

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

НОЖКИНА НАТАЛИЯ НИКОЛАЕВНА

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Дворская Оксана Николаевна
доктор фармацевтических наук, доцент

Челябинск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	12
ГЛАВА 1. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С АНТИОКСИДАНТНЫМ И АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Актуальность применения лекарственных препаратов с антиоксидантным и антимикробным действием в терапии воспалительных заболеваний пародонта.....	13
1.2. Характеристика ЦПХ, применение в стоматологической практике	15
1.3. Методы качественной оценки и количественного определения ЦПХ.....	23
1.4. Характеристика янтарной кислоты, применение в стоматологической практике.....	28
1.5. Методы качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты.....	31
1.6. Перспективы фармацевтического анализа стоматологических лекарственных пленок.....	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ.....	37
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Объекты исследования.....	38
2.2. Оборудование.....	40
2.3. Методы исследования.....	41
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.....	55
3.1. Разработка методики совместного качественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в лекарственной пленке методом ТСХ.....	55
3.2. Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ.....	62
3.3. Валидация методики качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в лекарственной пленке методом ВЭЖХ.....	68
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	78
ГЛАВА 4. НОРМИРОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЁНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ	

ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ.....	82
4.1. Обоснование состава лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ	82
4.2. Установление показателей качества лекарственной плёнки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.....	90
4.3. Исследование стабильности лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ в процессе хранения.....	109
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4	111
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКРОБНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ.....	114
5.1. Исследование антимикробного действия лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ	114
5.2. Исследование антиоксидантного действия модельных образцов лекарственной пленки, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ.....	120
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Патент РФ на изобретение № 261723	149
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Проект Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид»	151
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Акты внедрений и протоколы исследований	154

ВВЕДЕНИЕ

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 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, 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 с личным участием (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 с личным участием (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 суппозиториев, 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.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БАВ – Биологически-активные вещества

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ГРЛС – Государственный реестр лекарственных средств

ГФ РФ XIV изд. – Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV

издания

КПАВ – Катионные поверхностно-активные вещества

ЛП – Лекарственный препарат

ЛПл – Лекарственная пленка

ЛФ – Лекарственная форма

Na-КМЦ – Натрий карбоксиметилцеллюлоза

НД – Нормативная документация

ОФ-ВЭЖХ – Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФС – Общая фармакопейная статья

ПАВ – Поверхностно-активные вещества

ПВС – Поливиниловый спирт

ПФ – Подвижная фаза

СФ – метод – Спектрофотометрический метод

ТСХ – Тонкослойная хроматография

ТТ – Теоретические тарелки

ФС – Фармакопейная статья

ЦПХ – Цетилпиридиния хлорид

УФ – Ультрафиолетовая область спектра

ЯК – Янтарная кислота

ТБК – Тиобарбитуровая кислота

ГЛАВА 1. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С АНТИОКСИДАНТНЫМ И АНТИМИКРОБНЫМ

ДЕЙСТВИЕМ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Актуальность применения лекарственных препаратов с антиоксидантным и антимикробным действием в терапии воспалительных заболеваний пародонта

Среди многообразия стоматологических заболеваний, болезни пародонта относят к самой распространенной патологии челюстно-лицевой области, обусловленной функциональными расстройствами зубочелюстной системы. Патологией пародонта, по данным официальной статистики Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), страдает более 90% населения всего мира, что превышает частоту выявления кариеса [110]. Ткани пародонта представляют единую систему, которая обеспечивает выполнение ряда функций: опорно-удерживающей, барьерной, трофической, пластической, амортизирующей, сенсорной, адаптационной к функциональным и топографическим изменениям [15, 34].

К заболеваниям пародонта относят все возникающие в нем патологические процессы, они могут ограничиваться десной или поражать все его структуры. По данным литературных источников, тяжелая форма пародонтита, приводящая к потере зубов, встречается примерно у 20% населения среднего возраста [30].

Заболевания пародонта развиваются под влиянием суммарного воздействия местных и общих факторов на фоне изменений реактивности организма. К общим факторам, относят эндокринные заболевания; гипо - и авитаминозы; хронический стресс и др.; этиологический фактор - механическая травма тканей пародонта [24].

Около 700 видов микроорганизмов составляют условно-патогенную («нормальную») и патогенную микрофлору полости рта. Роль «нормальной» микрофлоры - поддержание резистентности тканей пародонта и слизистой полости рта к бактериальной инфекции за счет проявления слабовыраженного иммуномодулирующего эффекта. Но при нарушениях адаптационных механизмов местного и общего иммунитета происходит переход микроорганизмов в патогенное

состояние [79]. Патогенная микрофлора существует в планктонном виде, в виде свободно плавающих бактерий, и в виде биопленок [60, 78, 84, 135]. Состав биопленки изменяется со временем, микроорганизмы формируют зубной налет и зубную бляшку [60].

Ведущая роль в развитии воспалительных процессов пародонта принадлежит анаэробной флоре - эндотоксинам пародонтопатогенных микроорганизмов зубной бляшки. «Нормальную» микрофлору полости рта формируют грамположительные стрептококки и факультативные актиномицеты, составляющие «барьер колонизационной резистентности» слизистых оболочек. В процессе появления воспаления преобладает грамотрицательная микрофлора (до 25%) с преобладанием стрепто – и стафилококков. Пародонтпатогенные бактерии вырабатывают наркотизирующие ферменты и экзотоксины, приводящие к деструкции тканей пародонта, что приводит к повышению проницаемости сосудов, снижению антиоксидантной защиты, нарушению энергетического обмена и иммунного ответа [34]. При значительном нарушении процессов окисления и фосфорилирования дыхательной цепи в тканях пародонта развивается гипоксия, которая усиливает процессы свободнорадикального окисления, в частности, перекисного окисления липидов, на фоне снижения антиоксидантной защиты тканей пародонта [11, 40].

В полости рта присутствуют естественные факторы, подавляющие рост микрофлоры. В слюне содержатся биологически активные белки: пероксидазы, лизоцим, лактопероксидаза, а также антитела, которые в сочетании с лейкоцитами и другими иммунными компонентами препятствуют прикреплению микроорганизмов к клеточным мембранам и к поверхности твердых тканей зубов [11].

Таким образом, воспалительные заболевания тканей пародонта следует рассматривать как результат нарушения баланса между бактериальным симбиозом и тканями полости рта.

Согласно Клиническим рекомендациям ведения больных «Гингивит» и «Пародонтит» [32, 33], в терапии воспалительных процессов пародонта рекомендуется применять противомикробные лекарственные препараты (ЛП) для местного применения; препараты для местной анестезии; противомикробные

препараты для системного применения; нестероидные противовоспалительные препараты; антигистаминные препараты; антисептики. Применение антибиотиков имеет ряд ограничений, их использование приводит к угнетению факторов естественной резистентности организма и появлению устойчивых штаммов бактерий. Основу медикаментозного лечения составляют антисептики, их применяют в виде ротовых ванночек, орошений, аппликаций или ирригаций.

Термин антисептики (в переводе с греч.: *anti* - против; *septicus* - гнилостный) применяют к группе лекарственных средств, которые могут устранять патогенные микроорганизмы местно на поверхности тела или в его полостях [18]. Они должны иметь широкий спектр антибактериального, противогрибкового и противовирусного действия, эффективно уничтожать резистентных возбудителей инфекционных заболеваний. В стоматологической практике в качестве антисептиков применяют галогенсодержащие вещества, окислители, красители и детергенты, обладающие низким поверхностным натяжением (хлоргексидин, мирамистин, цетилпиридиния хлорид (ЦПХ)) [87].

Проанализировав современные подходы к терапии заболеваний пародонта следует отметить, что применяемые ЛП должны обладать комплексным антибактериальным, фунгицидным и антиоксидантным действием [75, 82].

1.2. Характеристика ЦПХ, применение в стоматологической практике

В терапии воспалительных заболеваний пародонта применяют противомикробные ЛП из группы ПАВ, способные концентрироваться на поверхности раздела термодинамических фаз и вызывать снижение поверхностного натяжения. В качестве противомикробных ЛП используют катионные (КПАВ), к которым относят четвертичные аммониевые соединения [126], среди которых выделяют соли алкилбензиламмония, в частности, цетилпиридиния хлорид, $C_{21}H_{38}NCl \cdot H_2O$ (Cetylpyridiniichloridum, ЦПХ, моногидрат-1-гексодецилпиридиния хлорид). Это гетероароматическая соль аммония, представляет собой четвертичное аммониевое соединение, имеет одну гексадекановую углеродную алкильную цепь в

качестве липофильной части молекулы и положительно заряженное пиридиновое кольцо, обуславливающее гидрофильные свойства (рисунок 1.1).

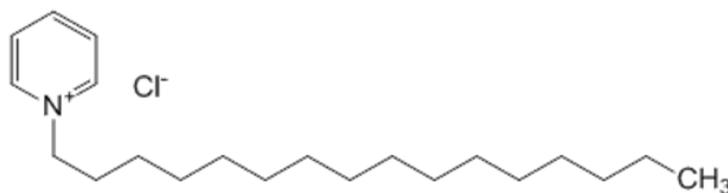


Рисунок 1.1 - Структурная формула ЦПХ

В силу молекулярной структуры ЦПХ характеризуется как ПАВ, что обуславливает его поверхностную активность, а также и его антимикробные свойства. Антимикробная активность цетилпиридиния хлорида впервые описана в 1939 г. [137], а бактерицидное действие на микроорганизмы ротовой полости - в 1945 г. [120].

