

На правах рукописи

Ножкина Наталия Николаевна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ
ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦЕТИЛПИРИДИНИЯ ХЛОРИД**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент

Дворская Оксана Николаевна

Официальные оппоненты:

Кобелева Татьяна Алексеевна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Тюменский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой химии и фармакогнозии.

Квачахия Лексо Лорилович – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<https://samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В целях перехода на инновационную модель развития отечественного производства и в соответствии с государственной программой РФ «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» (постановление Правительства РФ № 305 от 15 апреля 2014 г., в ред. от 29.12. 2021 г. № 2544) и «Стратегией лекарственного обеспечения населения РФ на период до 2025 года» (приказ Минздрава РФ № 66 от 13.02.2013, в ред. от 13.07.2021 г.) актуальным является импортозамещение и увеличение доли лекарственных средств российского производителя на внутреннем рынке страны. Разработка и производство на территории РФ доступных, качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств для профилактики и лечения заболеваний является одной из первоочередных направлений фармацевтической отрасли.

Необходимым этапом при создании новых лекарственных средств является разработка методик контроля их качества, основанных на современных физико-химических методах анализа, и создание нормативных документов на лекарственные средства, согласно которым будет осуществляться надлежащий фармацевтический контроль их качества (Голованенко А. Л. и др., 2012).

На сегодняшний день по данным официальной статистики ВОЗ в структуре стоматологических заболеваний одно из ведущих мест занимают воспалительные заболевания пародонта. В терапии воспалительных заболеваний пародонта предпочтение отдается местному действию лекарственных средств в виде аппликаций лекарственных пленок (Сампиев А.М. и др., 2016). Поэтому актуальным является разработка и проведение контроля качества местных лекарственных форм, сочетающих компоненты с антимикробным и антиоксидантным действием, что позволит оказывать комплексное воздействие (Ушаков Р.В., Царев В.Н. и др., 2015).

Необходимым этапом при создании новых лекарственных средств является разработка методик контроля их качества. Одним из универсальных и современных методов фармакопейного анализа фармацевтических субстанций, а также лекарственных препаратов, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющий одновременно проводить определение подлинности и количественного содержания действующих веществ (Abdelwahab N.S. et al., 2016; Леонов К.А. и др., 2018).

Степень разработанности темы

Вопросам создания, стандартизации, разработки и валидации методик контроля качества стоматологических лекарственных форм местного действия в виде лекарственных пленок (ЛПл) посвящены работы ряда авторов (Мизина П.Г. и др., 2000; Опарин С.В., 2006; Блинова О.А., 2009; Лосенкова С.О. и др., 2012; Жезняковская Л.Ф. и др., 2012; Голованенко А.Л. и др., 2012; Алексеева И.В. и др., 2013; Саушкина А.С. и др., 2013; Маринина Т.Ф. и др., 2014; Ушаков Р. В., Царев А. Р. и др., 2015).

Однако, комбинированные составы на основе янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида (ЦПХ), в виде лекарственных пленок для лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта, до настоящего времени не являлись объектами научных исследований.

В литературных источниках отсутствуют данные о совместном определении янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида хроматографическими методами, что и предопределило выбор темы, цели и задач диссертационного исследования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является разработка методик контроля качества новой стоматологической лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Для реализации поставленной цели требовалось решение следующих задач:

1. Определить оптимальные условия разделения янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида при совместном присутствии методом тонкослойной хроматографии. Разработать методику качественной оценки янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида при совместном присутствии в лекарственной пленке методом тонкослойной хроматографии.

2. Определить оптимальные условия разделения сильно отличающихся по полярности веществ, янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида, при их совместном присутствии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработать методику совместного качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в лекарственной пленке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

3. Провести валидационную оценку методики совместного качественного и количественного определения янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в лекарственной пленке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

4. Определить показатели качества и критерии их приемлемости для обоснования состава, определения стабильности, сроков годности и оценки качества новой стоматологической лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, с использованием разработанных методик анализа. Разработать методики определения основных показателей качества исследуемой лекарственной пленки, произвести оценку опытных серий лекарственной пленки.

5. Провести исследование антиоксидантного и антимикробного действия модельных образцов разработанной лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, в модельных тест-системах в условиях *in vitro*.

6. Разработать проект Фармакопейной статьи на лекарственную пленку, содержащую янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Научная новизна

Определены оптимальные условия разделения янтарной кислоты и цетилпиридиния методом тонкослойной хроматографии. Впервые разработана методика качественной оценки янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида при совместном присутствии в лекарственной пленке методом тонкослойной хроматографии.

Определены оптимальные условия разделения сильно отличающихся по полярности веществ, янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Впервые разработана методика совместного качественного и количественного определения янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в лекарственной пленке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведена валидационная оценка разработанной методики.

В результате проведенных экспериментальных исследований обоснованы показатели качества, методики их оценки и критерии приемлемости новой стоматологической лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, и определены сроки ее хранения.

Разработан нормативный документ - проект Фармакопейной статьи на лекарственную пленку, содержащую янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

В условиях *in vitro* доказано, что полученная лекарственная пленка обладает антимикробным и антиоксидантным действием.

Научная новизна данного диссертационного исследования подтверждена патентом РФ на изобретение № 2617238 «Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиния хлоридом местного действия» (Приложение 1).

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость исследования заключается в обосновании и разработке методических подходов к стандартизации лекарственных пленок.

Впервые определены условия разделения и разработаны методики совместного хроматографического определения янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в составе лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Полученные экспериментальные данные изучения антимикробного и антиоксидантного действия модельных образцов лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, подтверждают возможность применения цетилпиридиния хлорида и янтарной кислоты в составе лекарственных пленок в терапии воспалительных заболеваний пародонта.

На основании проведенного исследования разработан проект Фармакопейной статьи на лекарственную пленку, содержащую янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования базируется на изучении и систематизации литературных данных по теме диссертации; оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан дизайн исследования.

Методологический подход реализован в процессе выполнения комплекса теоретических, физико-химических и биологических исследований.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием методов математической статистики, валидационная оценка проведена в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты разработки методики качественной оценки янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида при совместном присутствии в лекарственной пленке методом тонкослойной хроматографии.

2. Результаты разработки и валидационной оценки методики совместного качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в лекарственной пленке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

3. Результаты валидационной оценки методики совместного качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в лекарственной пленке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

4. Показатели качества, методики проведения и критерии приемлемости для обоснования состава, определения стабильности, сроков годности и оценки качества новой стоматологической лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, с использованием разработанных методик анализа.

5. Результаты оценки антиоксидантного и антимикробного действия модельных образцов лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, в модельных тест-системах в условиях *in vitro*.

6. Проект Фармакопейной статьи на лекарственную пленку, содержащую янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается физико-химическими и биологическими методами анализа. Экспериментальные исследования проводились современными информативными методами в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд., результаты исследований статистически значимы, воспроизводимы и однозначны.

Основные положения диссертации представлены: на Днях науки в Челябинской области (Челябинск, 2021); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», (Самара, 2021); конференции «Биохимия в медицинской практике» (Москва, 2019); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы» (Тюмень, 2019); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики» (Уфа, 2016); Международном научном конгрессе, посвященном 100-летию Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (Пермь, 2016); VII международной (XIV итоговой) научно-практической конференции молодых ученых (Челябинск, 2016); VI международной (XIII итоговой) научно-практической конференции молодых ученых, посвященная 70-летию Победы (Челябинск, 2015); научно-практической конференции, посвященной 70-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета (Челябинск, 2014).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, а также в практическую деятельность ООО НПФ «Материя Медика Холдинг», ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании и осуществлении всех этапов диссертационной работы: выборе объектов исследования, постановке целей и задач, разработке плана исследований; лично проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме; выполнен комплекс экспериментальных исследований в области стандартизации лекарственной формы.

