерпеноидной структуры и функциональных групп.

б) Аскорбиновой кислоты

Для идентификации АК в комбинированном препарате были применены методики идентификации с помощью осадительных реакций, представленных в соответствующем разделе.

с) Ацикловира

Для молекулы АЦ в нормативно-технических документах и фармакопейных статьях мировых фармакопей нет химических реакций, идентификация проводится только физико-химическими методами анализа (ТСХ, СФ в УФ-области и ВЭЖХ).

2.2.2 Физические и физико-химические методы

1. Определение растворимости, удельного показателя поглощения, рН растворов проведено согласно ГФ РК, том I – 2008 и ФЕАЭС I том, 1 и 2 часть, 2020 и 2021 .

2. Значения рН растворов определены с помощью рН метра 827 («MetrohmAG», Швейцария). Измерительные работы выполнены с использованием аналитических весов («RADWAG», серия AS, Польша) и набора мерной посуды (Россия).

3. Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии применен для идентификации активных ингредиентов и определения посторонних примесей в КЛП на основе экстракта корня солодки. Подбор условий хроматографирования проводился таким образом, чтобы было достигнуто селективное разделение активных ингредиентов и возможных примесей и одновременное детектирование глицирама и других компонентов КЛП.

Работы выполнены с использованием комплекта приборов для проведения тонкослойной хроматографии (Россия), хроматографических пластинок «Sorbfil» ПТСХ-АФ-АиПТСХ-П-В (высокоэффективные) размером 10×10 см.

Результаты исследований приведены в разделе 3.1.2

4. УФ-спектрофотометрия

Метод использован для идентификации и количественного определения КЛП корня солодки.

Работа выполнена на СФ-2000 с программным обеспечением ОКБ «Спектр», Россия. Результаты исследований приведены в разделе 3.2

Статистическая обработка результатов.

При обработке полученных результатов исследований применен метод вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту ($P < 0,05$) на SPSS Statistics — компьютерная программа для статистической обработки данных.

Для определения специфичности, линейной зависимости, правильности, воспроизводимости методик количественного анализа активных ингредиентов в КЛП использован метод валидации в соответствии с общей ФС ГФ РК, I том—2008 «Валидация аналитических методик и испытаний».

Результаты статистической обработки приведены в соответствующих разделах.

Глава 3. Разработка спецификации качества и стандартизация комбинированного лекарственного препарата корня солодки

3.1 Разработка методик идентификации активных ингредиентов комбинированного лекарственного препарата химическими и физико-химическими методами

3.1.1 Методика идентификации активных ингредиентов с помощью химических реакций

Объектами исследования являлись лабораторные образцы диспергируемых таблеток для внутреннего применения. Объект представляет собой диспергируемые таблетки для внутреннего применения №10 в упаковке. Средняя масса одной диспергируемой таблетки составляет $1,3 \text{ г} \pm 0,02 \text{ г}$.

Активные ингредиенты:

№	Наименование	Дозировка (г)
1.	Глицирам	0,04
2.	Аскорбиновая кислота	0,1
3.	Ацикловир	0,4

Неактивные ингредиенты:

№	Наименование	Значение	Дозировка (г)
1.	МКЦ	стабилизатор	0,5
2.	Лактоза	наполнитель	0,1
3.	Крахмал кукурузный	дезинтегратор	0,1
4.	Повидон К30	солубилизатор	0,012
5.	Натрия стеарилфумарат	лубрикант при прямом прессовании	0,011
6.	Кремния диоксид	наполнитель	0,05

Для идентификации первого активного ингредиента КЛП - глицирама были использованы ранее известные, часто используемые фармакопейные реакции на тритерпеновые сапонины – пенообразования (ГФ РФ XIV изд.), цветные реакции (ГФ РФ XIII изд.) и реакции щелочного гидролиза (European Pharmacopoeia 9.0 (PhEur)).

Реакции проведены на лекарственной субстанции глицирама, отвечающей требованиям ГФ РФ и PhEur.

Реакция пенообразования.

Методика. Около 0,4 г субстанции глицирама растворяют в 10 мл 0,25%-ного раствора гидроксида аммония и взбалтывают, образуется обильная пена. Обильное и устойчивое пенообразование субстанции наблюдается в щелочной среде. Предел обнаружения - 0,5 мг/мл.

Цветная реакция с ванилином.

Методика. Около 0,02 г субстанции глицирама смешивают с 4 мл 0,5% раствора ванилина в концентрированной серной кислоте, при этом раствор окрашивается в желтый цвет. При добавлении к смеси воды по каплям наступает изменение интенсивности и цвета окраски раствора от желтой до красной. Предел обнаружения - 0,1 мг/мл.

Реакция щелочного гидролиза.

Методика. 0,1 г субстанции глицирама растворяют в 20 мл воды очищенной, добавляют 2 мл разбавленного раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают. При нагревании раствор выделяет пары, которые можно идентифицировать щелочной реакцией влажной лакмусовой бумаги.

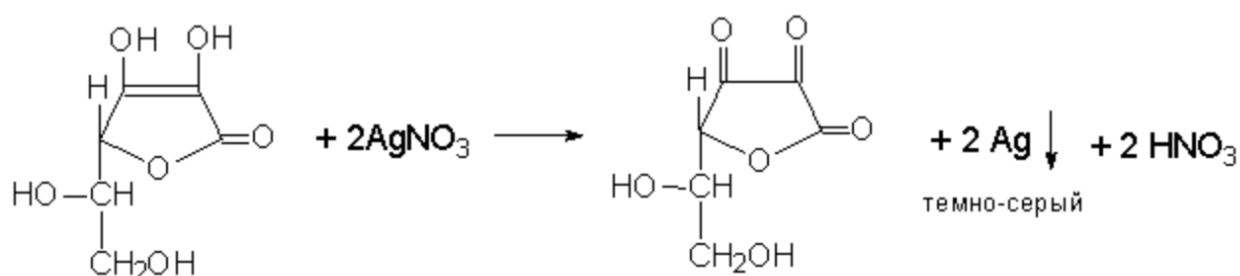
Пределы обнаружения глицирама по реакции гидролиза - 0,5 мг/мл.

Для идентификации второго активного ингредиента - АК использованы характерные реакции, подтверждающие ее окислительно-восстановительные свойства.

Реакции проведены на лекарственной субстанции АК, отвечающей требованиям ГФ РК.

Реакция АК с серебра нитратом.

Методика. 0,10 г навески субстанции АК растворяют в 2 мл воды и прибавляют по каплям раствор аммиака и 0,5 мл раствора серебра нитрата Р2; выпадает темный осадок свободного серебра. Предел обнаружения - 1 мг/мл.



Аналитические методы идентификации КЛП.

Для идентификации активных ингредиентов в комбинированном препарате с помощью вышеописанных качественных реакций была

приготовлена модельная смесь содержимого диспергируемой таблетки (активные и неактивные ингредиенты).

Реакция пенообразования на сапонины.

Обильное и устойчивое пенообразование субстанции наблюдается в щелочной среде. При действии на аскорбиновую кислоту сильных щелочей происходит разрыв лактонного цикла с последующим образованием фурфурола, поэтому предварительно необходимо произвести разделение активных ингредиентов в КЛП.

Методика. Около 0,5 г навески КЛП растворяют в 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и фильтруют на бумажном фильтре. Осадок на фильтре растворяют в 10 мл 0,25% раствора гидроксида аммония и взбалтывают, образуется обильная пена.

Таким образом, качественная реакция на сапонины является специфичной для подтверждения подлинности глицирама в препарате, однако не позволяет проводить идентификацию глицирама в присутствии аскорбиновой кислоты и требует предварительного разделения активных ингредиентов модельной смеси.

Цветная реакция с ванилином.

Методика. Навеску КЛП эквивалентную 0,02 г субстанции глицирама смешивают с 4 мл 0,5% раствора ванилина в концентрированной серной кислоте, при этом раствор окрашивается в желтый цвет. При добавлении к смеси воды по каплям наступает изменение интенсивности и цвета окраски раствора от желтой до красной

Реакция щелочного гидролиза.

Методика. Навеску КЛП эквивалентную 0,1 г субстанции глицирама растворяют в 20 мл воды очищенной, добавляют 2 мл разбавленного раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают. При нагревании раствор выделяет пары, которые можно идентифицировать щелочной реакцией влажной лакмусовой бумаги.

Качественные реакции на аскорбиновую кислоту.

АК крайне неустойчива в щелочных растворах и окисляется под действием таких окислителей, как аммиачный раствор серебра. Для определения подлинности необходимо предварительное разделение хлороводородной кислотой АК от глицирама, т.к. последний дает реакцию пенообразования в щелочном аммиачном растворе.

1. Реакция с нитратом серебра.

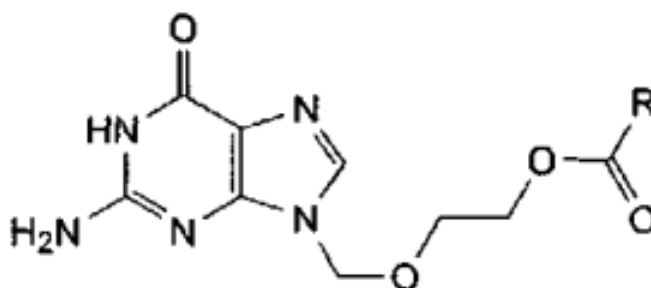
Методика. Около 0,5 г навески КЛП растворяют в 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и фильтруют на бумажном фильтре. К фильтрату

добавляют 5 мл воды и прибавляют по каплям раствор аммиака и 0,5 мл раствора серебра нитрата Р2; выпадает темный осадок свободного серебра.

3.1.2 Методика идентификации активных ингредиентов и их родственных примесей методом тонкослойной хроматографии

В методике идентификации активных ингредиентов и определении их примесей в комбинированном сочетании глицирама, аскорбиновой кислоты (АК) и ацикловира (АЦ) в диспергируемых таблетках был использован метод тонкослойной хроматографии (ТСХ).

В монографии на лекарственную субстанцию АЦ по ГФ РК регламентировано определение примеси А (2-[(2-амино-6-оксо-1,6-дигидро-9Н-пурин-9-ил)метокси]этилацетат).



Хроматографическое поведение глицирама, АК и АЦ изучено на модельной смеси, состоящей из СО ГФ РФ моноаммония глицирризат (ГФ РФ, XIV изд.- 2018), аскорбиновой кислоты (ГФ РК, II том - 2008), ацикловира (ГФ РК II том - 2008) и неактивных ингредиентов: МКЦ (ГОСТ 9105-74), лактоза (ГОСТ 33567-2015), крахмал кукурузный (ГОСТ 32159-2013), повидон К30 (ГОСТ 9003-39-8), натрия стеарилфумарат (ГОСТ 4070-80-8), кремния диоксид (ГОСТ 9428-73).

Хроматографическую подвижность глицирама, АК и АЦ исследовали в зависимости от рН подвижной фазы с использованием хроматографических пластинок «Sorbfil»

С целью извлечения идентифицируемых активных ингредиентов препарата - глицирама, АК, АЦ, навеску растертых диспергируемых таблеток растворяют в 10 мл метанола.

Оборудование для хроматографии и проявления хроматограмм: пластины для ТСХ Sorbfil UV-254 (ЗАО «Сорбполимер», Россия, 10×15 см) и пластины для ТСХ FBTL-AL-100100-F FilterBio (ООО «Компания Хеликон», Россия, 10×15 см); стеклянные камеры для хроматографирования; микрошприц с ценой деления 1 мкл; ультрафиолетовый облучатель ТСХ-254/365 (Петролазер, Россия).

Методика получения и обработки хроматограмм.