Методом микроэлектрофореза доказано, что наличие в молекуле ЦПХ положительного заряда на атоме азота приводит к его взаимодействию с отрицательно заряженными фрагментами белка мембраны клеток, увеличению ее проницаемости для аминокислот и нуклеотидов. Липофильная часть молекулы образует слабые ионные соединения с мембраной клетки, изменяя ее структуру, подавляя бактериальный метаболизм, приводит к гибели клетки. Таким образом, антимикробная активность ЦПХ обусловлена его способностью увеличивать проницаемость клеточных мембран, денатурировать белки и блокировать важные ферментные системы, неспецифически взаимодействуя с различными структурами клеток, что приводит к гибели клетки микроорганизма. При этом антимикробная активность цетилпиридиния хлорида сохраняется длительное время [125].

В работе ряда авторов приведены результаты исследований, доказывающие выраженное антимикробное действие ЦПХ на патогенную микрофлору полости рта. Наибольшей активностью он обладает в отношении карисогенных стрептококков и актиномицетов, активно подавляет рост дрожжеподобных грибов рода *Candida*, менее эффективен в отношении грамотрицательных бактерий: синегнойной и кишечной палочки [80].

Многочисленные микробиологические исследования показали высокую антимикробную эффективность ЦПХ в отношении бактерий рода *Streptococcus*, а

также относительно *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* [105, 106, 124, 143, 152]. В исследованиях *in vitro* обнаружена активность в отношении *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori* и *Enterobacteriaceae* [99].

В качестве antimicrobial средства цетилпиридиния хлорид активно применяется в стоматологической практике, в составе таких средств гигиены, как зубные пасты, ополаскиватели для полости рта и другие. В научной литературе приведено большое количество публикаций о применении ополаскивателей для полости рта, содержащие 0,05-0,075% водные растворы ЦПХ. Показано, что цетилпиридиния хлорид проявляет antimicrobial активность относительно большинства пародонтпатогенных видов микроорганизмов биопленки, снижает формирование зубного налета и риск развития гингивита [107, 117, 129, 138, 140, 148, 152]. В работе отечественных авторов [72] показано, что применение ополаскивателей обеспечивает выраженный противовоспалительный и противоналетный эффект.

В ряде рандомизированных клинических исследований доказана эффективность применения ополаскивателей для полости рта, содержащих ЦПХ, цинка лактат и соединения фтора; а также комбинацию цетилпиридиния хлорида и гиалуроновой кислоты [116, 146]. Компанией «Colgate» разработан ополаскиватель с ЦПХ «Colgate Total® Pro-Защита» [49].

Опубликованы исследования (Tadakamadla S.K. et al.) по изучению antimicrobial эффекта ополаскивателя для полости рта, содержащего ЦПХ и 4-изопропил-3-метилфенол; в условиях *in vitro* показано его antimicrobial действие в отношении бактерий, связанных с пневмонией и инфекциями полости рта [94].

В 1994 г. проведено исследование по изучению антиоксидантной активности некоторых химиотерапевтических средств, в их числе и ЦПХ. Результаты показали, что помимо антисептического или противомicrobial действия они обладают антиоксидантной активностью против спонтанного окисления [108]. В эксперименте *in vitro* на культуре фибробластов ткани десны человека доказано антиоксигеназное действие цетилпиридиния хлорида [115].

Обширные исследования последних лет направлены на изучение антивирусных

свойств цетилпиридиния хлорида. ЦПХ обладает избирательным прямым и опосредованным действием на вирусные патогены: прямое действие связано с проникновением цетилпиридиния хлорида через капсидную оболочку вируса; не прямое обусловлено активацией синтеза альфа-интерферона, что приводит к стимуляции местного иммунитета. Мельниковым и соавт. установлено, что ЦПХ активирует продукцию раннего интерферона клетками небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом. Препарат умеренно стимулирует цитолитическую активность цитотоксических клеток миндалин и периферической крови, поэтому его следует применять на ранних этапах инфекционного вирусного процесса [44]. Ранее этими же авторами было показано, что входящий в состав пастилок «Септолете плюс» цетилпиридиния хлорид, не обладает депрессорным действием на состояние местного иммунитета [44].

В исследованиях Alvarez D. et al. в 2020 году выявлено, что короткое, 10-минутное воздействие раствора ЦПХ на полость рта блокирует репликацию вируса простого герпеса человека в эпителиальных клетках и фибробластах десен [95].

Ранее опубликованы данные о том, что в условиях *in vitro* и *in vivo* цетилпиридиния хлорид обладает противовирусной активностью против вирусов гриппа посредством прямой атаки на вирусную оболочку, нарушая ее целостность и морфологию [136].

Seo H.W. et al. [142] показано, что ЦПХ ингибирует сборку капсида и приводит к снижению биогенеза вируса гепатита В, специфически взаимодействуя с вирусным нуклеокапсидным белком, и может применяться при лечении гепатита В.

Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* последних лет указывают на эффективность воздействия ЦПХ против оболочечных вирусов, таких как респираторно-синцитиальный вирус или коронавирусы. Показано, что пероральное местное введение ЦПХ эффективно в лечении инфекций верхних дыхательных путей. Таким образом, предполагается, что ЦПХ может оказывать профилактическое воздействие на инфицирование вирусом гриппа, аденовирусом, риновирусом, респираторно-синцитиальным вирусом и коронавирусом [131].

Снижение оральной вирусной нагрузки может привести к снижению риска

передачи коронавируса SARS-CoV-2 через капли слюны или аэрозоли и, следовательно, могут снизить тяжесть протекания COVID-19, что способствует борьбе с пандемией. Существует достаточно доказательств в поддержку использования ополаскивателей с ЦПХ для потенциального снижения риска передачи вирусной нагрузки SARS-CoV-2 и других коронавирусов [101, 113, 127, 149]. Исследования, проводимые на базе BioScience Laboratories Inc. показали, что ополаскиватель для полости рта с цетилпиридиния хлоридом (0,07 %), достоверно уменьшает содержание вирусов HCoV-229E [111].

Рандомизированные исследования разных групп авторов показывают, что применение ополаскивателя для полости рта, содержащего ЦПХ, снижает уровень SARS-CoV-2 в слюне даже при времени контакта 30 с и пролонгируется до 6 часов. Авторы отмечают, что ополаскиватели для полости рта с ЦПХ снижают уровень вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в слюне у пациентов с COVID-19 [127, 141].

Shen et al. (2019) идентифицировали 56 соединений, проявляющих противовирусную активность в отношении генно-инженерного человеческого CoV-OC43 (HCoV-OC43). ЦПХ проявлял противовирусную активность в отношении тяжелой формы CoV (MERS-CoV) и HCoV-NL63 [101]. Исследование A. Steyer et al. демонстрирует снижение вирусной нагрузки в ротовой полости при лечении SARS-CoV-2 комбинации цетилпиридиния хлорида с бензидамина гидрохлоридом [145].

Ополаскиватели для полости рта, содержащие цетилпиридиния хлорид, рекомендованы Ассоциациями стоматологов многих стран (Китай, Италия, США) для применения перед стоматологическими процедурами для обеспечения минимальных стандартов безопасности и минимизации риска передачи SARS-CoV-2 [114, 121].

В настоящее время ведутся разработки новых антисептических средств, содержащих ЦПХ. Minghetti P. et al. разработали состав буккоадгезивных таблеток с цетилпиридиния хлоридом пролонгированного высвобождения [128]. Доказана антимикробная активность акриловых носителей, модифицированных ЦПХ, в отношении *Streptococcus mutans* [150]. При оценке противогрибкового наноносителя с ЦПХ, содержащего наночастицы оксида железа, конъюгированных с хитозаном

показано, что его применение уменьшает количество культивируемых клеток биопленок *Candida* без увеличения цитотоксических эффектов [96].

Проведенные клинические исследования мукоадгезивного геля, содержащего цетилпиридиния хлорид и цинка глюконат, показали эффективность его применения в уменьшении развития зубного налета и гингивита [118]. Опубликованы результаты исследования по разработке разлагаемого лака на основе акриловой смолы с ЦПХ [144]. ЦПХ, в составе зубного цемента и ирригационного раствора, показал эффективность против ванкомицин-резистентных энтерококков [109]. Введение ЦПХ в стоматологические стеклоиономерные цементы приводит к улучшению характеристик герметика корневых каналов [134], а также к высокой антибиотической активности относительно *Candida dubliniensis* без потери микромеханических и гипоаллергенных свойств цементов [103]. При изучении антикариесогенного эффекта наноэмульсии с ЦПХ, показана рациональность его применения для предотвращения раннего кариеса [119].

Анализ литературы показывает, что цетилпиридиния хлорид обладает широким спектром антибактериального, противогрибкового и противовирусного действия.