Получение и интерпретацию результатов исследований антимикробной и антиокислительной активности, микробной обсемененности осуществляли совместно с сотрудниками лабораторий НИИ иммунологии и лабораторий ЦНИЛ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем как лично, так и в соавторстве.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, в рамках инициативной комплексной темы «Разработка технологии и стандартизация суппозиторий, гранул и мазей на основе современных высокомолекулярных соединений, содержащих продукты синтетического и природного происхождения», номер государственной регистрации 01201354266.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 2 – Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств; и пункту 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки Российской Федерации; получен 1 патент РФ на изобретение № 2617238 «Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиния хлоридом местного действия».

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит следующие основные разделы: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, главы экспериментальных исследований, общие выводы, список использованной литературы и приложения, содержащие документы, подтверждающие практическую значимость полученных результатов. Работа изложена на 161 странице печатного текста, содержит 38 таблиц и 23 рисунка. Список использованной литературы включает 153 литературных источников, в том числе 61 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для проведения экспериментальной части исследования использовали вспомогательные вещества, реактивы, индикаторы, растворители, соответствующие по показателям качества требованиям ГФ РФ IV изд., а также современные фармакопейные методы анализа.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Разработка методики совместного качественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в лекарственной пленке методом ТСХ

На первом этапе исследования была изучена подвижность янтарной кислоты в растворителях с различной полярностью, был составлен ряд подвижности янтарной кислоты на сорбенте – силикагеле. На основании полученных данных подобрана бинарная система растворителей: этилацетат – этиловый спирт, рассчитана элюирующая способность данной системы при разном соотношении более полярного растворителя – этилового спирта, а также определена подвижности янтарной кислоты в системе растворителей этилацетат – этиловый спирт путем хроматографирования, детектор – 0,1% спиртовой раствор метилового красного.

Из теоретических расчетов элюирующей способности бинарной системы следует, что введение более полярного растворителя – этилового спирта (до 20%) вызывает сначала резкое

увеличение элюирующей способности исследуемой системы растворителей, однако последующее возрастание его концентрации практически не изменяет свойств системы, носит асимптотический характер (рисунок 1). Крутизна начального подъема экспоненциальной кривой тем больше, чем больше различия в полярности обоих растворителей.

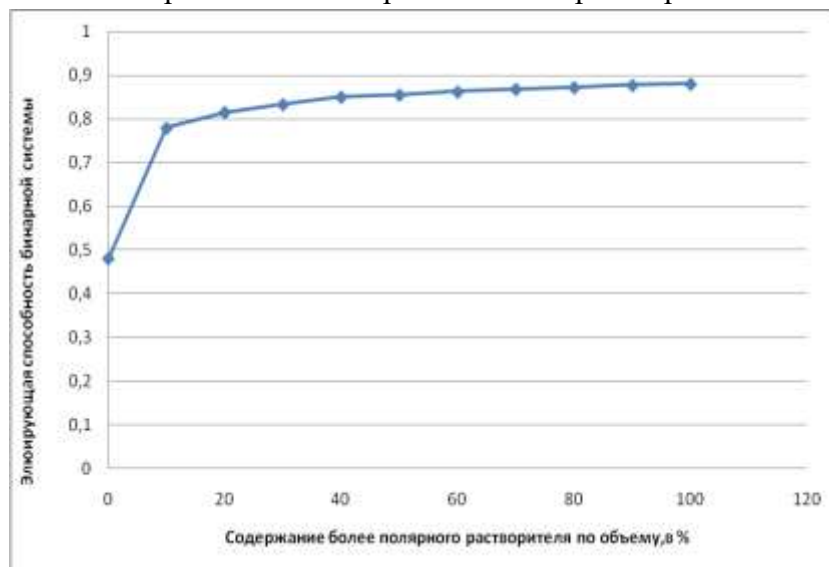


Рисунок 1 – Зависимость фактора удерживания (R_f) янтарной кислоты в бинарной системе растворителей этилацетат : этиловый спирт от содержания этилового спирта

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований системой растворителей для оценки подлинности янтарной кислоты является бинарная система этилацетат : этиловый спирт (80:20).

Поскольку перед нами стояла задача разработать методику определения подлинности янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, то на следующем этапе было проведено хроматографирование раствора ЦПХ в подобранных выше условиях, детектирование проводили раствором Драгендорфа, поскольку раствор метилового красного не эффективен для обнаружения ЦПХ. На хроматограмме наблюдали появление желто-оранжевой зоны адсорбции на линии старта ($R_f=0$), поэтому в систему был добавлен третий компонент – раствор аммиака концентрированный, применяемый в составе элюирующих систем при определении четвертичных аммониевых солей методом ТСХ. Приемлемой системой растворителей является: этилацетат: этиловый спирт: раствор аммиака концентрированный (80:20:20). Дальнейшее увеличение концентрации раствора аммиака не приводит к значительному увеличению коэффициента подвижности.

При выборе детектора из группы сульфоталеиновых индикаторов для одновременной идентификации янтарной кислоты и ЦПХ, было установлено, что при детектировании 1% спиртовым раствором бромфенолового синего на хроматограмме были получены две зоны адсорбции, резко отличающиеся по цвету: светло-желтая (янтарная кислота) и темно-синяя (ЦПХ).

Для оценки подлинности янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл было проведено хроматографирование спиртового извлечения из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, а также спиртовых растворов ЦПХ и янтарной кислоты в подобранной системе растворителей. Для идентификации янтарной кислоты в ЛПл, в которых она находится в виде сукцината, было предложено предварительно выдерживать ЛПл в камере, насыщенной парами концентрированной хлористоводородной кислоты. Результаты хроматографического определения показывают, что в данных условиях происходит полное разделение действующих

веществ ЛПл, и зоны адсорбции янтарной кислоты и ЦПХ по величине и интенсивности совпадают с зонами адсорбции соответствующих образцов сравнения. При хроматографировании пленки «плацебо», не содержащей действующих веществ, не было обнаружено зон адсорбции, соответствующих зонам адсорбции янтарной кислоты или ЦПХ.

На основании проведенных исследований была разработана методика качественной оценки янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в лекарственной пленке, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ТСХ, которая может быть внесена в проект нормативной документации на данную ЛФ в раздел «Подлинность, метод ТСХ».

Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ

При выборе состава подвижной фазы и способа элюирования учитывали физико-химические свойства разделяемых компонентов: янтарная кислота является гидрофильным соединением и слабо удерживается на колонке с обращенно-фазным сорбентом. Гидрофобный характер ЦПХ, связанный с наличием в структуре молекулы углеводородной цепи, обуславливает его сильное сродство к неподвижной фазе.

В качестве элюента была выбрана смесь ацетонитрила и 0,1 % водного раствора фосфорной кислоты. Выбор «кислого» элюента связан с необходимостью перевода янтарной кислоты в неионизированную форму, что способствует ее лучшему удерживанию на обращенно-фазном сорбенте. Установлено, что удовлетворительную симметрию хроматографического пика обеспечивает подвижная фаза состава 0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2 при скорости потока 1 мл/мин (рисунок 2).