На стартовую линию пластинки для ТСХ с помощью микрошприца наносили 5 мкл испытуемого раствора и 5 мкл растворов сравнения; расстояние между точками нанесения растворов не менее 1,5 см. Пластинки помещали в камеру для восходящего элюирования и закрывали крышкой. Камеру предварительно насыщали парами подвижной фазы (ПФ) в течении 20 минут. Когда фронт ПФ достигал высоты около 10 см от линии старта, пластинку вынимали и сушили на воздухе. Хроматографические зоны испытуемого и стандартных растворов проявляли по тушению флуоресценции УФ-покрытия пластинки. При облучении пластинки УФ-светом с длиной волны 254 нм зоны веществ проявлялись как фиолетовые пятна на флуоресцирующем зеленом фоне; контуры пятна фиксировали карандашом.

В качестве неподвижной фазы использованы пластины, покрытые обращено-фазовым силикагелем, так как молекулы активных ингредиентов исследуемого комбинированного препарата полярные по своей природе, что улучшает их разделение при совместном присутствии с оптимальным значением R_f каждого из аналитов.

При изучении и поиске оптимального состава элюента в качестве полярного растворителя были использованы спирты (метанол, этанол и изопропанол), вода и раствор аммиака концентрированный, которые при различных соотношениях увеличивали или уменьшали высоту R_f высокополярных молекул глицирама, АК. В качестве неполярного составляющего ПФ был использован метиленхлорид, долевая часть которого в элюенте значительно влияли на коэффициент удерживания АЦ, и в меньшей степени на глицирам и АК. Таким образом, хроматографирование проводилось в следующих системах растворителей нейтрального и основного характера: фосфатный буфер-ацетонитрил (7:3), (8:2), (6:4); хлороформ-метанол-вода (25:20:5), (30:17:3); изопропанол-метиленхлорид-вода (6:3:1); изопропанол-метиленхлорид-аммиак концентрированный (6:3:1), этанол-метиленхлорид-раствор аммиака концентрированный (6:3:1); н-бутанол-метиленхлорид-раствор аммиака концентрированный (7:2:5); раствор аммиака концентрированный-вода-96% этанол-этилацетат (1:9:25:65).

Также были использованы растворители со средней и низкой полярностью - ацетонитрил и хлороформ, манипуляция объемом которых давала меньший процент воздействия на R_f и R_s (коэффициент разделения) веществ как в модельной смеси препарата, так и в индивидуальном пути веществ-свидетелей.

Наиболее оптимальной явилась ПФ: этанол- метиленхлорид-раствор аммиака концентрированный (6:3:1), которая обеспечила селективное разделение трех активных веществ и примеси А АЦ (Рис.4). Зона адсорбции, проявляющиеся в УФ-свете, сформированы в виде круглых, четко выраженных фиолетовых пятен на зеленоватом фоне. Предел обнаружения по отношению к глицираму составляет 1 мкг, АК - 0,5 мкг и АЦ – 0,1 мкг, примеси А – 0,1 мкг. Значения R_f составили для глицирама 0,33 на уровне с СОВС глицирама, АК – 0,66, АЦ – 0,54 и примеси А – 0,75.

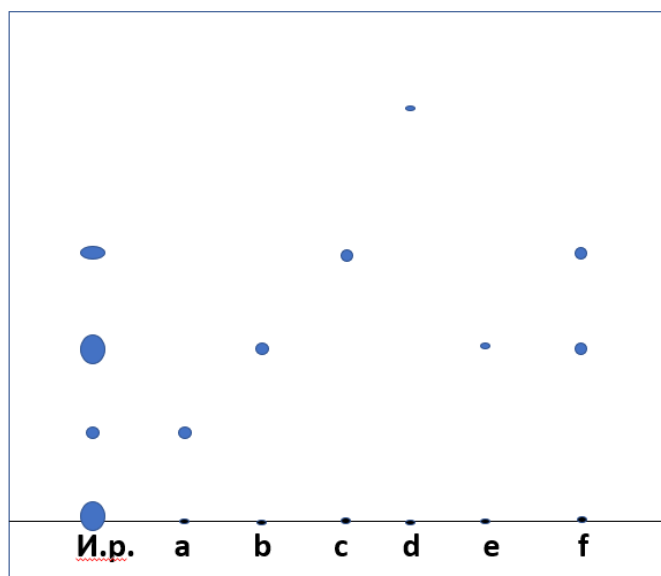


Рисунок 4 Хроматограмма испытуемого раствора и растворов сравнения

И.р. - Испытуемый раствор (модельная смесь таблетки)

a - СО глицирама

b - СО АК

c - СО АЦ

d – СО примеси А

e – раствор АЦ для нормирования примесей

f – раствор для определения пригодности хроматографической системы

Методика.

Испытуемый раствор: точную навеску КЛП (около 1 г) препарата растворяют в 10 мл метанола.

Раствор сравнения (a): 10 мг СО глицирама растворяют в 5 мл метанола и доводят до 10 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (b): 10 мг СО аскорбиновой кислоты растворяют в 5 мл воды очищенной и доводят до 10 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (c): 10 мг СО ацикловира растворяют в 5 мл диметилсульфоксида и доводят до 10 мл этим же растворителем.

Стандартный раствор (d): 14 мг СО примеси А растворяют в 10 мл диметилсульфоксида и доводят до 20 мл этим же растворителем.

Стандартный раствор (e): 14 мг СО ацикловира растворяют в 10 мл диметилсульфоксида. 1 мл полученного раствора доводят до 10 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (f): смешивают 1 мл раствора сравнения (b) и 1 мл раствора сравнения (c).

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (10 мкг глицирама, 34 мкг АК и 134 мкг АЦ), раствора сравнения (a) (5 мкг глицирама), раствора сравнения (b) (5 мкг АК), раствора сравнения (c) (5 мкг АЦ), раствора сравнения (d)(примеси А 0,7 мкг), раствора

сравнения (e) (0,7 мкг АЦ), раствора сравнения (f) (2,5 мкг АК + 2,5 мкг АЦ); Пластинку сушат на воздухе в течение 10 минут, затем помещают в защищенную от света камеру со смесью растворителей этанол 90%-метилхлорид-раствор аммиака концентрированный (6:3:1). Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в токе холодного воздуха в течение 10 минут, просматривают в УФ-свете.

Идентификация. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться три основных пятна на уровне пятен растворов сравнения a, b, c, соответствующие по значению R_f .

Родственные примеси:

Примесь А. На хроматограмме испытуемого раствора пятно, соответствующее примеси А, не должно быть интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения (d) (0,5%).

Другие примеси. На хроматограмме испытуемого раствора любое пятно с R_f больше, чем R_f пятна АК не должно быть интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения (e) (0,5%).

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора сравнения (f) четко разделены два пятна, соответствующие АК и АЦ.

Валидация методики качественного определения активных ингредиентов и родственных примесей в КЛП методом ТСХ.

Валидацию проводили в соответствии с рекомендациями [96], с учетом специфики методик ТСХ [97], определяя следующие аналитические характеристики: специфичность, прецизионность и робастность.

Определение специфичности методики идентификации активных ингредиентов КЛП проводили на одной пластинке в сравнении со стандартными образцами (Табл. 4).

В исследуемой подвижной фазе после проявления пластинки в камере и высушивания на хроматограмме исследуемого раствора обнаруживаются три четко разделенных пятна на уровне пятен стандартных образцов. Также на хроматограмме испытуемого раствора выявляется пятно родственной примеси А АЦ – (2-[(2-амино-6-оксо-1,6-дигидро-9H-пурин-9-ил)метокси]этилацетат) с R_f соответствующее R_f примеси А, не интенсивнее по цвету и размеру пятна на хроматограмме раствора сравнения (d).

Таблица 4 Характеристики разрешения и селективности при определении активных ингредиентов в КЛП

Вещество	R_f	Ширина пятна, см	Разрешение	Селективность
Примесь А	0,75	0,06	-	-
АК	0,66	0,35	ПрА-АК: 4	ПрА-АК: 1,1
АЦ	0,54	0,93	ПрА -АЦ: 3,6	ПрА -АЦ: 1,2
Глицирам	0,33	0,14	ПрА -глицирам: 8	ПрА -глицирам:

				1,6
--	--	--	--	-----

Прецизионность – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, обычно выражают в терминах стандартных отклонений. Прецизионность качественного определения активных ингредиентов и родственных примесей оценивали в условиях внутрилабораторной прецизионности, используя результаты, полученные для одного и того же объекта анализа в одной и той же лаборатории, с использованием разного оборудования и двумя разными операторами (Табл. 5).

Таблица 5 Значения коэффициента удерживания с учетом стандартного отклонения

Аналит	s_r (%)	$R_{f\text{cp}} (n=5)$	Открываемость (recovery) (%)
Примесь А	0,02	0,75	99,9
АК	0,02	0,66	101
АЦ	0,05	0,54	99,8
Глицирам	0,01	0,33	100

Результаты, полученные при изучении прецизионности, показали, что зоны, выявленные на исследованных хроматограммах, были идентичны по интенсивности окраски, расположены параллельно и были четко разделены. Метрологические характеристики значений R_f для зоны, что соответствует глицираму, в модельной смеси КЛП представлены в Таблице 6.

Таблица 6 Прецизионность значений R_f , соответствующих глицираму на модельной смеси КЛП

Лаб	Лаборатория кафедры фармацевтических дисциплин			
	Дата	05.окт.2023	05.окт. 2023	06.окт. 2023
Вид прецизионности	На одной пластинке	На разных пластинках	Внутрилабораторная прецизионность	
измерение 1, R_f	0,323	0,333	0,345	
измерение 2, R_f	0,344	0,356	0,356	
измерение 3, R_f	0,333	0,375	0,311	
Среднее знач. R_f X_{cp}	0,32	0,35	0,34	
СКО повторяемости	0,01	0,02	0,02	
Отн. СКО, % (CV, RSD)	3,13	5,71	5,88	
$R_f \text{ max}-R_f \text{ min}$	0,02	0,04	0,05	

Аналогичным образом изучили прецизионность второго активного ингредиента КЛП. Метрологические характеристики значений R_f для зоны, соответствующей АК представлены в Таблице 7.

Таблица 7 Прецизионность значений R_f , соответствующих АК на модельной смеси КЛП

Лаборатория	Лаборатория кафедры фармацевтических дисциплин			
	Дата	05.окт.2023	05.окт. 2023	06.окт. 2023
Вид прецизионности	На одной пластинке	На разных пластинках	Внутрилабораторная прецизионность	
измерение 1, R_f	0,66	0,68	0,66	
измерение 2, R_f	0,65	0,66	0,67	
измерение 3, R_f	0,66	0,67	0,66	
Среднее знач R_f , X_{cp}	0,65	0,67	0,66	
СКО повторяемости	0,01	0,03	0,05	
Отн. СКО, % (CV, RSD)	1,53	4,48	7,57	
$R_f \max - R_f \min$	0,01	0,02	0,01	

Таблица 8 Прецизионность значений R_f , соответствующих АЦ на модельной смеси КЛП

Лаборатория	Лаборатория кафедры фармацевтических дисциплин			
	Дата	05.окт.2023	05.окт. 2023	06.окт. 2023
Вид прецизионности	На одной пластинке	На разных пластинках	Внутрилабораторная прецизионность	
измерение 1, R_f	0,56	0,58	0,55	
измерение 2, R_f	0,56	0,56	0,5	
измерение 3, R_f	0,54	0,61	0,6	
Среднее знач R_f , X_{cp}	0,55	0,58	0,55	
СКО повторяемости	0,01	0,03	0,05	
Отн. СКО, % (CV, RSD)	1,82	5,17	9,09	
$R_f \max - R_f \min$	0,02	0,05	0,10	