В Государственный реестр ЛС (по состоянию на 4 июля 2022 года) [6] включены прошедшие государственную регистрацию следующие лекарственные препараты и фармацевтические субстанции, содержащие цетилпиридиния хлорид (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Лекарственные препараты и субстанции, включенные в перечень Государственного реестра лекарственных средств, содержащие ЦПХ

Торговое наименование ЛП	Форма выпуска	Состав	Фармакотерапевтическая группа	Производитель
Граммидин®	спрей для местного применения дозированный	Грамицидин С + ЦПХ	антибиотик + антисептическое средство	АО «Валента Фарм» / Россия
Граммидин® детский	спрей для местного применения дозированный	Грамицидин С + ЦПХ	антибиотик + антисептическое средство	АО «Валента Фарм» / Россия
Граммидин® нео	таблетки для рассасывания	Грамицидин С + ЦПХ	антибиотик + антисептическое средство	АО «Валента Фарм» / Россия
Граммидин® с анестетиком нео	таблетки для рассасывания	Грамицидин С + Оксibuпрокаин + ЦПХ	антибиотик + антисептическое + местноанестезирующее средство	АО «Валента Фарм» / Россия

Граммидин® с анестетиком	спрей для местного применения дозированный	Грамицидин С + Оксibuпрокаин + ЦПХ	антибиотик + антисептическое средство + местноанестезирующее средство	АО «Валента Фарм» / Россия
ДЕНТЕСГЕЛЬ	гель для нанесения на десны, (детский)	Лидокаин + ЦПХ	местноанестезирующее средство	ООО «Тулская фармацевтическая фабрика» / Россия
Калгель®	гель стоматологический (детский)	Лидокаин + ЦПХ	местноанестезирующее средство	АО «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг» / Россия
Лидент Бэби	гель стоматологический	Лидокаин + ЦПХ	местноанестезирующее средство	АО «АКРИХИН» / Россия
Лидокавер	гель для нанесения на десны (для детей)	Лидокаин + ЦПХ	местноанестезирующее средство	АО «ВЕРТЕКС» / Россия
Максиколд® лор табс двойное действие	таблетки для рассасывания	Флурбипрофен + ЦПХ	антисептическое и противовоспалительное средство	АО «Отисифарм» / Россия
СЕПТОЛЕТЕ® ТОТАЛ	спрей для местного применения дозированный	Бензидамин + ЦПХ	нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) + антисептическое средство	АО «КРКА, д.д., Ново место» / Словения
СЕПТОФОРТ ТОТАЛ	спрей для местного применения дозированный	Бензидамин + ЦПХ	НПВП + антисептическое средство	ООО «Фортива Мед» / Республика Беларусь
ТераФлю ЛАР Ментол	таблетки для рассасывания	Лидокаин + ЦПХ	антисептическое средство + местноанестезирующее средство	«Новартис» / Турция
Цетилпиридиния хлорид	субстанция-порошок (пакеты полиэтиленовые)	ЦПХ	не указано	Индия

"Справочник Видаль 2022. Лекарственные препараты в России" содержит перечень и описания ЛП и активных веществ (под международными наименованиями), представленных на фармацевтическом рынке РФ. Ассортимент лекарственных средств, содержащих ЦПХ, приведен в таблице 1.2 [61].

Таблица 1.2 - Ассортимент лекарственных средств, содержащих ЦПХ, приведенных в «Справочник Видаль»

№ п/п	Торговое название	Владелец регистрационного удостоверения, производитель	Действующие вещества	Форма выпуска	Содержание ЦПХ
1.	Граммидин Нео	Валента Фармацевтика (Россия)	Грамицидин С + ЦПХ	таблетки для рассасывания	1,0 мг
2.	Граммидин с анестетиком Нео	Валента Фармацевтика (Россия)	Грамицидин С+ Оксибупрокаин + ЦПХ	таблетки для рассасывания	1,0 мг
3.	Граммидин Детский	Валента Фармацевтика (Россия)	Грамицидин С + ЦПХ	таблетки для рассасывания	1,0 мг
4.	Граммидин	Фамар (Нидерланды)	Грамицидин С + Цетилпиридиния хлорид	спрей для местного применения дозированный	0,1 мг/доза
5.	Калгель	Glaxo Smith Kline Pharmaceuticals (Польша)	Лидокаина гидрохлорид+ЦПХ	гель стоматологический	1,0 мг/1,0 г
6.	Лорсепт	Рубикон (Республика Беларусь)	ЦПХ	Таблетки для рассасывания	1,5 мг
7.	Новосепт Форте	NaturProdukt Europe (Нидерланды)	Тетракаина гидрохлорид + Цинка сульфат+ЦПХ	пастилки	1,5 мг
8.	Новосепт Форте	NaturProdukt Europe (Нидерланды)	ЦПХ+ Тетракаина гидрохлорид + Цинка сульфат	спрей для местного применения дозированный	0,25 г/100г
9.	Септолете Плюс	KRKA (Словения)	Бензокаин +ЦПХ	спрей для местного применения дозированный	2,0 мг/10 мл
10.	Септолете Нео	KRKA (Словения)	ЦПХ	пастилки	1,2 мг
11.	Септолете Плюс	KRKA (Словения)	Бензокаин +ЦПХ	пастилки	1,0 мг
12.	СептолетеТотал	KRKA (Словения)	Бензидамина гидрохлорид+ ЦПХ	таблетки для рассасывания	1,0 мг
13.	Терафлю Лар Ментол	Novartis Consumer Health (Швейцария)	Лидокаина гидрохлорид + ЦПХ	таблетки для рассасывания	1,5 мг
14.	Лидент Бэби	"АКРИХИН" (Россия)	Лидокаин+ЦПХ	гель стоматологический	0,1%

Анализ приведенных данных свидетельствуют о применении цетилпиридиния хлорида в качестве антисептического средства, преимущественно, при симптоматическом лечении простудных заболеваний и в стоматологической практике, часто - в сочетании с местноанестезирующими средствами. Ассортимент ЛП с ЦПХ представлен лишь несколькими ЛФ – пастилками или таблетками для рассасывания, дозированными спреями местного применения, содержание в которых ЦПХ составляет 1-1,5 мг. Большинство ЛФ зарубежного производства.

Цетилпиридиния хлорид разрешен к применению в детской практике: гели стоматологические «Калгель[®]», «Дентесгель», «Лидокавер» предназначены для детей в возрасте от 5 месяцев; спрей «Граммидин[®] детский» назначают детям от 4 лет [61].

ЦПХ нашел широкое применение в качестве дезинфицирующего и антисептического средства в медицинской практике, его применяют при заготовке крови, производстве кровезаменителей и бактериальных препаратов [85].

Несмотря на достаточно широкое применение цетилпиридиния хлорида в стоматологической и ЛОР-практике, его потенциальные возможности раскрыты далеко не полностью, и могут быть реализованы в процессе создания новых лекарственных форм.

1.3. Методы качественной оценки и количественного определения ЦПХ

Необходимым этапом при создании лекарственных средств является разработка методик контроля их качества. Для подтверждения степени чистоты, идентификации и количественного определения ЦПХ используют ряд химических или физико-химических методов анализа. Так, для идентификации цетилпиридиния хлорида проводят реакцию с бромфеноловым синим в нейтральной среде, с которым препарат дает зеленоватую окраску [1]. Кроме того, некоторые авторы рекомендуют использовать осадительные реакции на третичный атом азота с реактивом Драгендорфа или солью Рейнеке [53].

Для идентификации ЦПХ и оценки степени его чистоты используют метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагелевых пластинах в системе

растворителей пропанол - раствор аммиака (10:4), детектирование осуществляют парами йода, реактивом Драгендорфа или раствором нингидрина [1].

Описан метод ТСХ-УФ-денситометрии (400 нм) для количественного анализа и деления хлорида бензалкония, ЦПХ и цетримида на силанизированном силикагеле в системе растворителей: метанол - 25% раствор ацетата натрия - ацетон (65:35:20), детектирование - раствором трииодида калия [132].

В количественном анализе ЦПХ могут быть использованы титриметрические методы анализа. Согласно ГОСТ 30828-2002, титрованный раствор ЦПХ стандартизируют по рабочему раствору додецилсульфата натрия методом двухфазного титрования в присутствии смешанного индикатора эозина и метиленового голубого в системе растворителей вода – хлороформ [20]. Однако метод имеет низкую селективность, из-за трудности установления конечной точки вследствие образования водно – органической эмульсии.

Определение массовой доли ЦПХ в составе дезинфицирующего средства «Оротол Плюс» проводят методом двухфазного титрования стандартным раствором додецилсульфата натрия в присутствии бромфенолового синего [85].

В литературе описан фотоколориметрический метод определения цетилпиридиния хлорида путем осаждения реактивом Драгендорфа или солью Рейнке с последующей экстракцией хлороформом [55].

Предложен экстракционно-фотометрический метод определения ЦПХ, основанный на способности КПАВ образовывать с кислотными красителями, например с бромкрезоловым пурпурным, интенсивно окрашенные ионные ассоциаты. Открываемый минимум составляет 0,2 мкг/мл [7].