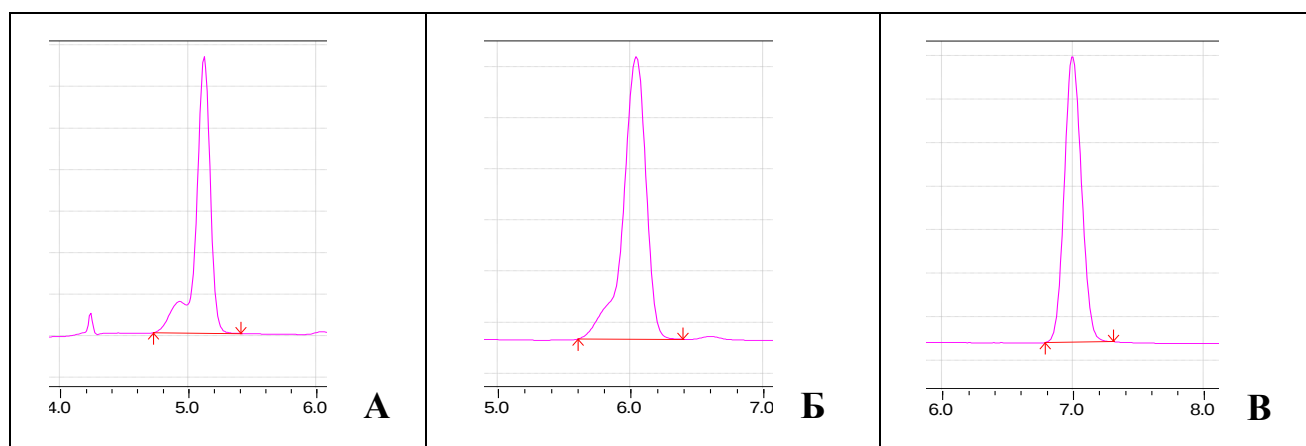


Рисунок 2 – Хроматограммы раствора янтарной кислоты (125 мкг/мл) при использовании подвижной фазы с содержанием ацетонитрила: 5% (А), 3% (Б) и 2% (В)

При выборе длины волны детектирования было установлено, что янтарная кислота не имеет выраженных максимумов поглощения, максимальная абсорбция излучения наблюдается в диапазоне длин волн от 200 нм до 210 нм, в УФ-спектре ЦПХ наблюдаются два максимума поглощения при 214 нм и 258 нм. Учитывая значительное поглощение обоих соединений при 210 нм, данная длина волны была выбрана в качестве общей волны детектирования (рисунок 3).

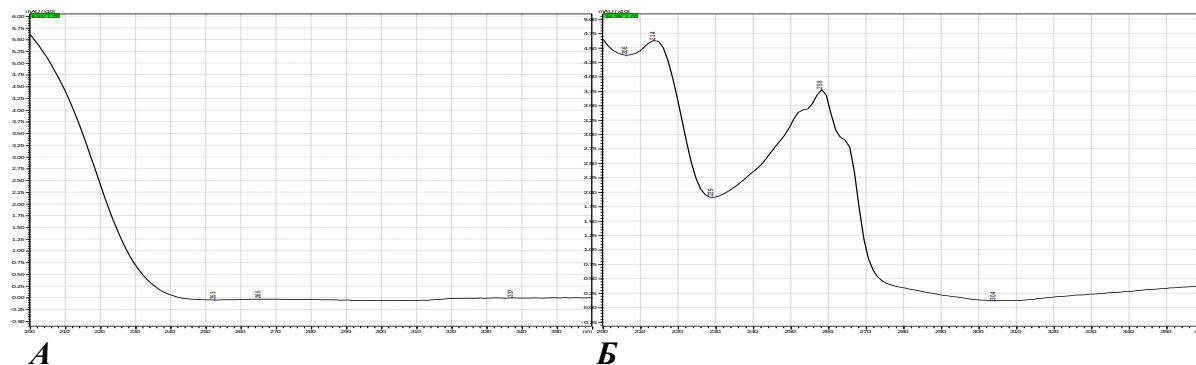


Рисунок 3 – УФ-спектры янтарной кислоты (А) и ЦПХ (Б)

Поскольку действующие компоненты ЛПл имеют значительные различия по полярности, для их совместного определения был применен способ градиентного элюирования. Для достижения приемлемого коэффициента удерживания янтарной кислоты потребовалось начальное элюирование в течение 8 минут с использованием подвижной фазы с минимальной долей ацетонитрила (2%), затем для элюирования гидрофобного ЦПХ линейно увеличивали долю ацетонитрила с 2% до 85% за 10 минут. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура 30° С. В данных условиях янтарная кислота и ЦПХ элюировались в виде симметричных пиков со временами удерживания 7,37 мин и 15,67 мин, соответственно (рисунок 4).

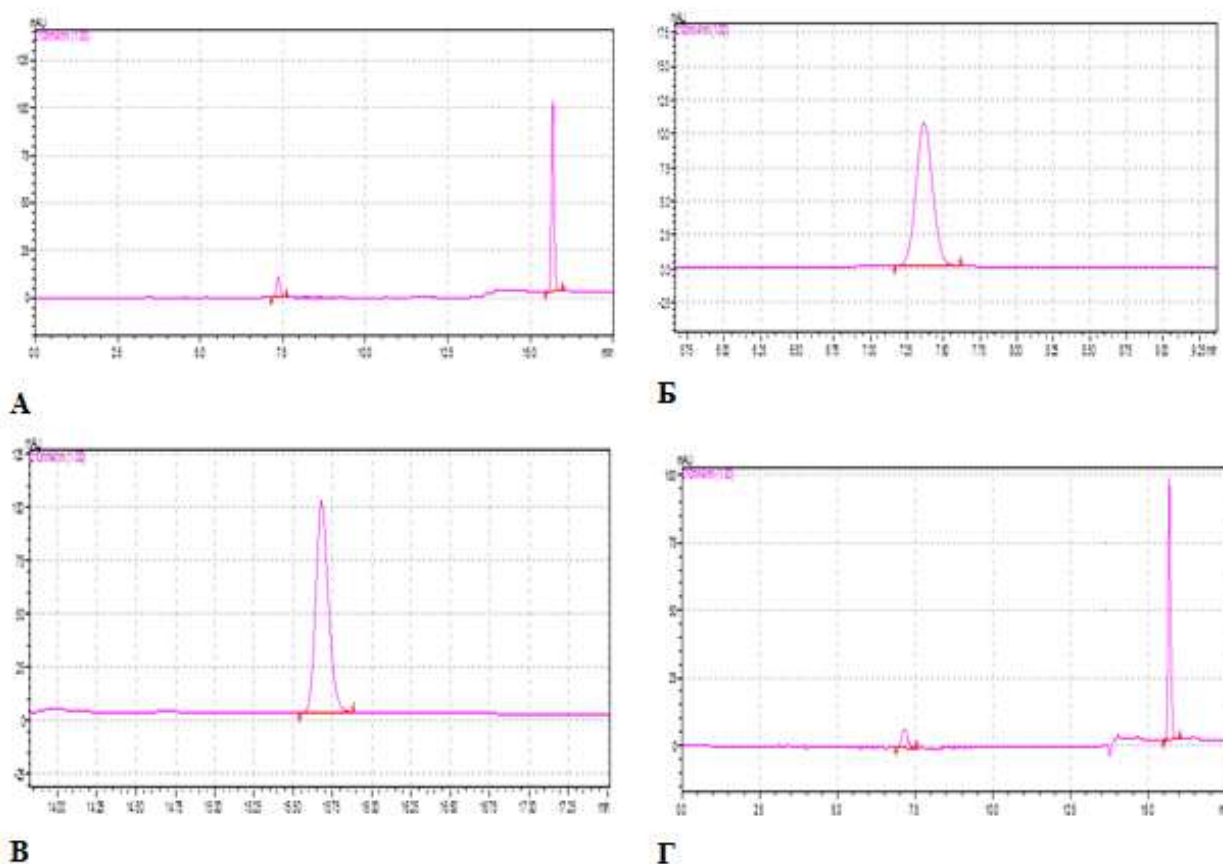


Рисунок 4 – Хроматограмма стандартного раствора, содержащего янтарную кислоту и ЦПХ (А); хроматографические пики янтарной кислоты (Б) и ЦПХ (В); хроматограмма испытуемого раствора лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