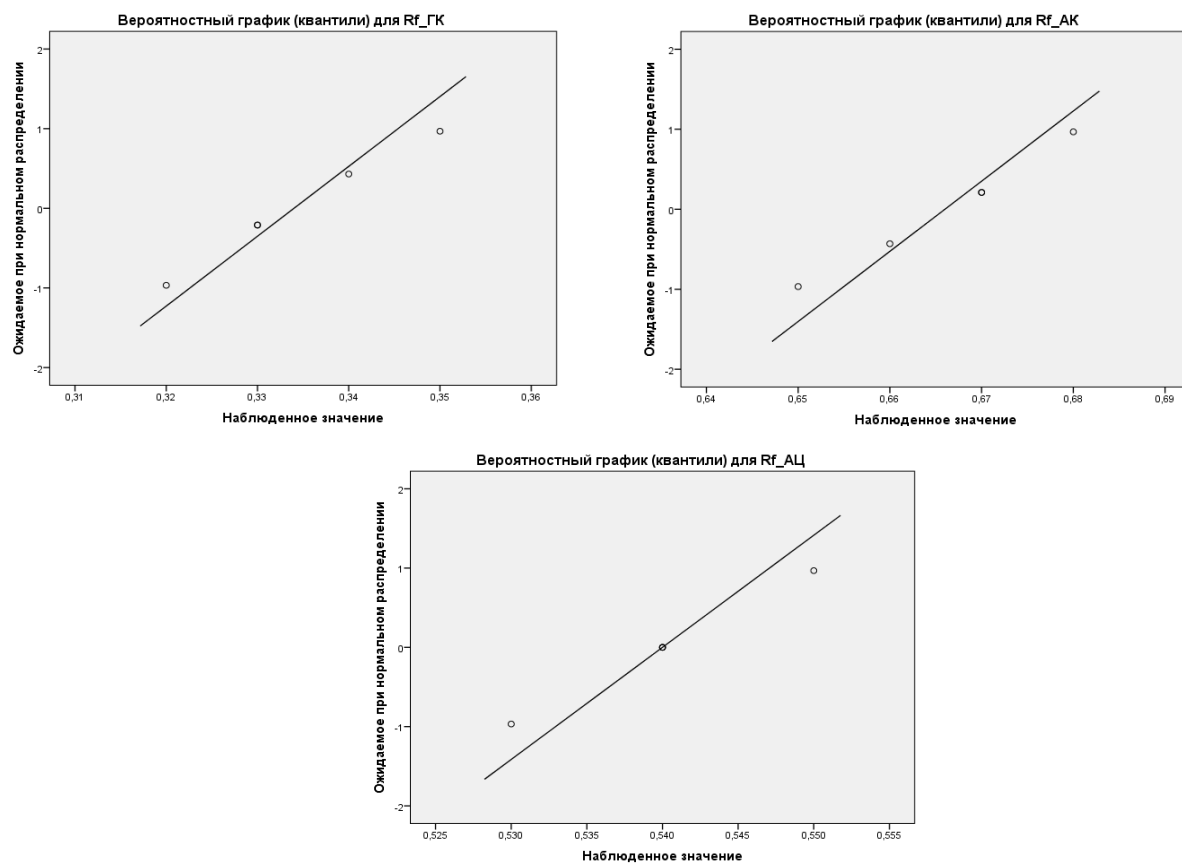


Рисунок 5 Вероятностный график распределения значений R_f глицирама, АК и АЦ

Робастность (robustness – устойчивость) методики – мера ее способности оставаться без изменений при небольших, но неслучайных изменениях в параметрах методики, которая показывает пригодность и надежность методики при нормальном использовании. При определении робастности методики идентификации активных ингредиентов и примесей в КЛП оценивали влияние условий проведения хроматографирования (сорбенты аналогичных пластин различных производителей, тип и насыщение хроматографической камеры, длина полосы разделения, разные условия высушивания) на конечный результат.

Установлено, что хроматограммы, полученные на пластинках производства Sorbfil и FilterBio, при разных временных показателях насыщения камеры – 20, 30, 40, 60 мин, при различных условиях высушивания проявленной пластины - при комнатной температуре и в сушильном шкафу дают сопоставимые результаты и могут быть использованы при проведении анализа.

Статистическая обработка результатов анализа. При статистической обработке полученных данных разработанный метод показал высокую воспроизводимость при многократном повторении эксперимента (табл. 9), а относительная погрешность составила:

$\pm 2,4\%$ для ПФ этанол–метиленхлорид–раствор аммиака
 концентрированный (6:3:1);
 $\pm 2,7\%$ для ПФ изопропанол-метиленхлорид-вода (6:3:1).

Таблица 9 Статистическая обработка результатов хроматографирования лабораторных образцов КЛП

№	Состав подвижной фазы	n	\bar{X}	P	S	S_x	t (95,6)	Δx	$x \pm \Delta x$	ε
1	этанол– метиленхлорид- раствор аммиака концентрированный (6:3:1)	6	0,324	0,95	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	2,45	0,01	0,59	2,4%
2	изопропанол- метиленхлорид- вода (6:3:1)	6	0,576	0,95	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	2,45	0,02	0,59	2,7%

3.2 Методика количественного анализа активных ингредиентов методом УФ-спектрофотометрии

Активными ингредиентами являются глицирам – 0,04 г, аскорбиновая кислота (АК) – 0,1 г и ацикловир (АЦ) – 0,4 г.

Неактивные ингредиенты: МКЦ (ГОСТ 9105-74), лактоза моногидрат (ГОСТ 33567-2015), крахмал кукурузный (ГФ РК II том-2008), повидон К30 (ГОСТ 9003-39-8), натрия стеарилфумарат (ГОСТ 4070-80-8), кремния диоксид (ГОСТ 9428-73).

Измерение оптической плотности проводилось на спектрофотометре – 2000 (Россия) с программным обеспечением (ОКБ «Спектр», Россия).

Количественное определение, как показал анализ методик мировых фармакопей, действующих веществ в КЛП, проводится методом УФ-спектрофотометрии.

Индивидуальные ингредиенты для рассматриваемого нами комбинированного препарата имеют следующие УФ характеристики: глицирам в спиртовом растворе имеет максимум поглощения (258 ± 2) нм (ГФ РФ XIV ФС-42-2636), АК в 0,1М хлороводородной кислоте имеет максимум поглощения при длине волны 243 нм (ГФ РК 2 том – 2008) и АЦ в 0,1 М хлороводородной кислоте имеет максимум поглощения при длине волн 254 нм и плечо при длине волны 272 нм (ГФ РК 2 том – 2008).

Различные свойства растворимости используются как для разделения действующих веществ, так как разница оптических характеристик электронных полос поглощения глицирама, АК и АЦ незначительна, так и для разделения активных ингредиентов от неактивных.

В отличие от АК и АЦ глицирам и неактивные ингредиенты нерастворимы в хлороводородной кислоте. Окисление АК легко происходит в нейтральной и щелочной среде. В связи с этим, с целью разделения ингредиентов, предварительно глицирам и неактивные ингредиенты из КЛП осаждали в 0,1М хлороводородной кислотой, в которой АК и АЦ растворяются. После фильтрования раствора КЛП в 0,1М хлороводородной кислоте осадок на фильтре переносят в мерную посуду и растворяют в 0,1 М гидроксиде натрия, повторно фильтруют, тем самым отделяя глицирам от неактивных ингредиентов, которые нерастворимы в гидроксиде щелочном металла. Фильтрат используют для определения количественного содержания глицирама.

Методика

Точную навеску растёртых диспергируемых таблеток, эквивалентную 0,04 г глицирама, растворяют в 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и фильтруют через складчатый фильтр. Осадок на фильтре промывают 5 мл того же растворителя. Фильтрат используют в количественном определении АК и АЦ, предварительно отделив их друг о друга. Осадок на фильтре переносят в

мерную колбу и добавляют 10 мл 0,1М гидроксид натрия, полученный раствор фильтруют.

Фильтрат переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют одну каплю кислоты хлористоводородной концентрированной, растворяют в 30 мл 50% этилового спирта и доводят объём раствора до метки тем же спиртом (раствор А).

2 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора до метки 50% этиловым спиртом и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 258 ± 2 в кювете с толщиной слоя 10мм. В качестве раствора сравнения используют 50% этиловый спирт.

В качестве раствора сравнения использовали рабочий стандартный раствор (PCO) глицирама.

Приготовление раствора PCO глицирама. Около 0,02 г СО глицирама растворяют в мерной колбе вместимостью 25 мл в 10 мл 50 % спирта. Доводят объём раствора до метки 50 % спиртом и перемешивают? снимают спектры раствора аналогичным образом, что и раствор Б.

Спектры глицирама указаны на рисунке 6.

Содержание глицирама вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 50 \times 1 \times 50 \times b}{D_0 \times m_1 \times 50 \times 1 \times 50}$$

Где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 – оптическая плотность (PCO) глицирама;
 m_1 - масса навески препарата, в г.;
 m_0 – масса навески (PCO) глицирама, в г.;
 b – средняя масса 1 таблетки, в г.

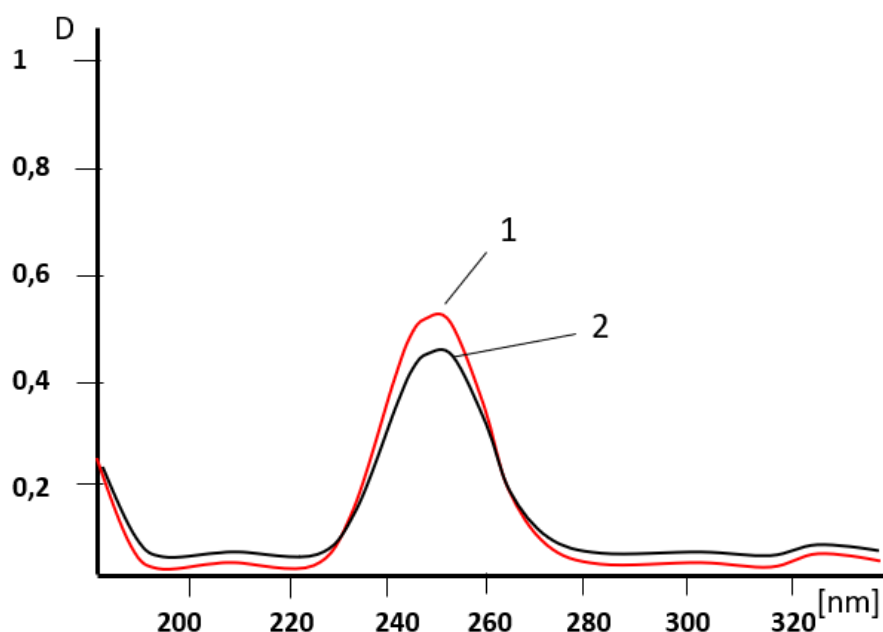


Рисунок 6 УФ-спектры раствора РСО глицирама (1) и испытуемого раствора (2)

Содержание глицирама должно быть от 0,039-0,041 г, считая на среднюю массу одной таблетки.

Методика количественного определения аскорбиновой кислоты в КЛП после предварительного разделения

Количественное определение АК проводят согласно ГФ РК при длине волны 243 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

К фильтрату, полученному после отделения осадка глицирама и неактивных ингредиентов, добавляют 20 мл воды очищенной, выпадает осадок АЦ. Далее фильтруют полученный раствор, осадок на фильтре промывают дополнительно водой. Фильтрат, полученный после отделения осадка АЦ, помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем водой очищенной до метки (раствор А)

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Б).

Измерение оптической плотности АК проводили при длине волны 247 нм в кювете толщиной 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали смесь из равных частей воды очищенной и 0,1М раствор HCl. Полученные спектры указаны на рисунке 7.

Аналогично готовят рабочий стандартный образец (PCO) кислоты аскорбиновой и измеряют его оптическую плотность.

Приготовление PCO кислоты аскорбиновой. 0,10 г СО кислоты аскорбиновой помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем водой очищенной до метки (раствор В)

1,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Г).

Содержание АК определяют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 50 \times 1 \times 50 \times b}{D_0 \times m_1 \times 50 \times 1 \times 50}$$

Где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность (PCO) аскорбиновой кислоты;

m_1 - масса навески препарата, в г.;

m_0 – масса навески (PCO) аскорбиновой кислоты, в г.;

b – средняя масса 1 таблетки, в г.