Для увеличения чувствительности определения предложен метод количественной оценки, основанный на образовании комплексного соединения ЦПХ с 4-диэтиламинофталгидразином в щелочной среде в присутствии пероксида водорода и солей меди (II) и последующей регистрацией величины его хемиллюминисценции [55].

Описан метод флуориметрического определения ЦПХ в водных растворах, после обработки его хелатным ассоциатом магния, цетилтриметиламмонием и

8-гидроксихинолин-5-сульфокислотой [54].

Также предложен метод потенциометрического определения цетилпиридиния хлорида в фармацевтических препаратах с использованием нового типа ионоселективных электродов с трафаретной печатью. Минимальная концентрация ЦПХ составляет 8×10^{-7} М, время отклика - около 3 секунд [130].

Спектрофотометрический метод (СФ) является фармакопейным методом анализа. В РФ XIV издания включена ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях». Абсорбционную спектрофотометрию в данных областях спектра применяют для определения подлинности, степени чистоты, а также количественного определения лекарственных средств [23]. Описан СФ метод определения КПАВ группы четвертичных аммониевых соединений, основанный на образовании ионно-ассоциативного комплекса с эриохромом черным-Т (λ_{\max} 708 нм). Метод отличается от описанных в литературе отсутствием экстракции в органическую фазу полученных комплексов [104].

Для идентификации и количественной оценки ЦПХ в воздухе рабочей зоны используют СФ метод анализа (при аналитической волне 210 и 260 нм) [31, 73]. Описан СФ метод количественного определения бензокаина и ЦПХ при совместном присутствии в таблетках, не требующий предварительного разделения или обработки образцов. Линейность наблюдалась в пределах концентраций от 10 до 25 мг/л бензокаина и от 4 до 20 мг/л цетилпиридиния хлорида [133].

СФ определение ЦПХ в фармацевтических продуктах основано на образовании хелатного соединения стронция (II) с бромпирогаллоловым красным и ЦПХ (стабилен не менее 2 дней). Оптимальный диапазон pH реакции составляет 4,0-5,0; линейность соблюдается в диапазоне концентраций ЦПХ 0,01 – 0,07 мг/мл [98].

Предложен метод определения следовых количеств ЦПХ в ЛП с использованием мицеллярной экстракции до точки помутнения. Метод основан на экстракции ЦПХ до точки помутнения в щелочной среде с использованием неионогенного ПАВ Triton X-114. Линейный отклик наблюдается в диапазоне концентраций ЦПХ 0,50-30 мкг/мл [153].

Методом твердофазной СФ разработана и валидирована методика

количественного определения ЦПХ в очищенных сточных водах и дезинфицирующих растворах. Метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений кремний-титановый ксерогель – пирокатехиновый фиолетовый – ЦПХ и позволяет определять содержание цетилпиридиния хлорида в интервале концентраций 0,01–0,56 мМ, предел обнаружения методики составляет 3,6 мкМ [46].

Одним из универсальных методов анализа фармацевтических субстанций, а также ЛП, является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), позволяющая одновременно проводить определение подлинности и количественного содержания действующих и вспомогательных компонентов.

В биологических объектах остаточное количество ЦПХ (МУК 4.1.2009-05) определяют методом ВЭЖХ после водно-спиртовой экстракции. Детектирование проводят при длине волны 260 нм, подвижная фаза - ацетонитрил и трифторуксусная кислота (80:20). Диапазон определяемых концентраций - 0,08 - 5 мг/кг, время удерживания - 8,7 мин [51].

Альтернативными условиями проведения ВЭЖХ при определении цетилпиридиния хлорида является использование колонки с силикагелем, связанным с цианпропилом (Nucleosil-CN) и подвижной фазы метиловый спирт: водный раствор тетрабутиламмоний бромида (45:55); время удерживания - 6 минут [51].

Для одновременной идентификации четвертичных аммониевых соединений (в том числе и ЦПХ) с другими действующими веществами в составе ЛПл предложен метод ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения [93].

Для количественной оценки некоторых четвертичных аммониевых соединений в составах пастилок, в том числе и цетилпиридиния хлорида, Taylet at al. разработали методику ВЭЖХ с УФ-детектированием, а также метода капиллярного электрофореза, с использованием 50 мМ фосфатного буфера (рН 3) [147].

Предложен метод ВЭЖХ для совместного определения ЦПХ и тетракаина гидрохлорида в буккальных таблетках. Условия анализа: подвижная фаза - метанол-гидроксид тетраметиламмония (20 мМ) - дигидрофосфат калия (3 мМ) (90: 10: 3), рН

среды 5,0, скорость потока 1,5 мл / мин, УФ-детектор (230 нм). Время удерживания ЦПХ 3,52 минут, линейность – 5-2000 мкг/мл, предел обнаружения и количественного определения 0,033 и 0,11 мкг/мл, соответственно [151].

Предложен селективный метод ВЭЖХ с применением диодно-матричного детектора для определения лидокаина гидрохлорида (214 нм) и ЦПХ (258 нм) при совместном присутствии в комбинированных ЛП (колонка Zorbax SB-C8; подвижная фаза - 0,05 М ортофосфорная кислота и ацетонитрил в условиях градиентного элюирования), время удерживания - 3,4 и 7,3 мин, соответственно [97].

Описаны валидированные методы ОФ-ВЭЖХ и ТСХ (метанол:ацетон:уксусная кислота (7:3:0,2), 215 нм) для совместного определения цетилпиридиния хлорида, хлоркрезола и лидокаина гидрохлорида в составе перорального антисептического геля. В методе ОФ-ВЭЖХ разделение компонентов смеси проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C8 (0,05% раствор фосфорной кислоты: ацетонитрил: метанол (15:24:61), 220 нм) [93].

Также представлены методики обращенно-фазной и гидрофильной ВЭЖХ (HPLC) с СФ-детектированием, разработанные для анализа комбинированных оральных антисептиков (гелей, пастилок, буккальных таблеток), содержащих цетилпиридиния хлорид, хлоркрезол и местные анестетики (тетракаин, лидокаин, бензокаин) [93, 97].

Разделение и количественное определение ароматических четвертичных аммониевых соединений (домифена бромида и ЦПХ) в косметических продуктах проводят методом ВЭЖХ с помощью катионообменного силикагелевого материала и УФ-СФ детектирования [100].

Метод ВЭЖХ был предложен для определения остаточного содержания ЦПХ в обработанных им яблоках. Метод включает ионообменную твердофазную экстракцию и использование стеарилпиридиния хлорида в качестве внутреннего стандарта. Предел количественного определения составил 0,5 мкг /мл ЦПХ [139].

Таким образом, в научной литературе приведено достаточно большое количество как химических, так и физико-химических методов анализа идентификации и количественного определения цетилпиридиния хлорида, в

основном эти методы представлены спектрофотометрическими методами и различными вариантами хроматографических методов.

1.4. Характеристика янтарной кислоты, применение в стоматологической практике

Развитие болезней пародонта связано с размножением пародонтопатогенной микрофлоры, вырабатывающей токсины, вызывающие нарушение микроциркуляции в тканях пародонта, что приводит к развитию воспаления в его тканях. Дисбаланс в системе свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты служит патогеническим фактором воспаления и дистрофических изменений в тканях пародонта. Результат окислительного стресса - усиленная продуктивность активных форм кислорода и азота, приводящая к гибели клеточных мембран.

Токсическое действие активных форм кислорода предотвращает антиоксидантная защита [38]. Поэтому в терапии воспалительных заболеваний пародонта применяют антиоксиданты, они ингибируют перекисные соединения и промежуточные продукты свободно-радикального окисления липидов, оказывают противовоспалительное действие, усиливают процессы регенерации, нормализуют процессы тканевого дыхания [10].

Среди антиоксидантов представляет интерес янтарная кислота (ЯК), процесс окисления которой в цикле Кребса позволяет сохранить энергосинтезирующую функцию митохондрий в условиях гипоксии; ее действие направлено на коррекцию энергетического и пластического обмена, защиту клеточных структур от перекисного и свободно-радикального окисления.

В связи с этим, в терапии заболеваний пародонта достаточно широко применяются препараты ЯК и ее солей - сукцинатов. В клинических исследованиях показано, что применение в лечении пародонтита трансмембранного диализа композиционного раствора ЯК снижает деструктивно-воспалительные процессы в тканях пародонта [39]. Линейка продуктов "MEXIDOL®dent" включает профилактические зубные пасты и ополаскиватели для полости рта с мексидолом

(этилметилгидроксипиридина сукцинатом), которые эффективно применяются при хроническом гингивите [77]. В работах Корниловой Н.В. показано, что применение мексидола при лечении хронического пародонтита вызывает существенное улучшение пародонтологического статуса больных [35]. Показана эффективность применения мексидола (полоскания, аппликации, зубные пасты) в терапии воспалительных заболеваний пародонта [40]. При применении мексидола в комплексной терапии у пациентов с кандидозом полости рта выяснено, что препарат нормализует бактерицидный и фунгицидный потенциал полости рта, повышает дезинтоксикационную функцию ротовой жидкости [13, 63].