В результате проведенных исследований нами были определены оптимальные условия хроматографирования янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в лекарственной пленке, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ВЭЖХ. Основные хроматографические параметры разработанной методики: элюент: 0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2. Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин: температура термостата хроматографической колонки – 30° С; общая аналитическая длина волны – 210 нм. Время удерживания янтарной кислоты – 7,37 мин, ЦПХ – 15,67 мин.

Пригодность хроматографической системы.

Для оценки разрешающей способности и воспроизводимости хроматографической системы были проведены соответствующие тесты с использованием стандартного раствора янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида с концентрациями 125 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно. После пятикратного инжектирования раствора для каждого соединения были определены следующие параметры пригодности хроматографической системы: время удерживания и площадь пика янтарной кислоты и ЦПХ, коэффициент (фактор) асимметрии пика, эффективность колонки (число теоретических тарелок, ТТ), коэффициент разрешения. Средние значения данных параметров, а также значения относительного стандартного отклонения (RSD,%) представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры пригодности хроматографической системы при определении янтарной кислоты и ЦПХ методом ВЭЖХ

Параметры	Янтарная кислота	ЦПХ
Время удерживания, мин	X _{ср.} 7,37	X _{ср.} 15,67
	RSD,% 0,05	RSD,% 0,06
Площадь хроматографического пика	X _{ср.} 77440	X _{ср.} 500792
	RSD,% 0,14	RSD,% 0,05
Коэффициент асимметрии пика	1,15	1,28
Эффективность колонки, ТТ	4913	139611
Коэффициент разрешения	38,30	

Полученные значения величины коэффициента (фактора) асимметрии пика, как для янтарной кислоты, так и для ЦПХ не превышают 1,5; соблюдаются требования к разделительной способности хроматографической системы (коэффициент разрешения между пиками равен 38,30). Число теоретических тарелок, определяющее эффективность колонки, удовлетворяет требованиям эффективности хроматографической системы.

Значения относительного стандартного отклонения времени удерживания (оценка подлинности) и площади хроматографического пика (количественная оценка содержания вещества) янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида не превышают 1,0%, что удовлетворяет требованиям воспроизводимости.

Полученные результаты хроматографических определений свидетельствуют о пригодности хроматографической системы разработанной методики ВЭЖХ и надлежащем функционировании подобранной хроматографической системы, которая обеспечивает предъявляемые к ней требования.

Валидационную оценку разработанной методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл проводили согласно требованиям ГФ РФ XIV изд. по показателям: специфичность, пригодность хроматографической системы, линейность результатов и аналитическая область методики, правильность и прецизионность.

Определение специфичности методики.

На хроматограммах, полученных после кратных инъекций растворителя, раствора пленки «плацебо» (раствор из лекарственной пленки, не содержащей янтарную кислоту и ЦПХ) отсутствовали пики, имеющие одинаковые времена удерживания с пиками янтарной кислоты и ЦПХ соответствующих растворов стандартных образцов. Условия ВЭЖХ являются специфичными и могут использоваться для одновременного качественного и количественного определения действующих компонентов изучаемой лекарственной формы.

Определение линейности методики.

Линейность методики была исследована для янтарной кислоты и ЦПХ в диапазоне от 70% до 130% от номинальной концентрации исследуемых соединений в испытуемом растворе.

Уравнения линейной зависимости полученных калибровочных графиков имели вид: $S = 612,91 \times C$ (для янтарной кислоты) и $S = 9855,28 \times C$ (для ЦПХ), где S – площадь хроматографического пика, C – концентрация вещества в растворе.

Коэффициенты корреляции составили 0,9995 и 0,9998 для янтарной кислоты и ЦПХ, соответственно, что соответствует критериям валидации.

Правильность разработанной хроматографической методики определяли путём анализа модельных смесей на основе растворов из лекарственной пленки «плацебо», в которые вводили известные количества янтарной кислоты и ЦПХ (таблицы 2 – 3).

Таблица 2 – Результаты количественного определения янтарной кислоты в модельных растворах ЛПл методом ВЭЖХ

№ модельного раствора	Навеска янтарной кислоты, г	Номинальная концентрация янтарной кислоты в модельном растворе, мкг/мл	Площадь пика янтарной кислоты в модельном растворе (среднее из 3 определений)	Рассчитанная концентрация янтарной кислоты, мкг/мл
1	0,12534	100,27	61318	99,50
2	0,12704	101,63	61946	100,52
3	0,12748	101,98	62193	100,92
4	0,15603	124,82	77137	125,17
5	0,15881	127,05	78443	127,29
6	0,15748	125,98	77704	126,09
7	0,19149	153,19	94848	153,91
8	0,18930	151,44	93801	152,21
9	0,18608	148,86	92174	149,57
Навеска янтарной кислоты для приготовления стандартного раствора: 0,07946 г				
Площадь пика янтарной кислоты в стандартном растворе (среднее 3 определений): 78351				

Таблица 3 – Результаты количественного определения ЦПХ в модельных растворах ЛПл методом ВЭЖХ

№ модельного раствора	Навеска ЦПХ, г	Номинальная концентрация ЦПХ в модельном растворе, мкг/мл	Площадь пика ЦПХ в модельном растворе (среднее из 3 определений)	Рассчитанная концентрация ЦПХ, мкг/мл
1	0,05136	41,09	405556	41,12
2	0,05026	40,21	397271	40,28
3	0,05064	40,51	400822	40,64
4	0,06423	51,38	502112	50,91
5	0,06235	49,88	490277	49,71
6	0,06379	51,03	503887	51,09
7	0,07773	62,18	608629	61,71
8	0,07565	60,52	590482	59,87
9	0,07588	60,70	597485	60,58
Навеска ЦПХ для приготовления стандартного раствора: 0,06531 г Площадь пика ЦПХ в стандартном растворе (среднее 3 определений): 515328				

Оценку *правильности* методики проводили путем расчета процента открываемости (R,%) известных добавленных количеств веществ янтарной кислоты и ЦПХ (отношение рассчитанной концентрации к номинальной концентрации вещества в модельном растворе, в %). Рассчитывали соответствующие метрологические характеристики – стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD,%), доверительный интервал среднего значения результата определения (ΔX).