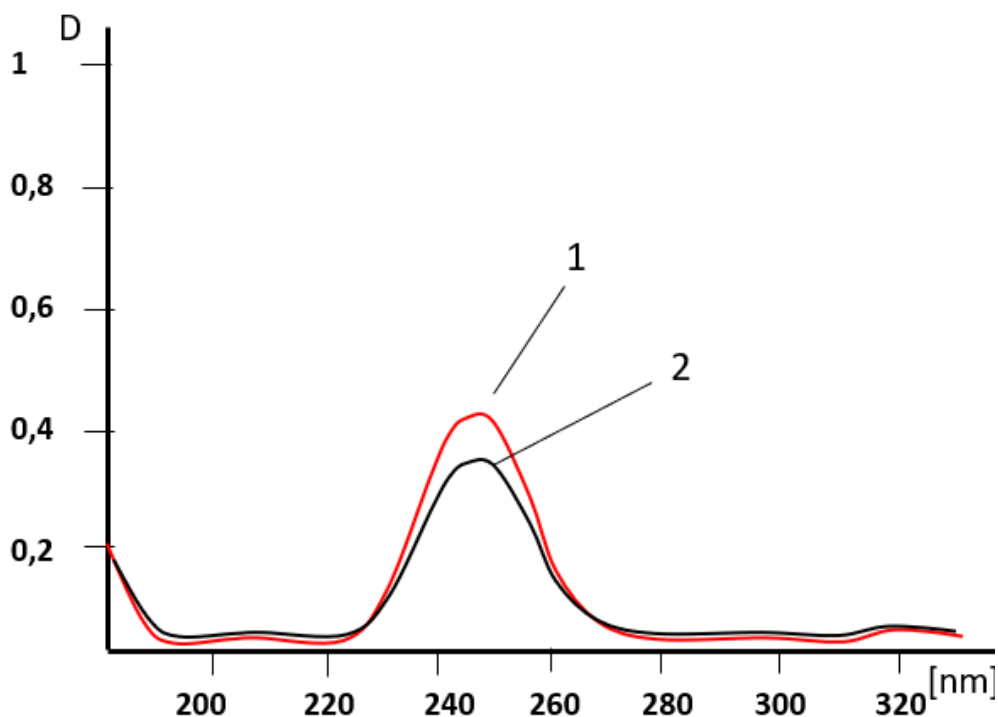


Рисунок 7 УФ- спектры поглощения испытуемого раствора (2) и РСО АК (1) в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты

Содержание АК должно быть от 0,099-0,102 г, считая на среднюю массу одной таблетки.

Методика количественного определения ацикловира в КЛП после предварительного разделения.

Количественное определение АЦ проводят согласно ГФ РК II том-2008 при длине волны 254 и 272 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Осадок на фильтре, полученный после предварительного разделения от АК, помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и растворяют в 0,1М хлороводородной кислоте, доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Б).

Измерение оптической плотности АЦ проводили при длине волны 254 и 272 нм в кювете толщиной 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали 0,1М раствор HCl. Спектры АЦ в КЛП указаны на рисунке 8.

Аналогично готовят РСО АЦ и измеряют его оптическую плотность.

Приготовление РСО ацикловира. 0,40 г СО АЦ помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор В)

1,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Г).

Содержание АЦ определяют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 50 \times 1 \times 50 \times b}{D_0 \times m_1 \times 50 \times 1 \times 50}$$

Где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность (PCO) ацикловира;

m_1 – масса навески препарата, в г.;

m_0 – масса навески (PCO) ацикловира, в г.;

b – средняя масса 1 таблетки, в г.

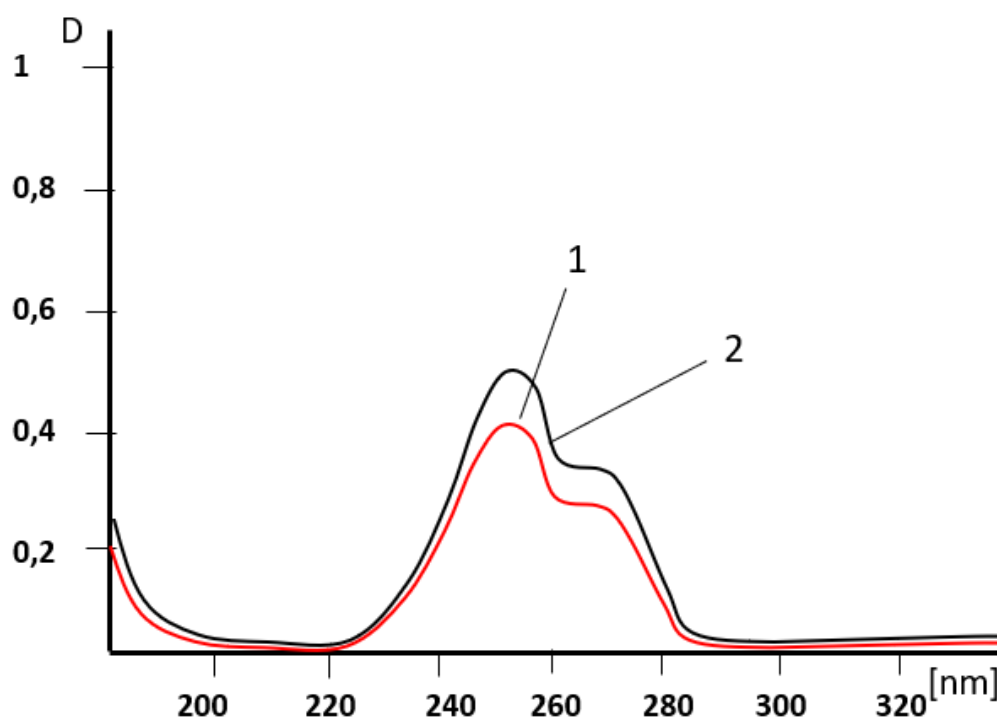


Рисунок 8 УФ- спектры поглощения испытуемого раствора (2) и PCO АЦ (1) в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты

Содержание АЦ должно быть от 0,395-0,402 г, считая на среднюю массу одной таблетки.

В таблицах 10-14 представлены результаты валидации по таким параметрам как тождественность, линейная зависимость, правильность и прецизионность.

Тождественность активных ингредиентов диспергируемых таблеток ГК, АК и АЦ подтверждалась совпадением максимумов и минимумов поглощения анализируемых образцов таковым соответствующих PCO препаратов при оптимальном подборе условий спектрофотометрирования. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по ГФ РК.

Линейная зависимость метода характеризует способность получения аналитических сигналов в виде оптической плотности, прямо пропорциональных содержанию анализируемых веществ в испытуемом

образце.

Линейность апробированных методик исследовалась на модельных смесях в интервале 70-130% от заявленного содержания глицирама, АК и АЦ в диспергируемых таблетках. Статистическая обработка результатов анализа на модельной смеси показала сохранение линейной зависимости концентрации активных ингредиентов и оптической плотности.

Уровень процента регенерации наблюдается для глицирама в пределах 99,5-100,1%; для аскорбиновой кислоты – 99,0-99,7%; для ацикловира – 99,2-100,8%.

Относительная ошибка среднего результата для активных ингредиентов находится в пределах 1,90-2,74% как указано в таблице 12, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости разработанной методики.

Таким образом, установлено, что разработанная методика для определения глицирама, АК и АЦ в препарате характеризуется корректной точностью и воспроизводимостью, линейной зависимостью в аналитической области $\pm 3\%$ по отношению к заявленному содержанию действующих веществ в диспергируемых таблетках, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества препарата.

Таблица 10 Оценка линейной зависимости методики

Препарат, С, мкг/мл	D	$E^{1\%}_{1cm}$	$E^{1\%}_{1cm}$ ср	R
Глицирам				
40	0,4050	135,4	135,5	0,9997
41	0,4312	135,2		
43	0,4645	135,8		
44	0,4901	136,4		
45	0,5412	134,8		
47	0,5702	135,2		
48	0,5981	135,7		
49	0,6276	135,3		
50	0,6542	135,6		
АК				
99	0,2845	212,7	212,2	0,9996
100	0,3312	212,6		
101	0,3775	211,4		
102	0,4325	211,9		
104	0,4826	212,0		
105	0,5402	211,8		
107	0,5841	210,9		
108	0,6312	212,6		
109	0,6875	212,6		
АЦ				
400	0,5455	323,5	324,0	0,9998
402	0,5503	324,1		
410	0,6234	323,6		
415	0,6901	324,0		

420	0,7434	324,5		
432	0,7753	323,5		
435	0,8123	324,9		
445	0,8509	325,1		
450	0,9207	323,6		

Таблица 11 Оценка правильности методики

Кол-во действующих веществ от заявленного в табл., %	Состав модельной смеси, г			Найдено (состав модел. смеси), г			Регенерация, %		
	Глицера м	АК	АЦ	Глицира м	АК	АЦ	Глицера м	АК	АЦ
70	0,028	0,070	0,280	0,0279	0,0693	0,2767	99,5	99,5	99,3
80	0,032	0,080	0,320	0,0319	0,0792	0,3182	99,8	99,4	99,5
90	0,036	0,090	0,360	0,0360	0,089	0,3583	99,6	99,0	99,2
100	0,040	0,100	0,400	0,0398	0,099	0,3989	100,1	99,3	99,0
110	0,044	0,110	0,440	0,0439	0,1089	0,4378	99,8	99,5	99,6
120	0,048	0,120	0,480	0,0479	0,1188	0,4776	99,9	99,2	100,8
130	0,052	0,130	0,520	0,0517	0,1287	0,5174	99,5	99,7	99,3

Таблица 12 Оценка прецизионности методики на модельной смеси

Найденное колич., X_i , мг	n	\bar{x}_{cp}	S	$\Delta \bar{x}_{cp}$	Pf	$\bar{x}_{cp} \pm \Delta \bar{x}_{cp}$	$\varepsilon_{cp} \%$
По глицираму 40,27 40,84 41,12 41,54 39,92 40,62 39,79 40,02 40,19	9	41,92	1,04	0,82	2,36	41,92±0,82	1,96
По АК 100,34 99,11 99,45 100,23 99,60 99,84 100,31 99,54	9	99,70	1,73	1,36	2,36	99,70 ± 1,36	2,74

100,92							
По АЦ							
399,34							
400,11							
399,45							
400,23	9	399,53	1,52	1,24	2,23	399,53 ±1,24	2,53
399,60							
399,84							
401,31							
399,54							
399,92							

Таблица 13 Оценка прецизионности методики количественного определения действующих веществ в шести сериях лекарственного препарата

Серия №	Глицирам	АК	АЦ
010363	40,27	99,34	399,34
020363	40,84	100,11	400,11
030363	41,12	99,45	399,45
040363	40,54	100,23	400,23
050363	40,92	99,61	399,60
060363	39,62	99,84	399,84
Среднее значение, мг	41,385	99,763	399,54
Расхождение, X _{max} - X _{min} , мг	2,35	2,5	2,4
Относительное расхождение, %	5,678	5,127	5,341
СКО, мг	0,83	0,964	0,765
Отн. СКО, % (CV, RSD)	2,006	0,966	0,191

Таблица 14 Оценка правильности методики количественного определения действующих веществ в шести сериях лекарственного препарата

Серия №	глицирам (мг)	АК (мг)	АЦ (мг)
010363	40,27	99,34	399,34
020363	40,84	100,11	400,11
030363	41,12	99,45	399,45
040363	41,54	100,23	400,23
050363	40,92	99,61	399,60

060363	39,62	99,84	399,84
Заложенное значение, \bar{X}_o мг/мл	40,00	100,00	400
Среднее значение, мг	41,385	99,763	399,54
δ (смещение)	1,385	1,237	1,213
δ (смещение), %	3,4625	2,473	2,245
recovery, %	103,4625	97,527	99,546

3.3 Разработка спецификации качества и стандартизация комбинированного лекарственного препарата

3.3.1 Спецификации качества комбинированного лекарственного препарата

Спецификации качества КЛП разработаны в соответствии с требованиями ГФ РК к лекарственной форме в виде диспергируемых таблеток или Приказа 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». В соответствии с Приложением 6 данного приказа для таблеток (таблетки на орального применения) включены следующие показатели:

1. Описание
2. Идентификация
3. Родственные примеси
4. Распадаемость
5. Степень диспергирования
6. Количественное определение
7. Упаковка
8. Маркировка
9. Хранение

Таблица 15 - Спецификация качества КЛП

Показатели качества	Нормы (допустимые пределы)	Ссылки на методы испытаний
Описание	Таблетки без оболочки от светло-кремового до кремового цвета со слабым характерным запахом, гигроскопичны	Визуальный метод, ФЕАЭС I том, 2.5.1.34. «Таблетки»
Идентификация	На основе химических реакций: Глицирам - Реакция пенообразования на сапонины (должна образоваться обильная и стойкая пена) - Цветная реакция с ванилином (должно произойти изменение цвета окраски раствора от желтой до красной) - Реакция щелочного гидролиза (должны выделиться пары, которые можно идентифицировать щелочной реакцией влажной лакмусовой бумаги)	ГФ РФ XIII изд. ГФ РФ XIV изд. European Pharmacopoeia 9.0, частная статья на субстанцию Аммония глицирризината

	<p>Аскорбиновая кислота - Реакция с серебра нитратом (должен выпасть темный осадок свободного серебра)</p> <p>На хроматограмме испытуемого раствора таблетки должны обнаруживаться 3 пятна на уровне 3 пятен растворов стандартных образцов веществ-свидетелей.</p>	<p>ГФ РК II том, частная статья на субстанцию Аскорбиновой кислоты</p> <p>ФЕАЭС I том, 2.1.2.26. <i>Тонкослойная хроматография</i></p>
Родственные примеси	<p>На хроматограмме испытуемого раствора пятно, соответствующее примеси А, должно быть не интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения СОВС примеси А.</p>	<p>ФЕАЭС I том, 2.1.2.26. <i>Тонкослойная хроматография</i></p>
Распадаемость	<p>16 из 18 образцов должны распасться по истечении 3 мин.</p>	<p>ФЕАЭС I том, 2 часть (2.1.9.1 <i>Распадаемость таблеток и капсул</i>)</p>
Степень диспергирования	<p>При растворении таблетки в 100 мл воды должна образоваться суспензия, проходящая через сито с номинальным размером отверстий 710 мкм</p>	<p>ФЕАЭС I том, 2.5.1.34. «Таблетки», испытания на диспергируемых таблетки</p>
Однородность единиц дозирования	<p>Допустимое значение, AV для активных ингредиентов не должно превышает максимально допустимое значение ($L < 15$).</p>	<p>ФЕАЭС I том, 2.1.9.5. <i>Однородность массы единицы дозированного лекарственного препарата</i></p>
Упаковка	<p>10 диспергируемых таблеток в блистере, заклеенном алюминиевой фольгой, вместе с инструкцией по применению на государственном и русском языках в картонной упаковке.</p>	<p>В соответствии с требованиями НД</p>
Маркировка	<p>В соответствии с требованиями ГОСТ 17768-90 Е</p>	<p>В соответствии с требованиями НД</p>
Хранение	<p>Хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C в. Хранить в недоступном для детей месте!</p>	<p>В соответствии с требованиями НД</p>
Срок хранения	<p>3 года</p>	<p>В соответствии с требованиями НД</p>
Транспортировка	<p>Транспортировка в соответствии с Приказом РК ДСМ-19.</p>	<p>В соответствии с требованиями НД</p>
Основной фармакологический эффект	<p>Противовирусный, иммуномодулирующий.</p>	<p>В соответствии с требованиями НД</p>

Описание

Диспергируемые таблетки без оболочки от светло-кремового до кремового цвета со слабым характерным запахом, гигроскопичны. При диспергировании в воде образуют гомогенную суспензию.

Идентификация

1. Реакция пенообразования на сапонины.

Методика. Около 0,5 г навески растертых диспергируемых растворяют в 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и фильтруют на бумажном фильтре. Осадок на фильтре растворяют в 10 мл 0,25% раствора гидроксида аммония и взбалтывают, образуется обильная пена.

2. Цветная реакция с ванилином.

Методика. Навеску растертых таблеток эквивалентную 0,02 г субстанции глицирама смешивают с 4 мл 0,5% раствора ванилина в концентрированной серной кислоте, при этом раствор окрашивается в желтый цвет. При добавлении к смеси воды по каплям наступает изменение интенсивности и цвета окраски раствора от желтой до красной

3. Реакция щелочного гидролиза.

Методика. Навеску растертых диспергируемых таблеток эквивалентную 0,1 г субстанции глицирама растворяют в 20 мл воды очищенной, добавляют 2 мл разбавленного раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают. При нагревании раствор выделяет пары, которые можно идентифицировать щелочной реакцией влажной лакмусовой бумаги.

4. Реакция с нитратом серебра.

Методика. Около 0,5 г навески растертых диспергируемых таблеток растворяют в 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и фильтруют на бумажном фильтре. К фильтрату добавляют 5 мл воды и прибавляют по каплям раствор аммиака и 0,5 мл раствора серебра нитрата Р2; выпадает темный осадок свободного серебра.

5. Тонкослойная хроматография.

На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при определении родственных примесей, должны обнаруживаться основные пятна глицирама, аскорбиновой кислоты и ацикловира на уровне пятен раствора сравнения СОВС глицирама, аскорбиновой кислоты и ацикловира, соответственно.

Родственные примеси

Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ФЕАЭС I том, 2.1.2.26), используя ТСХ пластинку со слоем силикагеля.

Точную навеску растертых диспергируемых таблеток (около 1 г) препарата растворяют в 10 мл метанола. Затем полученное извлечение фильтруют через фильтр (красная полоса).

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (10 мкг глицирама, 34 мкг аскорбиновой кислоты и 134 мкг ацикловира), 5 мкл (5 мкг) раствора стандартного образца вещества-свидетеля (СОВС) глицирама, 5 мкл (5 мкг) раствора СОВС аскорбиновой кислоты, 5 мкл (5 мкг) раствора СОВС ацикловира, 5 мкл (0,7 мкг) раствора СОВС примеси А, 5 мкл (0,7 мкг) разведенного раствора СОВС ацикловира, 5 мкл (2,5 мкг + 2,5 мкг) смесь растворов СО аскорбиновой кислоты и ацикловира. Пластинку сушат на воздухе в течение 10 минут, затем помещают в защищенную от света камеру со смесью растворителей этанол 90%-метилхлорид-раствор аммиака концентрированный (6:3:1). Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в токе холодного воздуха в течение 10 минут, просматривают в УФ-свете.

Примесь А. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживается пятно, соответствующее примеси А, не интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения СОВС примеси А (0,5%).

Другие примеси. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются дополнительные пятна не интенсивнее 0,7 мкг пятна на хроматограмме раствора сравнения СО ацикловира (0,5%).

Распадаемость

В соответствии с ФЕАЭС I том, 2 часть (2.1.9.1 *Распадаемость таблеток и капсул*) для диспергируемых таблеток проводят испытание на распадаемость. Определение распадаемости таблеток проводили на лабораторном идентификаторе процесса распадаемости. Для проведения испытаний отбирали 18 образцов исследуемой лекарственной формы, помещали по одному в каждую трубку корзины и помещали в сосуд с водой при температуре (от 15⁰С до 25⁰С). Включали прибор и проводили определение в течение 3 мин. Все образцы должны полностью распадаться, о чем судили по отсутствию частиц на сетке диска. Если 1 или 2 образца не распались, повторяют испытание на оставшихся 12 образцах. Не менее 16 из 18 образцов должны полностью распадаться

Анализ 18 диспергируемых таблеток лабораторных образцов КЛП показал, что 17 из 18 таблеток полностью распались в процессе эксперимента, что соответствует требованиям испытания на распадаемость диспергируемых таблеток.

Степень диспергирования - испытание для диспергируемых таблеток (ФЕАЭС I том, 2 часть).

Для проведения испытания проводили следующую методику: две таблетки помещали в колбу, содержащую 100 мл воды очищенной, и перемешивали до полного диспергирования. Должна образоваться однородная суспензия, проходящая через сито с номинальным размером отверстий 710 мкм.

Анализ двух диспергируемых таблеток показал, что полученная суспензия проходит через сито с номинальным размером отверстий 710 мкм, что соответствует требованию испытания на степень диспергирования таблеток.

Количественное определение

Количественное определение глицирама

Точную навеску растёртых диспергируемых таблеток, эквивалентную 0,04 г глицирама, растворяют в 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и фильтруют через складчатый фильтр. Осадок на фильтре промывают 5 мл того же растворителя. Фильтрат используют в количественном определении АК и АЦ, предварительно отделив их друг о друга. Осадок на фильтре переносят в мерную колбу и добавляют 10 мл 0,1М гидроксид натрия, полученный раствор фильтруют.

Фильтрат переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют одну каплю кислоты хлористоводородной концентрированной, растворяют в 30 мл 50% этилового спирта и доводят объём раствора до метки тем же спиртом (раствор А).

2 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора до метки 50% этиловым спиртом и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 258 ± 2 в кювете с толщиной слоя 10мм. В качестве раствора сравнения используют 50% этиловый спирт.

В качестве раствора сравнения использовали рабочий стандартный раствор (PCO) глицирама.

Приготовление раствора PCO глицирама. Около 0,02 г СО глицирама растворяют в мерной колбе вместимостью 25 мл в 10 мл 50 % спирта. Доводят объём раствора до метки 50 % спиртом и перемешивают, снимают спектры раствора аналогичным образом, что и раствор Б.

Содержание глицирама вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 50 \times 1 \times 50 \times b}{D_0 \times m_1 \times 50 \times 1 \times 50}$$

Где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 – оптическая плотность (PCO) глицирама;
 m_1 – масса навески препарата, в г.;
 m_0 – масса навески (PCO) глицирама, в г.;

b – средняя масса 1 таблетки, в г.

Содержание глицирама должно быть от 0,0399-0,0401 г, считая на среднюю массу одной диспергируемой таблетки.

Количественное определение аскорбиновой кислоты

К фильтрату, полученному после отделения осадка глицирама и неактивных ингредиентов, добавляют 20 мл воды очищенной, выпадает осадок АЦ. Далее фильтруют полученный раствор, осадок на фильтре промывают дополнительно водой очищенной. Фильтрат, полученный после отделения осадка АЦ, помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Б).

Измерение оптической плотности АК проводили при длине волны 243 нм в кювете толщиной 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали смесь равных частей воды очищенной и 0,1М раствор HCl (1:1).

Аналогично готовят РСО АК и измеряют его оптическую плотность.

Приготовление РСО кислоты аскорбиновой. 0,1 г СО АК помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем водой очищенной до метки (раствор В).

1,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Г).

Содержание АК определяют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 50 \times 1 \times 50 \times b}{D_0 \times m_1 \times 50 \times 1 \times 50}$$

Где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность (РСО) аскорбиновой кислоты;

m_1 - масса навески препарата, в г.;

m_0 – масса навески (РСО) аскорбиновой кислоты, в г.;

b – средняя масса 1 диспергируемой таблетки, в г.

Содержание АК должно быть от 0,099-0,102 г, считая на среднюю массу одной диспергируемой таблетки.

Методика количественного определения ацикловира в КЛП после предварительного разделения.

Количественное определение АЦ проводят согласно ГФ РК II том-2008 при длине волны 254 и 272 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Осадок на фильтре, полученный после предварительного разделения от АК, помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и растворяют в 0,1М хлороводородной кислоте, доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Б).

Измерение оптической плотности АЦ проводили при длине волны 254 и 272 нм в кювете толщиной 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали 0,1М раствор HCl. Спектры АЦ в КЛП указаны на рисунке 9.

Аналогично готовят РСО АЦ и измеряют его оптическую плотность.

Приготовление РСО ацикловира. 0,40 г СО АЦ помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор В)

1,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Г).