Методом компьютерного моделирования [70] и в экспериментах *in vitro* было показано, что ЯК обладает антимикробным эффектом в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также грибов рода *Candida*. Антибактериальные механизмы органических карбоновых кислот полностью не выяснены, но их способность проявлять бактериостатические и бактерицидные свойства заключаются в сочетании прямого подкисления и внутриклеточной диссоциации молекулы кислоты. Бактерицидное действие связано с тем, что в недиссоциированном виде кислоты являются липофильными соединениями и могут диффундировать через клеточные мембраны патогенных микроорганизмов [90].

В Государственный реестр ЛС (по состоянию на 4 июля 2022 года) включены следующие ЛП и фармацевтические субстанции, прошедшие государственную регистрацию, и содержащие янтарную кислоту (таблица 1.3) [6].

Таблица 1.3 – Лекарственные препараты и субстанции, включенные в перечень Государственного реестра лекарственных средств, содержащие ЯК

№ п/п	Торговое наименование	Международное непатентованное наименование или группировочное (химическое) наименование	Форма выпуска	Наименование держателя регистрационного удостоверения лекарственного препарата	Страна держателя регистрационного удостоверения лекарственного препарата
1.	Цитофлавин®	Инозин+Никотинамид+Рибофлавин+ Янтарная кислота	раствор для внутривенного введения;	ПОЛИСАН НТФФ ООО	Россия
2.	Лимонтар	Янтарная кислота+[Лимонная	таблетки	Биотики МНПК	Россия

		кислота]	растворимые;	ООО	
3.	Янтарь-антитокс	Янтарная кислота	таблетки;	Томская фармацевтическая фабрика ООО	Россия
4.	Цитофлавин	Инозин+Никотинамид+Рибофлавин+ Янтарная кислота	таблетки покрытые кишечнорастворимой оболочкой;	ПОЛИСАН НТФФ ООО	Россия
5.	Когитум	Ацетиламиноянтарная кислота	раствор для приема внутрь;	Мэрион Меррелл С.А.	Франция
6.	Янтарная кислота	Янтарная кислота	субстанция;	Полисинтез ООО - Россия;	Россия
7.	Янтарная кислота	Янтарная кислота	субстанция;	Марбиофарм ОАО - Россия;	Россия

Доля препаратов ЯК не превышает 2%, при этом они в основном представлены таблетированными лекарственными формами и формами для парентерального применения системного действия.

Препараты, содержащие янтарную кислоту и ее соли, такие как «Ремаксол», «Цитофлавин», «Церекард», «Мексикор», включены в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП). Также ЯК и ее соли входят в состав пищевых добавок.

Сукцинаты выступают в роли солеобразующего компонента ЛП: «Реамберин», «Метопролол», «Мексипридол», «Церекард»; ЯК входит в состав комбинированного препарата для инфузий «Цитофлавин» и «Ремаксол», в состав таблеток «Лимонтар» [6].

Фармацевтическая компания «Фармасофт» выпускает ополаскиватели для полости рта и серию лечебно-профилактических зубных паст "MEXIDOL®dent". Создана фармацевтическая композиция, содержащая ЯК и антимикробный компонент хлоргексидин. Она проявляет бактерицидное действие в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, несмотря на незначительное содержание хлоргексидина (не более 1,0 мг), что объясняется потенцирующим антимикробным действием ЯК [59].

Представленные данные свидетельствуют о том, что на сегодняшний день отсутствуют инновационные стоматологические ЛФ с янтарной кислотой.

1.5. Методы качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты

Для подтверждения подлинности янтарной кислоты и ее солей - сукцинатов предложены химические реакции конденсации с резорцином и концентрированной серной кислотой, с пара-диметиламинобензальдегидом [23].

Для идентификации ЯК применяют метод ТСХ на силикагелевых пластинах в системе растворителей этилацетат - уксусная кислота - муравьиная кислота - вода (100:11:11:25), детектор - раствор бромкрезолового зеленого [23].

Количественное определение ЯК проводят методом кислотно-основного титрования в присутствии индикатора фенолфталеина либо потенциометрически.

В литературе описан СФ метод количественного определения ЯК с использованием в качестве внешнего стандарта раствора калия дихромата, т.к. характер спектра раствора кислоты в различных растворителях характеризуется неустойчивым максимумом и зависит от ее концентрации [69].

Разработана и валидирована методика фотометрического определения ЯК в видимой области спектра в растворе цитофлавина на основе перевода аналита избытком гидрохинона и концентрированной серной кислотой при нагревании в окрашенный дигидронафтазарин (5,8-диокси-2,3-дигидро-1,4-нафтахинон), экстрагируемый толуолом, 520 нм. Область определения – 25–250 мкг/мл [89].

Количественное определение содержания молочной, янтарной и бета-оксималяной кислот проводят ГХ методом с использованием насадочной колонки и внутреннего стандарта и экстракцией кислот диэтиловым эфиром [21, 22].

Оценку качества ЯК, обладающей гидрофильными свойствами, осуществляют методом обращенно-фазной ВЭЖХ с СФ детектированием (210 нм) в сильноокислых подвижных фазах (элюент - 0,2 М фосфатный буферный раствор (рН=2,6) или раствор ортофосфорной кислоты (рН=2-2,3)), время удерживания – 1,6 мин [25, 102].

Для количественного определения циннаризина и ЯК предложен градиентный режим хроматографирования методом ВЭЖХ [12]. Недостатком методики является ее длительность, время удерживания - 20,9 мин и использование токсического

растворителя метанола. Для сокращения времени удерживания ЯК было предложено использовать в качестве элюента раствор серной кислоты [69, 112].

Водный раствор хлорной кислоты (рН 2,10-2,15) был использован в качестве подвижной фазы для одновременного определения щавелевой, фумаровой, малеиновой и ЯК в фармацевтических субстанциях винной и яблочной кислот [122]. Патент РФ №2190214 описывает способ определения молочной кислоты в смеси с яблочной, малоновой, малеиновой, янтарной кислотами и др. методом ВЭЖХ [58]. В качестве сорбента используют сульфокатионообменник на основе сверхсшитого полистирола, элюент – 5-20 мМ серная кислота: ацетонитрил.

Для определения янтарной кислоты, рибоксина, никотинамида и рибофлавина при совместном присутствии в препарате «Церебронорм®» описан метод ион-парной ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования [41].

Методика ионно-эксклюзионной хроматографии способом градиентного элюирования подвижными фазами серная кислота и ацетонитрил позволяет разделить и совместно определить органические кислоты за 30 мин [123].

В пищевой продукции ЯК (ГОСТ Р 54375-2011) определяют после проведения реакции дериватизации – превращения кислоты в изопропиловый эфир, с последующим определением газохроматографическим методом (ГХ) с насадочной колонкой или методом капиллярной газожидкостной хроматографии [22].

Группой компаний «Люмэкс» разработана методика определения ЯК в пищевой продукции (МУП 04-47-2012) методом капиллярного электрофореза. Диапазон определяемых концентраций ЯК составляет $1,0 - 2,0 \times 10^4$ мг/л [50].

Таким образом, в контроле качества янтарной кислоты, преимущественно, используют различные варианты хроматографических методов анализа.

1.6. Перспективы фармацевтического анализа стоматологических лекарственных пленок

Разработка и производство на территории РФ доступных, качественных и безопасных лекарственных средств для профилактики и лечения заболеваний

является одной из первоочередных направлений отечественной фармацевтической отрасли [47, 65, 74].

В стоматологической практике традиционные способы введения ЛП в виде орошений, аппликаций или ирригаций имеют определенные сложности, связанные с их коротким периодом действия, также их сложно наносить на поверхность слизистой оболочки полости рта [29]. Поэтому перспективным направлением является применение аппликационных ЛФ – лекарственных пленок (ЛПл), особенно это актуально в детской стоматологии.

ЛПл относят к связнодисперсным системам с условно твердой дисперсионной средой и дисперсной фазой, которые работают по принципу пассивной диффузии веществ через слизистую оболочку благодаря градиенту концентраций по обе стороны полупроницаемой мембраны – слизистой оболочки [9]. Основным компонентом ЛПл является пленочная матрица, состоящая из веществ-пленкообразователей [16].

Терапевтическое действие ЛПл непосредственно связано со способом введения биологически активных веществ (БАВ) в полимерную основу, так как это влияет на степень и скорость их высвобождения [71]. БАВ в основу вводят в виде раствора, суспензии или эмульсии [17].

ЛПл по сравнению с традиционными стоматологическими ЛФ, имеют ряд преимуществ: снижение частоты применения; обеспечение пролонгированного действия и постоянства концентрации веществ в течение длительного времени; высокая адгезионная способность; газо- и паропроницаемость; соблюдение нормы рН тканей; индивидуализация терапии; простота и технологичность; безопасность, доступность [17].

Однако существуют некоторые ограничения и недостатки применения ЛПл: возможность взаимодействия БАВ с компонентами ЛПл; раздражение или контактная гиперчувствительность слизистых оболочек; при хранении ЛПл могут отсыревать или терять влагу; низкая скорость пассивной диффузии через слизистые оболочки; полимеры-пленкообразователи являются хорошей средой для размножения микроорганизмов [9, 17].