Статистическая обработка результатов количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в модельных смесях представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Статистическая обработка результатов количественного анализа янтарной кислоты и ЦПХ в модельных смесях при определении правильности методики

Вещество	Метрологические характеристики открываемости, R,% (P = 0,95; n = 9)			
	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
Янтарная кислота	99,90	0,67	0,67	0,52
ЦПХ	99,71	0,51	0,51	0,40

Истинные значения концентраций янтарной кислоты и ЦПХ в приготовленных растворах находятся внутри доверительных интервалов средних результатов их анализа. Рассчитанные значения критерия Стьюдента (0,45 – для янтарной кислоты, 1,71 – для ЦПХ) не превышают табличного значения (2,31), следовательно, результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии методом ВЭЖХ-анализа не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность разработанной методики оценивали путем исследования сходимости результатов количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ, получаемых одним аналитиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня, и внутрилабораторной воспроизводимости результатов, получаемых двумя аналитиками на одном и том же оборудовании в разные дни (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты оценки прецизионности (сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости) методики количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ВЭЖХ

Рассчитанное содержание янтарной кислоты, мг		Рассчитанное содержание ЦПХ, мг	
Результаты 1 аналитика	Результаты 2 аналитика	Результаты 1 аналитика	Результаты 2 аналитика
$\bar{X}$ 2,45	$\bar{X}$ 2,46	$\bar{X}$ 1,07	$\bar{X}$ 1,08
SD 0,02	SD 0,03	SD 0,02	SD 0,01
RSD 0,82	RSD 1,22	RSD 1,87	RSD 0,93
Дисперсия (S^2) 0,0004	Дисперсия (S^2) 0,0009	Дисперсия (S^2) 0,0004	Дисперсия (S^2) 0,0001
Критерий Фишера 2,25		Критерий Фишера 4,00	

Результаты проведенного исследования показали, что относительные стандартные отклонения среднего результата определения каждого из аналитиков не превышают 2%, при определении янтарной кислоты – 1,22 % и 1,87 % при определении ЦПХ, что свидетельствует о прецизионности методики на уровне сходимости. Расчетные значения критерия Фишера меньше табличного значения 5,05 ($P=0,95$, $n=6$) при количественном определении и янтарной кислоты и ЦПХ, что подтверждает статистическую незначимость между результатами анализа двух аналитиков.

Результаты разработки и валидации ВЭЖХ-методики качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, свидетельствуют о ее пригодности, методика может быть внесена в проект нормативной документации на данную ЛФ в разделы «Подлинность, метод ВЭЖХ» и «Количественное содержание».

НОРМИРОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ

Обоснование состава лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Выбор фармакологически активных веществ ЛПл произведен на основании анализа этиологии воспалительных заболеваний пародонта: в качестве антимикробного компонента был введен ЦПХ; в качестве компонента для коррекции процессов свободно-радикального окисления в тканях пародонта – янтарная кислота. При обосновании состава ЛПл исходили из того, что действующие вещества в ее составе должны обеспечивать эффективное высвобождение комплекса действующих веществ; не обладать токсичностью и раздражающим действием. В доступной литературе нет четко определенных предельно допустимых разовых или суточных доз ЦПХ и янтарной кислоты. На основании научно-патентного поиска было установлено, что содержание ЦПХ в составе таблеток для рассасывания или пастилок составляет 1,0 мг, поэтому данную концентрацию ЦПХ вводили в одну единицу ЛПл. Концентрация янтарной кислоты была выбрана с учетом размеров ЛФ, растворимости вещества, и составила 2,5 мг в единичной пленке.

С целью выявления возможного физико-химического влияния янтарной кислоты на противомикробные свойства ЦПХ была изучена антимикробная активность ЦПХ в присутствии янтарной кислоты (в соотношении 1:2,5) методом серийных разведений в жидких питательных

средах. Было установлено, что янтарная кислота не влияет на активность ЦПХ относительно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, но на уровне низких концентраций ($1 \cdot 10^{-7}$ г/мл и менее) ЦПХ не активен в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. На всех уровнях концентраций раствора отмечали наличие фунгицидного действия относительно дрожжеподобных грибов *Candida albicans*.

Эмпирическим путем был подобран пленкообразователь для основы ЛПл – 5% раствор желатина и пластификатор глицерин, в данную композицию вводили ЦПХ и янтарную кислоту в соотношении 1:2,5. Особое значение при разработке ЛПл представляет показатель pH, его значение должно быть физиологически приемлемым для слюны и слизистых оболочек полости рта (6,4 – 7,2). Лекарственная пленка была стабилизирована по величине pH, путем замены $\frac{1}{2}$ части воды очищенной, необходимой на растворение янтарной кислоты на 1% раствор натрия гидрокарбоната. В данной композиции отмечается достаточная адсорбционная способность пленочной основы и оптимальная осмотическая активность.

Высвобождение из ЛПл действующих веществ в воду очищенную оценивали методом диализа с кондуктометрическим контролем, измеряя значение электропроводности раствора через определенные промежутки времени. Из полученных профилей высвобождения следует, что действующие вещества высвобождаются из пленочной основы постепенно.

Исследование высвобождения действующих веществ из ЛФ проведено в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», растворитель – среда растворения, имитирующая слюну. Количественное определение содержания янтарной кислоты и ЦПХ проводили методом ВЭЖХ по разработанной методике. Степень высвобождения действующих веществ из модельных образцов ЛПл в среду, имитирующую слюну, соответствует требованиям ГФ РФ XIV изд.

В результате проведенного исследования был обоснован состав ЛПл: желатин – 0,04; глицерин – 0,04; ЦПХ – 0,001; янтарной кислоты – 0,0025; раствор NaHCO_3 1% – 0,4; воды очищенной – 0,4 (в пересчете на 1 пленку, в г). Заявленный состав позволяет стабилизировать лекарственную форму по величине pH и способствует максимальному высвобождению действующих веществ, исключается возможность неточного дозирования действующих веществ и контаминации микроорганизмами.

На ЛПл получен патент РФ № 2617238 «Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиний хлоридом местного действия».

ЛПл представляет собой однородную гомогенную прозрачную эластичную пленку, со слабым характерным запахом, без механических включений. Единичная пленка прямоугольной формы, размер $10 \times 20 \pm 0,2$ мм, толщина $0,28 \pm 0,4$ мм.

Установление показателей качества ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

На следующем этапе исследования было проведено комплексное исследование по установлению перечня показателей качества ЛПл, методов и методик их определения, а также критериев приемлемости, с помощью которых была произведена оценка качества модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ. Для данных целей было приготовлено три опытных серии по 100 штук ЛПл в каждой.

Полученные образцы ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с требованиями действующей нормативной документации, оценивали по следующим показателям качества: описание; размеры лекарственной пленки; значение pH; потеря в массе при высушивании; подлинность (альтернативные методики ТСХ и ВЭЖХ-анализа); однородность дозирования действующих веществ, растворение, микробиологическая чистота, однородность массы (средняя масса); количественное определение действующих веществ. Все

три опытные серии модельных образцов ЛПл соответствовали критериям приемлемости.

В оценке качества ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, по критериям «Подлинность», «Однородность дозирования действующих веществ», «Растворение», «Количественное определение действующих веществ» были использованы разработанные хроматографические методики ТСХ и ВЭЖХ совместного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл (таблица 6).