Содержание АЦ определяют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 50 \times 1 \times 50 \times b}{D_0 \times m_1 \times 50 \times 1 \times 50}$$

Где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность (РСО) ацикловира;

m_1 – масса навески препарата, в г.;

m_0 – масса навески (РСО) ацикловира, в г.;

b – средняя масса 1 таблетки, в г.

Содержание АЦ должно быть от 0,399-0,402 г, считая на среднюю массу одной таблетки.

Однородность дозированных единиц:

В каждой из 10 единиц лекарственной формы определяют количественное содержание действующего вещества, используя подходящий аналитический метод. Затем рассчитывают допустимое значение по формуле:

$$AV = |M - \bar{X}| + ks$$

Допустимое значение, AV для ГК не превышает максимально допустимое значение ($L < 15$).

$$AV_1 = 105,135 - 101,5 + 2,4 * 1,069 = 1,0694$$

Допустимое значение, AV для АК не превышает максимально допустимое значение ($L < 15$).

$$AV_2 = 2,4 * 1,92 = 4,608$$

Допустимое значение, AV для АЦ не превышает максимально допустимое значение ($L < 15$).

$$AV_3=2,4*1,72=4,152$$

3.3.2 Изучение стабильности и установление срока годности.

С целью прогнозирования срока годности КЛП была исследована его стабильность с помощью метода «ускоренного старения» при повышенной температуре [67].

Пять серий лабораторных образцов КЛП хранили в термостате при температуре 60°C в течение 69 суток. Испытуемые образцы поместили в склянки из темного стекла с притертыми пробками. Контроль качества проводили через временные промежутки (11,5 дней), эквивалентные 6 месяцам хранения в естественных условиях. Основными параметрами показателя качества при хранении, согласно правилам проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств [98] были:

1. Описание
2. Средняя масса одной таблетки
3. Однородность массы
4. Примеси
5. Количественное содержание

Результаты проведенного эксперимента (Таблица 15) показали, что препарат остается стабильным в течение 69 суток экспериментального хранения, что соответствует 1104 суткам хранения в естественных условиях, рассчитанных по

правилу Вант-Гоффа: $C=A \frac{t_э-t_{xp}}{10} = 2^{\frac{60-20}{10}} = 16$ – коэффициент соответствия.

Отсюда срок годности $16 \times 69 = 1104$ суток, что составляет 3 года.

Температура хранения, позволяющая обеспечить установленный срок годности, составляет:

$$t_{xp} = t_э + \frac{10}{\lg A} \times \lg \frac{C_э}{C} = 60 + \frac{10}{\lg 2} \times \lg \frac{69}{1104} = 20 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Максимально допустимая температура хранения равна:

$$t_{\text{макс. доп.}} = 20 \text{ } ^\circ\text{C} + \frac{10}{\lg A} \times \frac{C_э}{2 \times 365} = 20 + \frac{10}{\lg 2} \times \lg \frac{1104}{730} = 26 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Таким образом, в результате проведенных исследований методом «ускоренного старения» установлен срок годности и температурный режим хранения препарата.

Таблица 16 - Показатели качества препарата в процессе хранения методом «ускоренного старения»

Показатели качества	По спецификации	Серии				
		010363	020363	030363	040363	050363
Описание диспергируемых таблеток	таблетки кремового цвета	таблетки кремового цвета	таблетки кремового цвета	таблетки кремового цвета	таблетки кремового цвета	таблетки кремового цвета
Средняя масса одной таблетки	1,5032	1,5054	1,5067	1,5101	1,5034	1,4991
Однородность массы, %	не более $\pm 7,5$ %	+3,2 - 4,8	+3,3 -4,2	+ 2,0 - 4,3	+3,5 -4,7	+3,7 -5,1
Примеси, %	не более 1%	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Количественное содержание, г \pm %						
Глицирам	0,0390-0,0401	0,0401 \pm 1,6	0,0390 \pm 1,5	0,0399 \pm 1,6	0,0401 \pm 1,5	0,0401 \pm 1,6
АК	0,0995-0,102	0,0989 \pm 2,1	0,0997 \pm 2,1	0,0995 \pm 2,1	0,1017 \pm 2,1	0,1019 \pm 2,1
АЦ	0,3995-0,4023	0,3998 \pm 1,1	0,3997 \pm 1,2	0,4022 \pm 2,1	0,4017 \pm 2,2	0,3999 \pm 2,1

Выводы к главе 3

1. Впервые разработана методика тонкослойной хроматографии для идентификации и определения посторонних примесей комбинированной лекарственной композиции в виде диспергируемых таблеток, содержащей глицирам, аскорбиновую кислоту и ацикловир. Проведена валидация разработанной методики
2. Разработана методика количественного определения глицирама, аскорбиновой кислоты и ацикловира при их совместном присутствии в КЛП в виде диспергируемых таблеток. Валидность методики доказана по таким параметрам как, правильность, прецизионность и линейная зависимость.
3. Определены основные показатели качества КЛП. Проведены испытания на распадаемость, диспергируемость и однородность дозированных единиц.
4. Изучена стабильность препарата методом «ускоренного старения», установлен срок годности препарата - 3 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведено информационно-аналитическое исследование комбинированных лекарственных препаратов и биологических активных добавок корня солодки.
2. Проведен сравнительный анализ стандартизации сырья и комбинированных лекарственных препаратов корня солодки по фармакопеям ведущих стран мира и другим литературным источникам.
3. Обоснован выбор методов анализа комбинированного лекарственного препарата, содержащего глицирам, аскорбиновую кислоту и ацикловир в виде диспергируемых таблеток.
4. Разработаны методики идентификации активных ингредиентов КЛП при их совместном присутствии с помощью химических реакций.
5. Разработана методика тонкослойной хроматографии для идентификации активных ингредиентов КЛП и их примесей. Валидность разработанной методики подтверждена по таким характеристикам как специфичность, робастность и прецизионность. Относительная погрешность разработанной методики составила $\pm 2,4\%$, что говорит о высокой воспроизводимости при многократном повторении эксперимента.
6. Разработана методика количественного определения глицирама, аскорбиновой кислоты и ацикловира при их совместном присутствии в лекарственной композиции. Валидация методики проведена по таким характеристикам как, правильность, прецизионность и линейная зависимость. Проведена статистическая обработка полученных результатов. Относительная ошибка среднего результата для активных ингредиентов находится в пределах 1,90-2,74%, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости разработанной методики.
7. Изучена стабильность препарата в процессе хранения методом «ускоренного старения», установлен срок хранения препарата.
8. Определены основные показатели качества. Разработана спецификация качества комбинированного лекарственного препарата. Изготовлены и проанализированы лабораторные образцы препарата, показатели качества которых, сопоставимы с показателями качества разработанной спецификации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sk Abdul Amin, Tarun Jha, Fight against novel coronavirus: A perspective of medicinal chemists , European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112559>
2. R. Khalilov, M. Hosainzadegan, A. Eftekhari, A. Nasibova, A. Hasanzadeh, H. Hosainzadegan, NECESSITY OF DIFFERENT COUNTRIES TO DEAL WITH SIMILAR PHENOMENA OF COVID-19 CORONAVIRUS, Adv. Biol. Earth Sci., 2020, 5, 5-6.
3. R. Khalilov, M. Hosainzadegan, A. Eftekhari, A. Nasibova, A. Hasanzadeh, P. Vahedi, H. Hosainzadegan, OVERVIEW OF THE ENVIRONMENTAL DISTRIBUTION, RESISTANCE, MORTALITY, AND GENETIC DIVERSITY OF NEW CORONAVIRUS (COVID-19): REVIEW, Adv. Biol. Earth Sci., 2020, 5, 7-12.
4. A. Eftekhari, M. Alipour, L. Chodari, S. Dizaj Maleki, M.R. Ardalan, M. Samiei, S. Sharifi, S. Zununi Vahed, I. Huseynova, R. Khalilov, E. Ahmadian, A Comprehensive Review of Detection Methods for SARS-CoV-2, Microorganisms., 2021, 9, 232. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020232>
5. A.E. Al-Snafi. Glycyrrhiza glabra: a phytochemical and pharmacological review J. Pharm., 8 (2018), pp. 1-17
6. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Балтина (мл.) Л.А., Плясунова О.А., Покровский А.Г., Толстиков Г.А. Перспективы создания новых противовирусных препаратов на основе глицирризиновой кислоты и ее производных (обзор) - Химико-фарм. журнал 2009, 43, 10, 3-12
7. С.Н. Hsu, К.С. Hwang, С.Л. Chao, S.G. Chang, M.S. Ho, P. Chou. Can herbal medicine assist against avian flu? Learning from the experience of using supplementary treatment with Chinese medicine on SARS or SARS-like infectious disease in 2003/ J. Altern. Complement. Med., 12 (2006), pp. 505-506
8. Y. Yang, M.S. Islam, J. Wang, Y. Li, X. Chen. Traditional Chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): a review and perspective. Int. J. Biol. Sci., 16 (2020), pp. 1708-1717.

9. L. Ang, H.W. Lee, J.Y. Choi, J. Zhang, M. Soo. Lee. Herbal medicine and pattern identification for treating COVID-19: a rapid review of guidelines. *Integr. Med. Res.*, 9 (2020), Article 100407
10. J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, H.W. Doerr. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet N. Am. Ed.*, 361 (2003), pp. 2045-2046
11. Yuying Zhu, Jiaruo Xu, Guangtao Yao, Pei Zhang, Mengge Wang, Yongfang Zhao, Guoqiang Lin, Hongzhuan Chen, Lili Chen, Jiange Zhang. Glycyrrhizic acid exerts inhibitory activity against the spike protein of SARS-CoV-2. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153364> Get rights and content
12. Kim, J., Joo, I., Kim, H., and Han, Y. (2013). 18 β -glycyrrhetic Acid Induces Immunological Adjuvant Activity of Th1 against candida Albicans Surface Mannan Extract. *Phytomedicine* 20 (11), 951–955. doi:10.1016/j.phymed.2013.04.008
13. Арыстанова Т.А., Омари А.М. – «Перспективы создания лекарственных средств на основе природного адаптогена в комплексной терапии вирусных инфекций» // Журнал «Фармация Казахстана» декабрь, №6 (239), 2021 года. – С.21-27.
14. H. Rashidzadeh, H. Danafar, H. Rahimi, F. Mozafari, M. Salehiabar, M.A. Rahmati, S. Rahamooz-Haghighi, N. Mousazadeh, A. Mohammadi, Y.N. Ertas, A. Ramazani, I. Huseynova, R. Khalilov, S. Davaran, T.J. Webster, T. Kavetskyu, A. Eftekhari, H. Nosrati, M. Mirsaedi, Nanotechnology against the novel coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2): diagnosis, treatment, therapy and future perspectives, *Nanomedicine*, 2021, 16, 497- 516. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0441>
15. Z.F. Wang, J. Liu, Y.A. Yang, H.L. Zhu, *Curr. Med. Chem.*, A Review: The Anti-inflammatory, Anticancer and Antibacterial Properties of Four Kinds of Licorice Flavonoids Isolated from Licorice, 2020, 27, 1997-2011. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181001104550>.
16. Z.F. Wang, J. Liu, Y.A. Yang, H.L. Zhu, *Curr. Med. Chem.*, A Review: The Anti-inflammatory, Anticancer and Antibacterial Properties of Four Kinds of Licorice Flavonoids Isolated from Licorice, 2020, 27, 1997-2011. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181001104550>.
17. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, H.W. Doerr, Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus, *Lancet*, 2003, 361, 2045–2046. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13615-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13615-X).
18. T. Utsunomiya, M. Kobayashi, R.B. Pollard, F. Suzuki, Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, 41, 551–556. <https://doi.org/10.1128/aac.41.3.551>
19. Y.J. Kwon, D.H. Son, T.H. Chung, Y.J. Lee, J. A Review of the Pharmacological Efficacy and Safety of Licorice Root from Corroborative