Однако, несмотря на все перечисленные ограничения, использование ЛПл в стоматологической практике считается перспективным, поскольку кроме защитной функции, они активизируют процессы регенерации слизистых оболочек полости рта.

Ассортимент лекарственных веществ в составе ЛПл для стоматологической практики представлен веществами антибактериального, противовоспалительного и анестезирующего действия, а также веществами ускоряющими регенерацию тканей [66]. Российскими производителями, компанией «НОРД–ОСТ» выпускается серия стоматологических ЛПл «Диплен–Дента» [26, 56, 62]; ЛПл «Диплен–Дента КПХ» содержит хлоргексидина биглюконат, антиоксидант – α -токоферола ацетат и нестероидный противовоспалительный препарат – кетопрофен [81].

Полимерные пленки «КП-пласт–антимикробный» обладают антибактериальным действием за счет содержания метронидазола и антисептика хлоргексидина [37]. Коллективом из Литвы разработан состав водорастворимых ЛПл, содержащих иммобилизованную протеазу и антимикробный препарат диоксидин, для лечения гнойно-некротических ран глубоких гнойных очагов в полости рта [64]. Алексеевой И. В. предложена технология и определены нормы качества антимикробных ЛПл с анилокаином, диоксидином и хлоргексидина биглюконатом [4]. Разработан состав и показана эффективность ЛПл с препаратом медицинской пиявки в терапии гингвита и пародонтита [8].

Активно ведутся исследования по разработке «фитопленок», в состав которых входят БАВ, полученные из лекарственного растительного сырья. Мизиной П. Г., Куркиным В. А. и соавторами был получен патент на линейку «фитопленок» на основе желатина, обладающих антимикробным, противовоспалительным и иммуномодулирующим действием [57]. Обоснован состав стоматологических ЛПл с настойкой женьшеня, экстрактами фиалки трехцветной, соком каланхоэ [43]. Получены ЛПл с экстрактами коры дуба, плодов черники и рябины черноплодной, обладающие кровоостанавливающей и противовоспалительной активностью [28].

Разработаны фитопленки, содержащие сухие экстракты из шалфея лекарственного, алоэ древовидного, тысячелистника обыкновенного, зверобоя продырявленного и др. [3]. Саморассасывающиеся лечебные пластины «КП-Пласт

фито», содержат экстракты ромашки, календулы и тысячелистника [37]. Фуриным В. А. предложен состав желатиновых пленок и шин с антибиотиками и экстрактами прополиса, календулы, шалфея, эвкалипта, ромашки для лечения инфекционно-септических процессов слизистой оболочки полости рта [45, 83]. Проведена стандартизация ЛПл на желатиновой основе, содержащих аскорбиновую кислоту и рутин [67].

Активно проводят исследования по включению в состав ЛПл антиоксидантов. В составе желатиновых шин Опарин С. В. [48] предложил использовать мексидол (10 мг/в 1 пленке). Лосенковой С. О. стандартизован трансдермальный пластырь с мексидолом [42].

Большое количество лекарственных пленок находится на начальных этапах разработки, что доказывает актуальность и перспективность применения в стоматологической практике. Их разработка оправдана удобством применения, экономичностью изготовления и требует внедрения новых технологий на этапе разработки и при контроле их качества.

Исследования по созданию единой нормативной документации по оценке качества ЛПл проводились в 90-е годы Государственным научно-исследовательским институтом по стандартизации и контролю ЛС МЗ СССР и Днепропетровским заводом медицинских изделий. В результате проведенных исследований был создан первый проект ОФС «Плѐнки полимерные лекарственные», который включал следующие испытания: описание, растворимость, средняя масса, микробное число и количественное определение [76]. Коллективом кафедры фармацевтической технологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», были проведены исследования по созданию и стандартизации ЛПл [16, 17].

В ГФ РФ IV издания впервые включена ОФС «Пленки», включающая их классификацию, особенности технологии и показатели качества ЛПл: описание, размеры пленки, однородность массы или однородность дозирования, распадаемость, растворение, остаточные органические растворители, потеря в массе при высушивании или вода, рН раствора, посторонние примеси, микробиологическая чистота, упаковка, маркировка, хранение [23].

ЛПл – однородные эластичные пластинки различной формы, цвет которых обусловлен окраской полимера, вспомогательных или действующих веществ [23]. При оценке качества пленок по показателю «Описание» визуально определяют форму, цвет, а при наличии запах, прозрачность. Геометрические размеры ЛПл фиксированы, так как они влияют на однородность дозирования, определяют степень адгезии и равномерный контакт соприкосновения [3, 17].

Показатель рН стоматологических пленок должен быть близок к физиологическому показателю смешанной слюны человека, значение которого находится в диапазоне рН 6,8–7,4 [52]. Испытание «Потеря в массе при высушивании» проводят в тех случаях, когда содержание воды в ЛПл может повлиять на биодоступность, стабильность действующих веществ или ЛФ. Данный критерий может являться показателем микробиологической чистоты и стабильности пленок при хранении.

ЛПл оценивают по показателю качественного и количественного содержания фармацевтических субстанций, входящих в их состав, используя физические, химические или физико-химические методы анализа. Методики стандартизации действующих веществ должны быть селективны, иметь высокую чувствительность, точность и воспроизводимость, должны быть валидированы [23].

На стадии производства и при хранении ЛПл могут быть контаминированы различными микроорганизмами, поэтому обязательным показателем качества является проведение испытания на микробиологическую чистоту [23].

ЛПл выпускают в первичной упаковке, которая предохраняет от внешних воздействий и обеспечивает стабильность в течение установленного срока годности. Хранение осуществляют в сухом, защищенном от света месте, при относительной влажности не более 50%, если нет других указаний.

Исходя из того, что в настоящее время отсутствует единая нормативная документация на стоматологические лекарственные пленки, целесообразно унифицировать требования и методики проведения исследования по разработке и нормированию показателей качества данной лекарственной формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Проведенный анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует об отсутствии универсального препарата для применения в терапии воспалительных заболеваний пародонта. На основе вышеизложенного считаем, что исследования по разработке и стандартизации стоматологической ЛПл, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, является перспективной задачей.

При создании новых комбинированных ЛФ повышаются требования к их качеству. Анализ литературы и нормативной документации показал, что основными методами анализа как ЦПХ, так и янтарной кислоты являются различные варианты хроматографии. Также в доступной научной литературе отсутствует информация о методах одновременного определения янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в ЛС. Поэтому необходимо систематизировать данные, предложить, разработать и валидировать новые методики оценки качественного и количественного содержания янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в ЛПл.

Материалы данной главы отражены в следующих работах:

1. 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.

2. 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.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

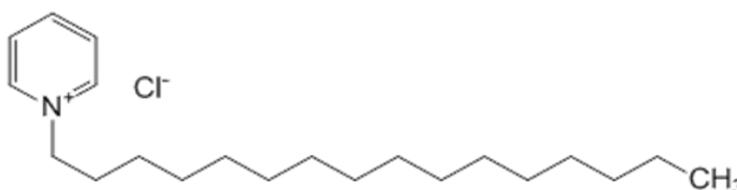
2.1. Объекты исследования

В качестве основных объектов исследования были выбраны:

Цетилпиридиния хлорид - ЦПХ (субстанция)

Химическое название: 1-гексадецил-пиридиний хлорида моногидрат

Структурная формула:



Молекулярная формула: $C_{21}H_{38}NCl \cdot H_2O$

Молярная масса: 358,01 г/моль

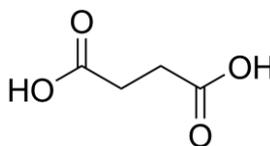
Описание: Белый или светло-бежевый мелкокристаллический порошок, без запаха, растворим в воде, этаноле, хлороформе. Температура плавления составляет 82,5-84,5° С, насыпная плотность 380 кг/м³.

Исследования проводили, используя субстанцию ЦПХ производства фирмы «Мерк» (Германия).

Янтарная кислота (субстанция)

Химическое название: этан-1,2-дикарбоновая (бутандиовая кислота)

Структурная формула:



Молекулярная формула: $C_4H_6O_4$

Молярная масса: 118,09 г/моль

Описание: Бесцветные кристаллы или порошок белого цвета, без запаха, растворимые в спирте, эфире и воде очищенной; не растворимы в бензоле, бензине, хлороформе. Температура плавления составляет 183° С. Водный раствор янтарной

кислоты (0,1 н) имеет значение рН 2,7.

Исследования проводили, используя субстанцию янтарной кислоты производства ООО “Полисинтез”, Россия.

Для проведения экспериментальной части исследования использовали вспомогательные вещества, реактивы и растворители, соответствующие по показателям качества требованиям действующей нормативной документации (таблица 2.1).