Таблица 6 – Показатели качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид

Показатель	Метод контроля	Критерии приемлемости
Описание	Визуальный	Однородные, эластичные, бесцветные, прозрачные пластины со слабым характерным запахом, не содержащих механических включений
Размер	Инструментальный, с помощью микрометра	Пластины прямоугольной формы 10x20±0,2 мм, толщина 0,28 ± 0,4 мм
Подлинность	1. ОФС 1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография», ГФ XIV изд. 2. ОФС 1.2.1.2.0003.15, «ВЭЖХ», ГФ XIV изд.	Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности окраски и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме соответствующего раствора образца сравнения. Совпадение времен удерживания действующих веществ на хроматограммах из лекарственных пленок со временем удерживания образца сравнения янтарной кислоты и ЦПХ, соответственно.
Однородность массы	ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм», ГФ XIV изд.	Значение отклонения от средней массы должно быть в пределах не более ±7,5%.
Растворение	ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых лекарственных форм», ГФ XIV изд.	Для каждой испытуемой единицы не менее 80% от заявленного содержания янтарной кислоты и ЦПХ
Потеря в массе при высушивании	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XIV изд., способ 1.	Не более 5%
pH	Потенциометрический ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», метод 3, ГФ XIV изд.	6,8 - 7,2
Однородность дозирования	ОФС.1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования», ГФ XIV изд., способ 1	Первый показатель приемлемости не более 15%
Количественное определение	ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ XIV изд.	- содержание янтарной кислоты: не менее 90,0% и не более 110,0% от заявленного количества; - содержание ЦПХ: не менее 85,0% и не более 115,0% от заявленного количества.
Микробиологическая чистота	ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», ГФ XIV изд., категория 2	Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10 ² КОЕ в 1 г препарата; общее число дрожжевых и плесневых грибов не более 10 ¹ КОЕ в 1 г препарата; отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,

	<i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г препарата.
Упаковка	- по 10 штук в безъячейковый блистер; - по 3 блистера в пачке вместе с инструкцией по применению помещают в картонную коробку. (В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0025.18 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ГФ XIV изд.)
Маркировка	В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0025.18 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ГФ XIV изд.
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре не выше +15 °С
Срок годности	2 года

На основании результатов проведенных исследований был разработан проект фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка на десну, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид».

Исследование стабильности модельных образцов ЛПл в процессе хранения

Определение сроков годности ЛПл проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств». Исследование осуществляли методом долгосрочных испытаний на протяжении 30 месяцев (2,5 года) в сухом, защищенном от света месте при температуре 8-15° С. Для проведения испытания были наработаны 3 серии препарата, каждые 6 месяцев проводили отбор проб, которые подвергались испытаниям в соответствии с установленными показателями качества.

Установлено, что микробиологическая чистота, физико-химические показатели ЛПл, а также количественное содержание действующих веществ в модельных образцах ЛПл, в процессе естественного хранения метода долгосрочных испытаний соответствовали нормам качества. Следовательно, срок годности ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, составляет не менее 2 лет.

ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКРОБНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ

При скрининговом исследовании *антимикробного действия* модельных образцов ЛПл относительно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* методом диффузии в агар установлено, что ЛПл активна в отношении изучаемых микроорганизмов, ЦПХ хорошо диффундирует из нее; антимикробное действие ЦПХ в составе модельных образцов ЛПл, практически не уменьшается в сравнении с субстанцией ЦПХ.

Дальнейшие исследования *антимикробного действия* методом серийных разведений в жидких питательных средах показали, что во всех разведениях происходит угнетение жизнедеятельности исследуемых микроорганизмов. Максимальное антимикробное действие наблюдалось в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, и отсутствие активности – в отношении *Pseudomonas aeruginosa* при сильном разведении (таблица 7).

Полученные результаты исследования антимикробного действия методом серийных разведений в жидких питательных средах соответствуют выводам ранее проведенных скрининговых исследований антимикробного действия методом диффузии в агар. Степень антимикробного действия модельных образцов ЛПл существенно снижается с разведением.

Таблица 7 – Результаты изучения антибактериального действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ (n=5)

	Степень мутности растворов клеточных суспензий в отношении микроорганизмов, в единицах МакФарланда (McF), $\bar{X} \pm \Delta X$					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Контроль микро-организмов	4,76 $\pm$ 0,02		4,71 $\pm$ 0,03		5,28 $\pm$ 0,05	
Тестиру-емый раствор	пленка «плацебо»	раствор ЛПл	пленка «плацебо»	раствор ЛПл	пленка «плацебо»	раствор ЛПл
исходное разведение	5,34 $\pm$ 0,05*	0,33 $\pm$ 0,02*	5,65 $\pm$ 0,04*	0,42 $\pm$ 0,04*	5,79 $\pm$ 0,05*	4,86 $\pm$ 0,02*
разведение 1:10	3,73 $\pm$ 0,04*	1,82 $\pm$ 0,03*	5,28 $\pm$ 0,03*	3,57 $\pm$ 0,02*	5,88 $\pm$ 0,03*	5,03 $\pm$ 0,02
разведение 1:100	3,98 $\pm$ 0,11*	3,99 $\pm$ 0,01*	5,49 $\pm$ 0,06*	4,55 $\pm$ 0,07	5,95 $\pm$ 0,02*	5,74 $\pm$ 0,02*
разведение 1:1000	4,6 $\pm$ 0,04*	4,55 $\pm$ 0,04*	5,65 $\pm$ 0,05*	4,86 $\pm$ 0,03*	5,96 $\pm$ 0,02*	5,87 $\pm$ 0,01*
* - статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$) от показателей степени мутности контрольного раствора микроорганизмов						

Также выявлено фунгицидное действие модельных образцов ЛПл в отношении *Candida albicans* во всех исследуемых разведениях, однако степень действия существенно снижается с уменьшением содержания ЦПХ и янтарной кислоты в растворе (рисунок 5). Практически полное угнетение *Candida albicans* наблюдается в растворе с максимальным содержанием ЦПХ и янтарной кислоты (0,04 мг/мл и 0,1 мг/ мл, соответственно).

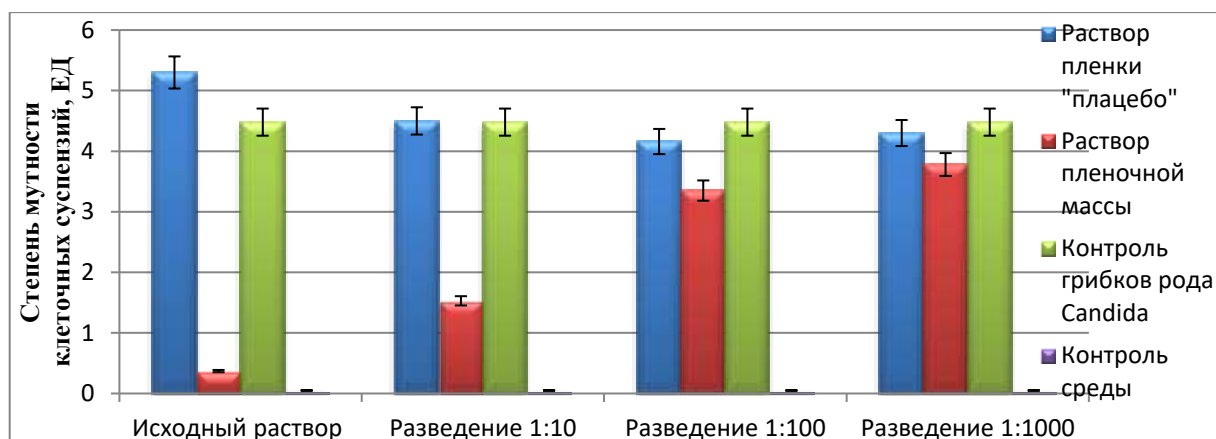


Рисунок 5 – Фунгицидное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, относительно *Candida albicans*

В исходном растворе пленки «плацебо» наблюдается увеличение роста колоний грибов рода *Candida* относительно контроля микроорганизмов (рисунок 5), что может быть связано с тем, что раствор пленочной массы является хорошей питательной средой для роста микроорганизмов. Однако введение антисептика ЦПХ препятствует росту микроорганизмов в пленочной основе и дополнительное введение консервантов в пленочную массу не требуется.