- Clinical Trial Findings, *Med. Food*, 2020, 23, 12-20.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4459>
20. Kim, J., Joo, I., Kim, H., and Han, Y. (2013). 18 β -glycyrrhetic Acid Induces Immunological Adjuvant Activity of Th1 against candida Albicans Surface Mannan Extract. *Phytomedicine* 20 (11), 951–955. doi:10.1016/j.phymed.2013.04.008
 21. А. И. Файрушина, Л. А. Балтина-мл., Л. А. Балтина, Н. И. Коновалова, П. А. Петрова, М. Ю. Еропкин. Синтез и противовирусная активность новых конъюгатов глицирризиновой кислоты с эфирами D-аминокислот. *Российский журнал биорганической химии*, 2017, с. 456-462.
 22. Kobayashi, J., and Murata, I. (2020). Nitric Oxide Inhalation as an Interventional rescue Therapy for Covid-19-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann. Intensive Care* 10 (1), 61. doi:10.1186/s13613-020-00681-9
 23. Martel, J., Ko, Y. F., Young, J. D., and Ojcius, D. M. (2020). Could Nasal Nitric Oxide Help to Mitigate the Severity of Covid-19? *Microbes Infect.* 22 (4-5), 168–171. doi:10.1016/j.micinf.2020.05.002
 24. Yi, H., Nakashima, I., and Isobe, K. (2012). Enhancement of Nitric Oxide Production from Activated Macrophages by Glycyrrhizin. *Am. J. Chin. Med.* 24 (3-4), 271–278. doi:10.1142/s0192415x96000335
 25. K. Chen, R. Yang, F.Q. Shen, H.L. Zhu, Advances in Pharmacological Activities and Mechanisms of Glycyrrhizic Acid *Curr. Med. Chem.*, 2020, 27, 6219-6243. <https://doi.org/10.2174/0929867325666191011115407>
 26. J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, H.W. Doerr, Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus, *Lancet*, 2003, 361, 2045–2046. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13615-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13615-X).
 27. Номер патента: RU 2568849 С9. Авторы: Балтина Л.А., Балтина Л.А. мл., Зарубаев В.В., Киселев О.И. 2015 г.
 28. Г. Хувер, Л. Балтина, М. Михаэлис, Р. Кондратенко, Л. Балтина, Г. А. Толстикова, Х. В. Дорр, Дж. Чинатл, J. Противовирусная активность производных глицирризиновой кислоты в отношении SARS-коронавируса, *Med Chem*, 2005, 48, 1256-1259. <https://doi.org/10.1021/jm0493008>
 29. Van Rossum T.G.J., Vulto A.G., De Man R.A., Brouwer J.T., Schalam S.W. 1998. Review article: Glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 12: P.199–205.
 30. Fujisawa K., Watanabe Y., Kimura K. Therapeutic approach to chronic active hepatitis with glycyrrhizin // *Asian Med J.* -1990. -Vol.23. -P.745-756.
 31. Старокожко Л.Е., Муравьев И.А., Хаджиева З.Д. Пенные лекарственные формы с препаратами корня солодки // *Фармация.* -1992. -№5. -С.60-61.
 32. Н. Добрецов. Об основных результатах научных исследований со ран в 2003 году и некоторых проблемах реструктуризации отделения // *Наука в Сибири.* - N 17-18 (2453-2454) 14 мая 2004 г.

33. Толстиков Г.А., Муринов Ю.И., Балтина Л.А. и др. Комплексы глицирризиновой кислоты с НПВС как новые лекарственные формы и их фармакологические свойства // В кн.: Изучение и использование солодки в народном хозяйстве СССР.- Алматы: Ғылым, 1991.- С.158-159.
34. А.С. СССР 15666996. Комплексное соединение 1-фенил-2,3-диметил-4-метиламинопиразолин-5-метансульфонат натрия с глицирризиновой кислотой, проявляющее противовоспалительную и анальгезирующую активность. / Балтина Л.А., Шарипова Ф.В., Толстикова Т.Г., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н., Толстиков Г.А., Бондарев А.И.; опубл. бюлл. изобр.-1991.-№17.-С.22.-РЖХимия.-1992.-21О 105П.
35. Бондарев А.И., Башкатов С.А., Давыдова В.А. и др. Противовоспалительная и анальгезирующая активность комплексов антифлогистиков с глицирризиновой кислотой // Хим.-фарм. журн.-1991.- Т.54, №5.-С.47-50.
36. А.С. СССР 1616925. Комплексное соединение индометацина с глицирризиновой кислотой, проявляющее противовоспалительную активность. / Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Насыров Х.М., Зарудий Ф.С., Муринов Ю.И., Толстиков Г.А.; опубл. бюлл. изобр.-1991.-№17.-С.22.-РЖ Химия.-1992.-21О 106П.
37. Душкин А.В., Карнатовская Л.М., Чабуева Е.Н. и др. Получение и исследование ulcerогенной активности быстрорастворимых ТДС на основе ацетилсалициловой кислоты и биологически активных соединений солодки // Хим.-фарм. журн.-2001.-Т.35, №11.- С.21-23.
38. Толстиков Г.А., Мышкин В.А., Балтина Л.А. и др. Комплексы глицирризиновой кислоты с урацилом – новый класс антидотных и антирадикальных средств / В кн.: Изучение и использование солодки в народном хозяйстве СССР. – Алматы: Ғылым, 1991. – С.159-160.
39. Ito M, Sato A, Hirabayashi K et al. 1988. Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Res* 10: P. 289–298.
40. Патент РФ №2088232, МПК А61К 31/70, опубл. 27.08.97
41. Т. Г. Толстикова, А. Г. Толстиков. Сладость скифского корня. ЛИЦОМ К ПРИРОДЕ, 17-ое изд. 2007, с. 53-62.
42. Л. А. Балтина, М. Кондратенко, Р. Мустафина, Б. Флехтер, И. Муринов, А. Давыдова, С. Зарудия, Исмагилова, Толстиков Г.А. Синтез глицирризовой кислоты из глициррама и фармациологическая характеристика продукта. *January 2001. Pharmaceutical Chemistry Journal* 35(1):40-44. DOI:10.1023/A:1010454810888
43. Арчаков А.И., Сельцовский А.П., Лисов В.И., Цыганов Д.И., Княжев В.А., Ипатова О.М., Торховская Т.И. Фосфоглив: механизм действия и эффективность применения в клинике. *Вопросы медицинской химии*, 2002, с.139-153.
44. Farese Jr R. V. et al. Licorice-induced hypermineralocorticoidism // *New England Journal of Medicine*. – 1991. – Т. 325. – №. 17. – С. 1223-1227.

45. Помазанов Г.В., Королева Ю.В., Гонсалес А. Биологически активный препарат «Виусид» в лечебной и восстановительной медицине инфекционных заболеваний // Тез. докл. 1-го междунар. конгр. «Восстановительная медицина и реабилитация 2004». – М., 2004. – С. 260–261.
46. Utsunomiya T., Kobayashi M., Pollard R.B. et al. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus.// *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1997. – V. 41(3). – P.551-556. 241
47. Охотникова, В. Ф., Ю. Ю. Мичник, and Т. А. Сокольская. "Глэсол"-новый комплексный препарат из лекарственного растительного сырья." Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. –2005. С.–133-134.
48. Охотникова, В. Ф., Ю. Ю. Мичник, and Т. А. Сокольская. "Глэсол"-новый комплексный препарат из лекарственного растительного сырья." Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. –2005. С.–133-134.
49. Y.J. Kwon, D.H. Son, T.H. Chung, Y.J. Lee, J. A Review of the Pharmacological Efficacy and Safety of Licorice Root from Corroborative Clinical Trial Findings, *Med. Food*, 2020, 23, 12-20.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4459>
50. Государственная Фармакопея Республики Казахстан, том II. – 2008. – 653 с.
51. Номер предварительного патента: 12339,2002. Авторы: Арыстанова Айгуль Жалгаскалиевна, Байдулин Серик Амангельдинович, Югай Наталья Валентиновна, Арыстанова Танагуль Акимбаевна.
52. Джусипов А.К., Арыстанова А.Ж. Перспективные направления современной патогенетической терапии ревматизма //Центрально-Азиатский медицинский журнал. – 2003. Т.9. - №2-3. –С. 147-160
53. Даирбеков О.Д., Арыстанова Т.А., Ирисметов М.П., Ордабаева С.К., Шукирбекова А.Б//Международная научно-практическая конференция «Индустриально-инновационное развитие Республики Казахстан: опыт, задачи и перспективы». –2004. –С. 288-292
54. Инновационный патент № 14072. Авторы: Джиембаев Булат Жазкенович, Северова Елена Анатолиевна, Ирисметов Махмуджан Пайзахметович, Поминова Наталья Михайловна, Абдикалиев Нурлан Абдикалиевич, Курманбекова Гульнара Жумабековна
55. Предварительный патент №19670. Авторы: Арыстанова Т.А., Ирисметов М.П., Джиембаев Б. Ж., Шукирбекова А.Б.
56. Предварительный патент № 20371. Авторы: Арыстанова Т.А., Ирисметов М.П., Джиембаев Б. Ж., Шукирбекова А.Б.
57. Предварительный патент №20370. Авторы: Арыстанова Т.А., Шукирбекова А.Б.

58. Предварительный патент №21614 Авторы: Арыстанова Т.А., Шукирбекова А.Б.
59. Sun ZG, Zhao TT, Lu N, et al. Research progress of glycyrrhizic acid on antiviral activity // *Mini Rev Med Chem.* – 2019.–№19. –P.826–32. DOI:10.2174/1389557519666190119111125
60. Wintergerst, E.S.; Maggini, S.; Hornig, D.H. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions // *Ann. Nutr. Metab.* – 2006– P. 85–94.
61. Ang, A.; Pullar, J.M.; Currie, M.J.; Vissers, M.C.M. Vitamin C and immune cell function in inflammation and cancer // *Biochem. Soc. Trans.* – 2018, – № 46. – P. 1147–1159.
62. Реестр клинических исследований: официальный сайт. – США. – URL: <https://clinicaltrials.gov> (идентификатор: NCT04264533). – Текст: электронный.
63. Carr, A.C.; Maggini, S. Vitamin C and Immune Function // *Nutrients* – 2018. – №9. – P.1211
64. Li, R., Wu, K., Li, Y., Liang, X., Lai, K. P., & Chen, J. (2021). Integrative pharmacological mechanism of vitamin C combined with glycyrrhizic acid against COVID-19: findings of bioinformatics analyses // *Briefings in bioinformatics*, №22(2). – P. 1161-1174.
65. Fowler AA, 3rd, Truwit JD, Hite RD, et al. Effect of vitamin C infusion on organ failure and biomarkers of inflammation and vascular injury in patients with sepsis and severe acute respiratory failure: the CITRIS-ALI randomized clinical trial // *JAMA.* – 2019. – №322(13). – P.1261–70.
66. Гемеджиева, Н., Хроков, А., Херал. Э., Тимошина // *А. Traffic. Оценка возможностей и угроз торговли корнем дикой солодки в Казахстане. 2021.*
67. Государственная Фармакопея РФ XIII изд. [официальный сайт] URL: <http://www.femb.ru/feml>. Москва, 2018.
68. Государственная Фармакопея Республики Беларусь 2016 г. Т.2
69. *European Pharmacopoeia 9th edition: Liquorice root - Liquiritiae radix 01/2010: 0277 (under minor revision).*
70. *Pharmacopoeia of the people's republic of China. Vol.1, 2005. P.207-2009.*
71. *Pharmacopoeia – National Form USP 47-NF. P.2263-4.*
72. *The Japanese Pharmacopoeia, 17th edition. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan Part 2, 2002. P.932-933.*
73. *Great Britain. Medicines Commission, and General Medical Council (Great Britain). British pharmacopoeia. General Medical Council, P. 1864.*
74. Tehen N. et al. DNA barcoding of medicinal plant material for identification // *Current opinion in Biotechnology.* – 2014. – Т. 25. – С. 103-110.
75. Rauchensteiner, F.; Matsumura, Y.; Yamamoto, Y.; Yamaji, S.; Tani, T. Analysis and comparison of Radix Glycyrrhizae (licorice) from Europe and China by capillary-zone electrophoresis (CZE). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 38, 594–600.