Таблица 2.1 - Перечень вспомогательных веществ, реактивов и растворителей, используемых в работе

Наименование вещества	Нормативная документация
Вспомогательные вещества	
Вода очищенная	ФС.2.2.0020.18
Глицерин (глицерол)	ФС.2.2.0006.15
Гидроксипропилметилцеллюлоза	ТУ 2231-001-71806407-2005
Желатин	ФС.2.1.0099.18
Метилцеллюлоза МЦ-35	ТУ 2231-107-57684455-2003
Натрий-карбоксиметилцеллюлоза С75	ТУ 6-55-39-90
Поливинилпирролидон среднемолекулярный	ФС 42-2238-98
Полиэтиленгликоль-400	ОФС.1.3.001.15
Поливиниловый спирт	ОФС.1.3.001.15
Реактивы	
Аммиак раствор концентрированный 25%	ОФС.1.3.001.15
Ацетон	ОФС.1.3.001.15
Ацетонитрил для хроматографии	ОФС.1.3.001.15
Гептан	ОФС.1.3.001.15
Изопропиловый спирт (2-Пропанол)	ОФС.1.3.001.15
Калия фосфат однозамещенный (калия дигидрофосфат)	ОФС.1.3.001.15
Серная кислота концентрированная	ОФС.1.3.001.15
Фосфорная кислота	ОФС.1.3.001.15
Тиобарбитуровая кислота (ТБК)	ОФС.1.3.001.15
Бутанол	ОФС.1.3.001.15

Уксусная кислота	ОФС.1.3.001.15
Трихлоруксусная кислота	ОФС.1.3.001.15
Спирт этиловый 95%	ОФС.1.3.001.15
Хлороформ	ОФС.1.3.001.15

2.2. Оборудование

В работе использовали лабораторную посуду, соответствующую требованиям ОФС.1.1.0022.18 «Мерная посуда» ГФ РФ XIV изд. [23].

Для взятия навесок применяли лабораторные электронные весы (серия АF), класс точности I специальный (ГОСТ 53228). Взвешивание реактивов и компонентов пленочных масс проводили с помощью весов лабораторных ВМ 510 («ОКБ Веста», Россия).

Определение рН осуществляли на рН метре – 150МИ («Измерительная техника ИТ», Россия). Электропроводность растворов определяли с помощью кондуктометра А-4120 («Инфраспек-Аналит», Россия), структурно-механические свойства пленочной массы изучали на ротационном вискозиметре типа «РВ-8» при температуре $20 \pm 1^\circ \text{C}$.

Термостатирование образцов проводили в термостате электрическом суховоздушном ТС-1/80 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Перемешивание осуществляли на лабораторном шейкере ELMi S-3.02L («ЭЛМИ», Латвия). В исследованиях использовали магнитную мешалку ПЭ-6100 («Экротхим», Россия). Центрифугирование проводили с помощью лабораторной центрифуги клинической ОПн – 3,02 («Дастан», Россия), и центрифуги лабораторной ПЭ-6926 (ООО «ТехОборудование», Россия).

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ – 56 («ЛОМО-СПЕКТР», Россия) в кварцевых кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Sorbfil» 10x20 см (Россия), марка – ПТСХ-АФ-А, аналитические (ТУ 26-11-17-89). Подложка – алюминиевая фольга, сорбент – силикагель СТХ-1А, зернение 5-17 мкм, толщина слоя 90-120 мкм, связующее – силиказоль.

В работе использован жидкостный хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), колонка Luna C18(2) 100A (4,6 ×250 mm, 5µm), в следующей комплектации: насос LC-20AD; вакуумный дегазатор; автодозатор SIL-20A; термостат колонок CTO-20A; диодноматричный детектор SPD-20A. Вода для приготовления подвижной фазы была получена с помощью системы очистки воды Simplicity («Millipore»).

Степень мутности клеточных суспензий измеряли с помощью денситометра DEN-18 производитель «BioSan» в пределах диапазона 0 – 6,0 единиц МакФарланда (McF) (0 – 180x10⁷ клеток/мл), с точностью измерения до 0,01 McF.

2.3. Методы исследования

Метод ТСХ

Определение проводили согласно ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» ГФ РФ XIV изд. [23].

Приготовление раствора янтарной кислоты (0,25%)

25 мг (точная навеска) субстанции янтарной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл этилового спирта, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали.

Приготовление раствора ЦПХ (0,1%)

25 мг (точная навеска) субстанции ЦПХ помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл этилового спирта, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали.

Приготовление стандартного раствора янтарной кислоты и ЦПХ (0,25% янтарной кислоты и 0,1% ЦПХ)

25 мг (точная навеска) субстанции ЦПХ и 62,5 мг (точная навеска) субстанции янтарной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл этилового спирта, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали.

Испытуемый раствор лекарственных пленок (0,25% янтарной кислоты и 0,1% ЦПХ)

К навеске измельченной пленочной массы, содержащей 2,5 мг янтарной

кислоты и 1 мг ЦПХ, прибавляли 1 мл этилового спирта, перемешивали на магнитной мешалке 10 минут, фильтровали.

На линию старта хроматографической пластинки марки «Сорбфил» наносили микрошприцем в виде пятен, диаметром 2 – 5 мм, по 2 мкл соответствующих испытуемых растворов. Элюирование проводили восходящим способом в камере, предварительно насыщенной системой растворителей. После того, как фронт растворителей достигал линии финиша, пластинку вынимали, высушивали и детектировали.

Приготовление растворов детекторов проводили согласно ОФС.1.3.001.15 «Реактивы. Индикаторы» [23].

Расчёт элюирующей способности бинарной системы растворителей с разным соотношением компонентов проводили по формуле 2.1:

$$\varepsilon_{ab} = \varepsilon_a^0 + \frac{\lg \left(N_b 10^{\frac{\alpha}{n_b(\varepsilon_a^0 - \varepsilon_b^0)}} + 1 - N_b \right)}{\alpha n_b} \quad (2.1)$$

значение N_b вычисляли по формуле 2.2:

$$N_b = \frac{\%B \left(\frac{1}{V_b} \right)}{\%B \left(\frac{1}{V_b} \right) + \%A \left(\frac{1}{V_a} \right)} \quad (2.2)$$

где, N_b – мольная доля более сильного растворителя;

ε_a^0 и ε_b^0 - элюирующая способность этилацетата и этилового спирта соответственно;

V_a , V_b – объем этилацетата и этилового спирта соответственно, мл;

α – активность сорбента, (равная 0,8 для силикагеля);

n_b - постоянная величина, равная 10;

$\%A$, $\%B$ – объемные доли этилацетата и этилового спирта в растворе.

Метод ВЭЖХ

Метод ВЭЖХ с диодноматричным детектированием осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная

жидкостная хроматография» ГФ РФ XIV изд. [23].

Элюент: смесь на основе ацетонитрила и 0,1% водного раствора фосфорной кислоты.

Приготовление 0,1% водного раствора фосфорной кислоты осуществляли согласно ОФС.1.3.001.15 «Реактивы. Индикаторы» ГФ РФ XIV изд. [23].

Условия хроматографирования

Градиентный режим: начальное элюирование в течение 8 минут с использованием подвижной фазы с минимальной долей ацетонитрила (2%), затем линейно увеличивали долю ацетонитрила с 2 до 85% за 10 минут. Скорость потока составила 1 мл/мин, температура термостата колонки 30°C.

Для оценки разрешающей способности и воспроизводимости хроматографической системы по критериям: время удерживания компонентов; эффективность хроматографической колонки; фактор асимметрии пика; относительное стандартное отклонение площади пика были использованы стандартные растворы янтарной кислоты и ЦПХ с концентрациями 125 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно.

Хроматографическую систему перед началом анализа кондиционировали не менее 30 минут до достижения стабильной базовой линии.

Валидацию разработанной аналитической методики проводили в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 ГФ РФ XIV изд. [23].

Для исследования линейности были приготовлены исходные растворы:

Приготовление исходного раствора янтарной кислоты

Навеску 0,12565 г субстанции янтарной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 25 мл воды очищенной, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали.

Приготовление исходного раствора цетилпиридиния хлорида (ЦПХ)

Навеску 0,05075 г субстанции ЦПХ помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 25 мл воды очищенной, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали.

Для исследования правильности и прецизионности были приготовлены модельные смеси на основе растворов плацебо, в которые вводили известные количества янтарной кислоты и ЦПХ.

Приготовление испытуемого раствора лекарственных пленок

Около 0,10 г измельченной пленочной массы (плацебо) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 15 мл подвижной фазы (начальный состав), нагревали на водяной бане (40-50° С) до полного растворения, охлаждали до комнатной температуры. Добавляли 1,0 мл исходного раствора и доводили объем до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр (размер пор 0,45 мкм).

Приготовление стандартного раствора янтарной кислоты и ЦПХ

Около 80 мг (точная навеска) субстанции янтарной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 15 мл подвижной фазы (начальный состав). Доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А).

Около 65 мг (точная навеска) субстанции ЦПХ помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 15 мл подвижной фазы (начальный состав). Доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор Б).

Получение ЛПл

В стеклянных стаканах объемом 50 мл или 100 мл предварительно готовили растворы полимеров: рассчитанное количество полимера (таблица 2.2) отвешивали на технических весах, добавляли воду очищенную, оставляли для набухания, затем при необходимости нагревали до температуры 37-40° С, гомогенизировали. Затем отвешивали необходимое количество пластификатора, вводили при перемешивании в раствор полимера.