Оценку антиокислительной активности модельных образцов ЛПл, в модельной тест-системе *in vitro* производили, регистрируя ингибирование липопероксидации - накопление веществ, реагирующих с ТБК - реактивными продуктами. Установлено, что приготовленные из

модельных образцов ЛПл исследуемые растворы во всех разведениях продемонстрировали способность ингибировать процессы липопероксидации в условиях *in vitro* (рисунок 6), прирост ТБК - реактивных продуктов был значительно меньше контрольных значений, при этом прооксидантный эффект исследуемой лекарственной формы не проявляется на всех уровнях концентраций.

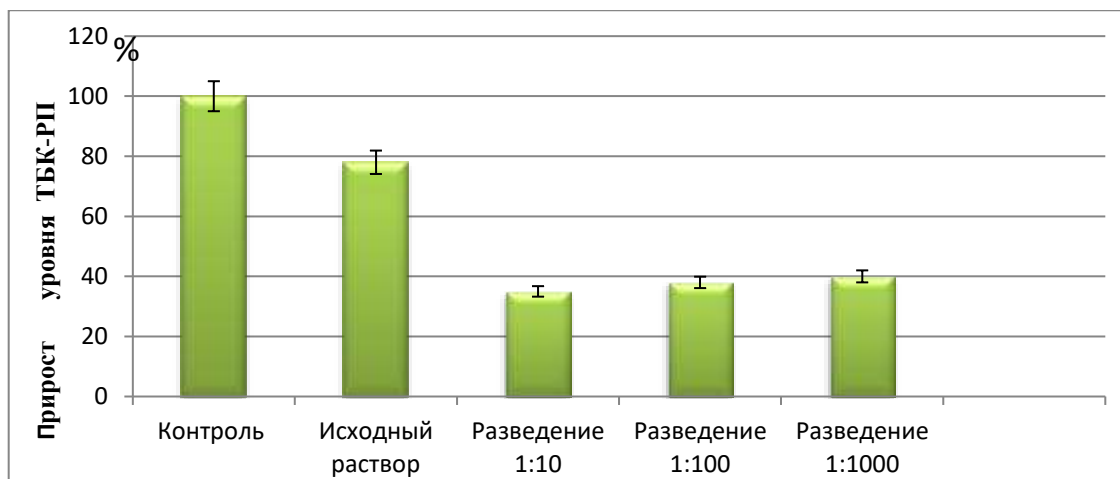


Рисунок 6 – Влияние извлечений модельных образцов лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, на перекисное окисление липидов в условиях *in vitro*

Определение *противоперекисного действия* модельных образцов ЛПл, проводили в условиях *in vitro* спектрофотометрически по методу Королюка М.А., по реакции пероксида водорода с раствором молибдата аммония, с образованием окрашенного в желтый цвет комплекса с максимумом светопоглощения при длине волны 410 нм (рисунок 7).

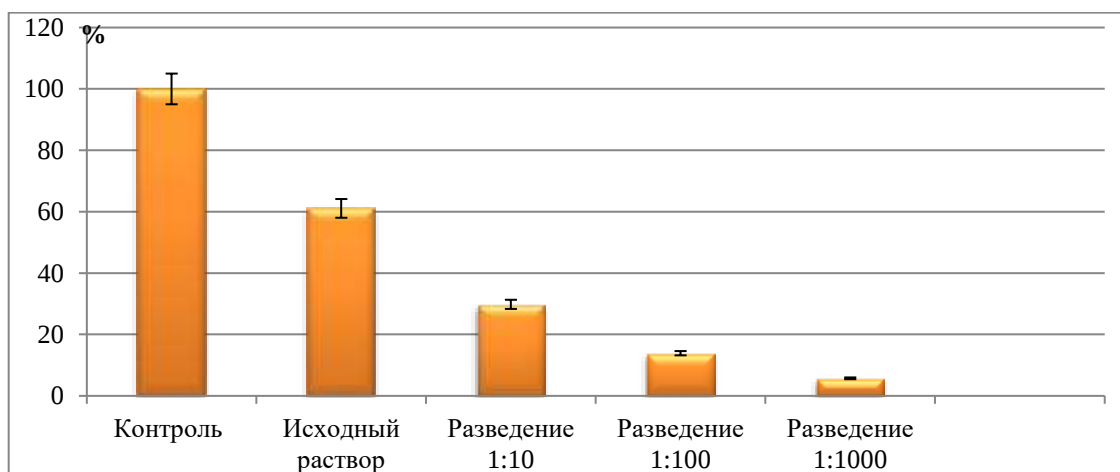


Рисунок 7 – Оценка противоперекисного действия извлечений модельных образцов лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в условиях *in vitro*

Противоперекисное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, проявляется во всем диапазоне разведений, однако способность растворов утилизировать пероксид водорода снижается с увеличением разведения: исходный тестируемый раствор ЛПл, содержащий 0,1 мг/мл янтарной кислоты и 0,04 мг/мл ЦПХ, обладает максимальным противоперекисным действием, а в разведении 1:1000 наблюдается минимальное действие.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Экспериментально определены оптимальные условия разделения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии методом ТСХ: подвижная фаза: этилацетат – этиловый спирт – раствор аммиака концентрированный в соотношении 80:20:20; детектор – 0,1% спиртовой раствор бромфенолового синего.

Разработана методика качественной оценки янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ТСХ. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности разработанной методики совместного определения янтарной кислоты и ЦПХ и включены в проект нормативной документации на ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.

2. Экспериментально определены оптимальные условия разделения сильно отличающихся по полярности веществ, янтарной кислоты и ЦПХ, при их совместном присутствии методом ВЭЖХ в градиентном режиме. Элюент: 0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2. Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 30° С; общая аналитическая длина волны 210 нм. Время удерживания янтарной кислоты – 7,37 мин, ЦПХ – 15,67 мин.

Произведена оценка пригодности хроматографической системы. Значения относительного стандартного отклонения времени удерживания (оценка подлинности) и площади хроматографического пика (количественная оценка содержания) янтарной кислоты и ЦПХ не превышают 1,0%. Соблюдаются требования к разделительной способности хроматографической системы, коэффициент разрешения между пиками равен 38,30.

Число теоретических тарелок удовлетворяет требованиям эффективности хроматографической системы (среднее значение для янтарной кислоты – 4913, ЦПХ – 139611). Величина коэффициента (фактора) асимметрии пика как для янтарной кислоты, так и для ЦПХ не превышает 1,5.

Разработана методика качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ВЭЖХ. Относительное стандартное отклонение среднего результата не превышает 1,22 % для янтарной кислоты, и 1,87% для ЦПХ при определении содержания действующих веществ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.

Полученные результаты свидетельствуют о пригодности разработанной методики и включены в проект нормативной документации на ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.

3. Проведена валидационная оценка методики качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ по критериям валидности: специфичность методики, пригодность хроматографической системы, линейность результатов и аналитическая область методики, правильность и воспроизводимость.

Уравнения линейной зависимости калибровочных графиков: $S = 612,91 \times C$ (для янтарной кислоты) и $S = 9855,28 \times C$ (для ЦПХ); коэффициенты корреляции 0,9995 и 0,9998 для янтарной кислоты и ЦПХ, соответственно.