76. De Boer, H. J.; Ichim, M. C.; Newmaster, S. G. DNA barcoding and pharmacovigilance of herbal medicines. *Drug Saf.* 2015, 38, 611–620.
77. Simmler, C.; Anderson, J. R.; Gauthier, L.; Lankin, D. C.; McAlpine, J. B.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F. Metabolite profiling and classification of DNA-authenticated licorice botanicals. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 2007–2022.
78. Farag, M. A.; Porzel, A.; Wessjohann, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry* 2012, 76, 60–72.
79. Tao, W.; Duan, J.; Zhao, R.; Li, X.; Yan, H.; Li, J.; Guo, S.; Yang, N.; Tang, Y. Comparison of three officinal Chinese pharmacopoeia species of *Glycyrrhiza* based on separation and quantification of triterpene saponins and chemometrics analysis. *Food Chem.* 2013, 141, 1681–1689.
80. Xie J. et al. Identification and simultaneous determination of glycyrrhizin, formononetin, glycyrrhetic acid, liquiritin, isoliquiritigenin, and licochalcone A in licorice by LC-MS/MS // *Acta Chromatographica*. – 2014. – Т. 26. – №. 3. – С. 507-516.
81. Kondo K. et al. Constituent properties of licorices derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* identified by genetic information // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2007. – Т. 30. – №. 7. – С. 1271-1277.
82. Liao W. C. et al. Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components // *Food chemistry*. – 2012. – Т. 132. – №. 4. – С. 2188-2193.
83. Simmler C. et al. Species-specific standardisation of licorice by metabolomic profiling of flavanones and chalcones // *Phytochemical Analysis*. – 2014. – Т. 25. – №. 4. – С. 378-388.
84. Zhou S. et al. Simultaneous Determination of Five Bioactive Components in *Radix Glycyrrhizae* by Pressurised Liquid Extraction Combined with UPLC–PDA and UPLC/ESI–QTOF–MS Confirmation // *Phytochemical Analysis*. – 2013. – Т. 24. – №. 6. – С. 527-533.
85. Wei S. S. et al. Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbitrap mass spectrometry analyses // *Chin. J. Nat. Med.* – 2015. – Т. 13. – С. 232-240.
86. Habib A. A. M., El-Sebakhy N. A., Kadry H. A. New and simple methylene blue colorimetric assay for glycyrrhizin in pharmaceuticals // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1979. – Т. 68. – №. 10. – С. 1221-1223.
87. Ahmadi F., Rezaee S., Alipour S. Formulation and evaluation of an Aloe vera-Licorice combination topical gel: a potential choice for wound healing // *Trends in Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Т. 3. – №. 2. – С. 105-112.
88. Егоров М.В. Стандартизация сырья и препаратов солодки: дис.... канд. фарм. наук:15.00.02 / Егоров Максим Валерьевич. – Пермь, 2005. – 145 с.
89. Халед Ш. М. Состав и свойства биологически активных веществ шрота *Glycyrrhizae radices* : дис. – Халед Шади Мунир.–Казань, 2017.–150 с.: ил, 2017.

90. Gupta S. et al. Chromolithic method development, validation and system suitability analysis of ultra-sound assisted extraction of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* //Natural product communications. – 2012. – Т. 7. – №. 8. – С. 1934578X1200700808.
91. Yarnykh T. G., Garkavtseva O. A., Chushenko V. N. Development and standardization of dermalic ointment //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – Т. 45. – №. 12. – С. 750-753
92. Yarnykh T., Rukhmakova O. The aspects of development and standardization of children's suppositories with extract of licorice root //Technology transfer: innovative solutions in medicine. – 2018. – С. 49-51.
93. Kumbhalkar B. et al. Simultaneous identification and estimation of glycyrrhizin, glabridin, and 18 β -glycyrrhetic acid in de-glycyrrhized Ayurvedic lipid-based formulation of *Glycyrrhiza glabra* using dual wavelength reverse phase-high-performance liquid chromatography //Separation Science Plus. – 2020. – Т. 3. – №. 10. – С. 460-471.
94. Государственная Фармакопея Республики Казахстан I том, 2008г.
95. Фармакопея ЕАЭС, том I, часть 1, 2020г., часть 2, 2022 г.
96. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1). ICH harmonised tripartite guideline / International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005. – 17 p.
97. Planar Chromatography. A retrospective view for the third millennium / Editor Sz. Nyiredy. – Budakalasz, Hungary : Springer, 2001. – 614 p.
98. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств»: приказ МЗ РК от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПРОЕКТ НОРМАТИВНОГО ДОКУМЕНТА

Форма 2

УТВЕРЖДЕН		СОГЛАСОВАН		
_____		_____		
наименование	организации-производителя	наименование	государственной	экспертной
_____	_____	_____	_____	_____
должность	подпись	ФИО (при наличии)	организации в сфере	обращения лекарственных
"__" "	_____	_____	средств и	медицинских
_____	_____	_____	_____	изделий)
М.П.	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата: *Глицавир*

на казахском языке: *Глицавир*

на русском языке: *Глицавир*

Лекарственная форма: Диспергируемые таблетки, № 10

Дозировка:

Активные ингредиенты:

Глицирам – 0,04 г

аскорбиновая кислота – 0,1 г

ацикловир – 0,4 г.

Неактивные ингредиенты:

микrokристаллическая целлюлоза – 0,5 г

лактоза моногидрат – 0,1 г

крахмал кукурузный – 0,1 г

повидон К30 – 0,012 г

натрия стеарилфумарат – 0,011 г

кремния диоксид – 0,05 г.

Наименование и страна организации-производителя:

Наименование и страна держателя регистрационного удостоверения:

Наименование и страна организации-упаковщика:

Номер нормативного документа:

Срок введения установлен с

Вводится впервые « ___ » _____ 20 __ г.

или взамен (категория и номер)

Срок действия до « ___ » _____ 20 __ г.

Спецификация качества

Описание: диспергируемые таблетки от светло-кремового до кремового цвета со слабым характерным запахом. При диспергировании в воде образуют гомогенную суспензию.

Идентификация:

А. Около 0,5 г (точная навеска) препарата растворяют в 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и фильтруют на бумажном фильтре. Осадок на фильтре растворяют в 10 мл 0,25% раствора гидроксида аммония и взбалтывают, образуется обильная пена.

С. Навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 0,1 г аскорбиновой кислоте растворяют в 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и фильтруют на бумажном фильтре. Фильтрат растворяют в 5 мл воды и прибавляют по каплям раствор аммиака и 0,5 мл раствора серебра нитрата Р2; выпадает темный осадок свободного серебра.

Д. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при определении родственных примесей, должны обнаруживаться основные пятна глицирама, аскорбиновой кислоты и ацикловира на уровне пятен растворов стандартных образцов веществ-свидетелей глицирама, аскорбиновой кислоты и ацикловира, соответственно.

Родственные примеси:

Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ФЕАЭС I том, 2.1.2.26.), используя ТСХ пластинку со слоем силикагеля.

Точную навеску растертых диспергируемых таблеток (около 1 г) препарата растворяют в 10 мл метанола. Затем полученное извлечение фильтруют через фильтр (красная полоса).

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (10 мкг глицирама, 34 мкг аскорбиновой кислоты и 134 мкг ацикловира), 5 мкл (5 мкг) раствора стандартного образца вещества-свидетеля (СОВС) глицирама, 5 мкл (5 мкг) раствора СОВС аскорбиновой кислоты, 5 мкл (5 мкг) раствора СОВС ацикловира, 5 мкл (0,7 мкг) раствора СОВС примеси А, 5 мкл (0,7 мкг) разведенного раствора СОВС ацикловира, 5 мкл (2,5 мкг + 2,5 мкг) смесь растворов СО аскорбиновой кислоты и ацикловира.

Пластинку сушат на воздухе в течение 10 минут, затем помещают в защищенную от света камеру со смесью растворителей этанол 90%-метилхлорид-раствор аммиака концентрированный (6:3:1). Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в токе холодного воздуха в течение 10 минут, просматривают в УФ-свете.

Примесь А. На хроматограмме испытуемого раствора пятно, соответствующее примеси А, должно быть не интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения СОВС примеси А (0,5%).

Другие примеси. На хроматограмме испытуемого раствора дополнительные пятна должны быть не интенсивнее 0,7 мкг пятна на хроматограмме раствора СО ацикловира (0,5%).

Распадаемость: В соответствии с ФЕАЭС I том, 2 часть (2.1.9.1)

Степень диспергирования: В соответствии с ФЕАЭС I том (2.5.1.34).

Количественное определение:

Количественное определение глицирама

Точную навеску растёртых диспергируемых таблеток, эквивалентную 0,04 г глицирама, растворяют в 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и фильтруют через складчатый фильтр. Осадок на фильтре промывают 5 мл того же растворителя. Фильтрат используют в количественном определении аскорбиновой кислоты и ацикловира, предварительно отделив их друг о друга. Осадок на фильтре переносят в мерную колбу и добавляют 10 мл 0,1М гидроксид натрия, полученный раствор фильтруют.

Фильтрат переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют одну каплю кислоты хлористоводородной концентрированной, растворяют в 30 мл 50% этилового спирта и доводят объём раствора до метки тем же спиртом (раствор А).

2 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора до метки 50% этиловым спиртом и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 258 ± 2 в кювете с толщиной слоя 10мм. В качестве раствора сравнения используют 50% этиловый спирт.

В качестве раствора сравнения использовали рабочий стандартный раствор (РСО) глицирама.

Приготовление раствора РСО глицирама. Около 0,02 г СО глицирама растворяют в мерной колбе вместимостью 25 мл в 10 мл 50 % спирта. Доводят объем раствора до метки 50 % спиртом и перемешивают, снимают спектры раствора аналогичным образом, что и раствор Б.

Содержание глицирама должно быть от 0,0399-0,0401 г, считая на среднюю массу одной диспергируемой таблетки.

Количественное определение аскорбиновой кислоты

К фильтрату, полученному после отделения осадка глицирама и неактивных ингредиентов, добавляют 20 мл воды очищенной, выпадает осадок ацикловира. Далее фильтруют полученный раствор, осадок на фильтре промывают дополнительно водой очищенной. Фильтрат, полученный после отделения осадка ацикловира, помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Б).

Измерение оптической плотности аскорбиновой кислоты проводили при длине волны 243 нм в кювете толщиной 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали смесь равных частей воды очищенной и 0,1М раствор HCl (1:1).

Аналогично готовят РСО аскорбиновой кислоты и измеряют его оптическую плотность.

Приготовление РСО кислоты аскорбиновой. 0,1 г СО аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем водой очищенной до метки (раствор В).

1,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Г).

Содержание аскорбиновой кислоты должно быть от 0,099-0,102 г, считая на среднюю массу одной диспергируемой таблетки.

Методика количественного определения ацикловира в КЛП после предварительного разделения.

Количественное определение ацикловира проводят согласно ГФ РК II том-2008 при длине волны 254 и 272 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Осадок на фильтре, полученный после предварительного разделения от аскорбиновой кислоты, помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и растворяют в 0,1М хлороводородной кислоте, доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор А).

1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Б).

Измерение оптической плотности ацикловира проводили при длине волны 254 и 272 нм в кювете толщиной 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали 0,1М раствор HCl.

Аналогично готовят РСО ацикловира и измеряют его оптическую плотность.

Приготовление РСО ацикловира. 0,40 г СО ацикловира помещают в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор В)

1,0 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки (раствор Г).

Содержание ацикловира должно быть от 0,399-0,402 г, считая на среднюю массу одной таблетки.

Однородность дозированных единиц: В соответствии с ФЕАЭС I том, (2.1.9.5).

Упаковка:

10 диспергируемых таблеток в блистере, заклеенном алюминиевой фольгой, вместе с инструкцией по применению на государственном и русском языках в картонной упаковке.

Хранение:

Хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°С в. Срок годности – 3 года. Хранить в недоступном для детей месте!