Правильность методики определена путем расчета процента открываемости известных добавленных количеств веществ. Истинные значения концентраций приготовленных растворов находятся внутри доверительных интервалов средних результатов анализа, полученных с использованием разработанной методики. Рассчитанные значения критерия Стьюдента (0,45 – для янтарной кислоты, 1,71 – для ЦПХ) не превышают табличного значения (2,31), следовательно, результаты количественного определения неотягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики доказана как сходимость результатов, получаемых одним

аналитиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня, и как внутрилабораторная воспроизводимость результатов, получаемых двумя аналитиками на одном и том же оборудовании в разные дни. Относительные стандартные отклонения среднего результата каждого из аналитиков не превышают 2%, расчетные значения критерия Фишера (2,25 – для янтарной кислоты, 4,00 – для ЦПХ) меньше табличного (5,05), что подтверждает статистическую незначимость результатов количественного определения действующих веществ ЛПл.

4. Определены показатели качества и критерии их приемлемости для ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания. Проведено исследование по установлению методов и разработке методик определения основных показателей качества исследуемой ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с требованиями действующей нормативной документации.

В результате исследований эмпирическим путем обоснован состав ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ. В условиях опытов *in vitro* установлено, что янтарная кислота не влияет на антимикробное действие ЦПХ (соотношение янтарной кислоты и ЦПХ 2,5:1), с уменьшением концентрации ЦПХ в исследуемых растворах уменьшается степень его антимикробного действия.

Получен патент РФ № 2617238 «Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиний хлоридом местного действия».

Произведена оценка качества опытных серий ЛПл, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с разработанными показателями качества. Все исследуемые серии ЛПл соответствуют предъявляемым к ним требованиям.

Проведено микробиологическое исследование модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ. Установлено, что ЛПл разработанного состава по показателю микробиологическая чистота относится к категории 2 «Препараты для применения местно (на слизистую рта, десны и др.)» и соответствуют данным требованиям качества.

В условиях естественного хранения методом долгосрочных испытаний определен срок годности ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ. Срок годности составляет 2 года в сухом защищенном от света месте при температуре не выше +15° С.

5. В условиях *in vitro* показано антимикробное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в отношении микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также выявлено фунгицидное действие в отношении *Candida albicans*. Степень антимикробного действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, существенно снижается с уменьшением содержания количества ЦПХ и янтарной кислоты в растворе.

Доказан антиоксидантный эффект и противоперекисное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в условиях опытов *in vitro*, при этом прооксидантный эффект модельных образцов исследуемой лекарственной формы не проявляется на всех исследуемых уровнях концентраций.

6. На основании результатов проведенных комплексных исследований разработан нормативный документ – проект Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка на десну, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид».

Практические рекомендации

Данные диссертационного исследования имеют практическую значимость для работы аналитических лабораторий в области контроля качества лекарственных средств и могут стать

основой для дальнейшей разработки и стандартизации новых лекарственных препаратов для применения в стоматологической практике.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования заключаются в проведении последующих доклинических и клинических испытаний стоматологической лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.

Список работ, опубликованных по теме диссертационного исследования:

1. Ножкина, Н.Н. Использование метода тонкослойной хроматографии в анализе кислоты янтарной / Н.Н. Ножкина, Г.П. Григорьева // Сборник материалов научно-практической конференции «Основные достижения научных школ ЮУГМУ», посвященной 70-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета. – Челябинск : Изд-во ЮУГМУ, 2014. – С. 115-118.
2. Ножкина, Н.Н. Разработка новых лекарственных форм кислоты янтарной с улучшенными биофармацевтическими свойствами / Н.Н. Ножкина, **Е.В. Симонян** // Материалы VI международной (XIII итоговой) научно – практической конференции молодых ученых, посвященной 70-летию Победы. – Челябинск : Изд-во ЮУГМУ, 2015. – С. 38-41.
3. Ножкина, Н.Н. Изучение антиоксидантного действия лекарственной пленки, содержащей кислоту янтарную и цетилпиридиния хлорид / Н.Н. Ножкина, **Е.В. Симонян**, А.И. Сеницкий // Актуальные вопросы медицины – 21 век : материалы международного науч. конгр., посвящ. 100-летию Пермского гос. мед. ун-та им. акад. Е.А. Вагнера. – Пермь, 2016. – С. 97-100.
4. Ножкина, Н.Н. Обоснование состава стоматологической лекарственной пленки пролонгированного действия с кислотой янтарной и цетилпиридиния хлоридом / Н.Н. Ножкина, **Е.В. Симонян**, А.И. Сеницкий // Инновации в здоровье нации : материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФА, 2016. – С. 459-462.
5. Ножкина, Н.Н. Оценка антиоксидантного действия биорастворимой лекарственной пленки с кислотой янтарной и цетилпиридиния хлоридом / Н.Н. Ножкина, А.И. Сеницкий, **Е.В. Симонян** // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т. 11, № 5 (65). – С. 93-95.
6. Ножкина, Н.Н. Перспективы применения цетилпиридиния хлорида в качестве антимикробного компонента в составе новых лекарственных форм / Н.Н. Ножкина, **Е.В. Симонян**, А.И. Сеницкий // Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – Уфа, 2016. – С. 176-180.
7. Ножкина, Н.Н. Разработка новых лекарственных стоматологических форм местного действия с улучшенными биофармацевтическими свойствами / Н.Н. Ножкина // Материалы VII международной (XIV итоговой) научно-практической конференции молодых ученых. – Челябинск : Изд-во ЮУГМУ, 2016. – С. 56-58.
8. Ножкина, Н.Н. Изучение антиоксидантного и антимикробного действия стоматологической лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид / Н.Н. Ножкина, **Е.В. Симонян**, А.И. Сеницкий // Биохимия в медицинской практике : сб. науч. тр., посвящ. 75-летию кафедры биол. химии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. – Москва, 2019. – С. 62-65.
9. Ножкина, Н.Н. Стандартизация, оптимизация состава и технологии стоматологической пленки лекарственной с янтарной кислотой и цетилпиридиния хлоридом / Н.Н. Ножкина, **Е.В. Симонян**, А.И. Сеницкий // Современная организация лекарственного обеспечения. – 2019. – № 2. – С. 59-60.

- 10. Дворская, О.Н. Совместное определение янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в пленках лекарственных методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Н. Дворская, Н.Н. Ножкина // Медицина.– 2021.– Т. 9. – № 2(34). – С. 75-88.**
11. Ножкина, Н.Н. Комплексные исследования пленок лекарственных с антибактериальным и антигипоксантиным действием / Н.Н. Ножкина, О.Н. Дворская // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – Самара, 2021. – С. 392-395.
- 12. Ножкина, Н.Н. Определение основных показателей качества и оценка лекарственных пленок, содержащих янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид / Н.Н. Ножкина, О.Н. Дворская // Медицина. – 2022. – Т. 10. – № 3 (39). – С. 85-91.**
- 13. Ножкина, Н.Н. Перспективы применения цетилпиридиния хлорида в современной медицинской практике (обзор литературы) / Н.Н. Ножкина, А.Р. Абдукадырова, Е.А. Ножкина, О.Н. Дворская // Медицина. – 2022. – Т. 10. – № 2 (38). – С. 56-64.**

Патенты

Патент № 2617238 Российская Федерация. Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиний хлоридом местного действия : № 2016112080 : заявл. 30.03.2016 : опубл. 24.04.2017 / Н.Н. Ножкина, Е.В. Симонян, А.И. Сеницкий, О.И. Филимонова, Ю.С. Шишкова, Е.О. Белоусова.