При перемешивании добавляли расчетное количество водного раствора, содержащего действующие вещества. Затем проводили деаэрацию в вакуум-сушильном шкафу. Для получения плёнок применяли метод полива пленочной массы на подложку с последующей сушкой при комнатной температуре в течение 48-72 часов.

Таблица 2.2 – Составы модельных растворов пленкообразователей

Номер состава	NaКМЦ, г	ГМЦ, г	МЦ, г	ПВС, г	Желатин, г	Глицерин, г	Воды до
1	0,3	-	-	-	-	0,5	10 мл
2	-	0,3	-	-	-	0,5	10 мл
3	-	-	0,3	-	-	0,5	10 мл
4	-	-	-	0,3	-	0,5	10 мл
5	-	-	-	-	0,3	0,5	10 мл
6	0,5	-	-	-	-	0,5	10 мл
7	-	0,5	-	-	-	0,5	10 мл
8	-	-	0,5	-	-	0,5	10 мл
9	-	-	-	0,5	-	0,5	10 мл
10	-	-	-	-	0,5	0,5	10 мл
11	0,7	-	-	-	-	0,5	10 мл
12	-	0,7	-	-	-	0,5	10 мл
13	-	-	0,7	-	-	0,5	10 мл
14	-	-	-	0,7	-	0,5	10 мл
15	-	-	-	-	0,7	0,5	10 мл

Определение органолептических (визуальных) показателей

Визуально оценивали внешний вид пленок, форму, окраску, запах, прозрачность, эластичность; наличие механических включений и микротрещин определяли под микроскопом.

Определение размеров ЛПл

Геометрические размеры пленки (длину, ширину и толщину) измеряли с помощью микрометра с ценой деления 0,01 мм (МК 50, ГОСТ6507), в центре и по краям в двух точках в средней пробе.

Прочность на излом

Определяли повторным складыванием ЛПл в одном и том же месте пленки до разрыва. Сколько раз пленка складывается, не нарушая целостности, это и является значением прочности на излом.

Определение рН

Определение проводили потенциометрически, в соответствии с ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», метод 3, ГФ РФ XIV изд. [23].

Навеску ЛПл массой 0,1 г растворяли в 50 мл воды очищенной, свободной от диоксида углерода, при комнатной температуре, перемешивали до полного

растворения пленочной массы, регистрировали величину рН водного раствора.

Однородность массы (средняя масса) ЛПл

Испытание проводили путем взвешивания каждой из 20 ЛПл по отдельности, с точностью 0,001 г в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» ГФ РФ XIV изд. [23].

Однородность дозирования

Испытание проводили в каждой из 10 отобранных единицах ЛПл согласно ОФС.1.4.2.0008.1 «Однородность дозирования» ГФ РФ XIV изд., способ 1 [23], в условиях испытания «Количественное определение», метод ВЭЖХ.

Определение остаточной влажности

Определение проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» ГФ РФ XIV изд. [23].

Около 0,1 г (точная навеска) ЛПл помещали в предварительно высушенный до постоянной массы бюкс и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C до постоянной массы.

Определение адгезивной способности

Для оценки адгезивной способности пленку размером 5×5 см помещали на обезжиренную горизонтальную поверхность, накрывали стеклом заданной площади так, чтобы между пленкой и стеклом не было воздуха. Для придавливания к стеклу пленки воздействовали грузом массой 50 г в течение 30 минут. Стекло, с помощью рычажного механизма, было соединено с чашей весов, на которую последовательно помещали груз различной массы. В ходе испытания фиксировали массу, при которой происходил отрыв стекла от пленки.

Расчеты проводили по формуле 2.3:

$$P = mxg/S \quad (2.3)$$

где, m – масса груза, кг; g – ускорение свободного падения, м/с²; S – площадь пленки, м². Адгезию выражали в Па.

Структурно-механические свойства пленочной массы

Структурно-механические свойства пленочной массы изучали на ротационном вискозиметре типа «РВ-8» при температуре (20±1)° С, в пределах

измерения вязкости - от 0,5 до 10^6 Па·с; напряжения сдвига - от 5 до 10^4 Па в интервале температур от 60 до 150° С.

При высоте уровня дисперсной системы равной $70 \cdot 10^{-3}$ м, константа ротационного вискозиметра составляет $16,4 \cdot 10^3$, предельное напряжение сдвига (предел текучести) дисперсных систем вычисляли по формуле 2.4:

$$\theta = 16,4 \times 10^3 (P_1 - P_0) \quad (2.4)$$

где, P_1 – минимальный груз, при котором начинается вращение внутреннего цилиндра вискозиметра, когда между цилиндрами прибора помещается пластичная дисперсная масса, кг; P_0 – сопротивление трения, кг;

По результатам опытов строили графики зависимости скорости вращения цилиндра (N, об/с) от величины груза (P).

Определение осмотической активности

Осмотическую активность определяли методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану, в качестве которой использовали целлофановую пленку марки «Купрофан» толщиной 45 мкм. Предварительно целлофановую пленку замачивали в воде очищенной в течение 24 часов.

Методика испытания: около 0,1 г (точная навеска) ЛПл помещали в диализную трубку диаметром 20 мм, дном которой служила целлофановая пленка (предварительно замоченная в воде очищенной в течение 24 часов). Цилиндр опускали в сосуд с 50 мл воды очищенной, при этом мембрана была погружена в воду очищенную на глубину до 3 мм. Полученную систему выдерживали в термостате при температуре 36 - 37° С.

Цилиндр с образцом и мембраной взвешивали до начала опыта, а затем через каждые 10 мин с момента начала опыта. Количество адсорбированной воды определяли гравиметрическим методом, результат выражали в процентах относительно первоначальной массы пленки.

Определение адсорбционной активности

Около 0,3 г ЛПл (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 200 мл с притертой пробкой. Прибавляли 100 мл водного раствора метиленового синего с концентрацией 0,0001 г/мл, перемешивали в течение 60

минут на шейкере с частотой 140 колебаний в минуту. Содержимое колбы и исходный раствор метиленового синего (без пробы) фильтровали через беззольный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата. По 5 мл полученных фильтратов испытуемого и контрольного растворов метиленовой сини помещали в мерные колбы вместимостью 50 мл, доводили объем до метки водой очищенной и измеряли оптическую плотность при длине волны 667 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм относительно воды очищенной.

Содержание адсорбированного метиленового синего (в г) рассчитывали по формуле 2.5:

$$X = \frac{(A_x - A) \times 100 \times C}{A_x \times a} \quad (2.5)$$

где, A_x - величина оптической плотности исходного раствора метиленовой сини после фильтрации;

A - величина оптической плотности полученного раствора метиленовой сини после фильтрации;

C – концентрация исходного раствора метиленовой сини, г/мл;

100 – объем раствора метиленовой сини, взятого на сорбцию, мл;

a – масса навески ЛПл, г.

Определение высвобождения янтарной кислоты и ЦПХ из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Изучение высвобождения действующих веществ из испытуемых образцов ЛПл оценивали согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных ЛФ» ГФ РФ XIV изд. [23]. О высвобождении активных веществ судили по их концентрации в пробе, используя разработанные методики количественного определения действующих веществ в ЛПл.

Параллельно изучали высвобождение действующих веществ с кондуктометрическим контролем, опираясь на ОФС.1.2.1.0020.15 «Электропроводность» ГФ РФ XIV изд. [23]. Через равные промежутки времени измеряли удельную электрическую проводимость раствора (κ , мкСм/см) при 20° С. По результатам эксперимента строили графики динамики высвобождения действующих веществ из образцов ЛПл.

Определение антимикробного и антиокислительного действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Исследование антимикробной и антиокислительной активности, микробиологической чистоты модельных образцов ЛПл были проведены на базе лабораторий ЦНИЛ и экспериментально-биологической клиники (вивария) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Определение микробиологической чистоты ЛПл

Испытание на микробиологическую чистоту ЛПл проводили двуслойным агаровым методом согласно ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» ГФ РФ XIV изд. [23].

Определение антимикробного действия ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Определение бактериостатического и фунгистатического действия в условиях *in vitro* проводили в условиях испытания на микробиологическую чистоту согласно ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» ГФ РФ XIV изд. [23] методом серийных разведений в жидких питательных средах и методом диффузии в агар (метод "агаровых пластин").

Метод диффузии в агар

При определении бактериостатического действия использовали соево-казеиновый агар, фунгистатической активности – агар Сабуро. В 100 мл растопленной и охлажденной до 45° С соответствующей питательной среды вносили по 1 мл взвеси тест-микроорганизмов, содержащей 10⁸ микробных тел/мл и разливали по 20 мл в чашки Петри. В застывшем агаре формировали лунки диаметром 1,0 см металлическим цилиндром и вносили ЛПл, массой 0,04 г, добавляли по 5 капель стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Чашки выдерживали 1 час при комнатной температуре, затем инкубировали в термостате. Антимикробное действие определяли по величине зоны задержки роста микроорганизмов (мм) путем измерения расстояния от края лунки до границы роста микроорганизмов.

Метод серийных разведений в жидких питательных средах

Определение антимикробного действия экспериментальных образцов проводили в отношении штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus* штамм 209, *Escherichia coli* штамм M-17, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 4/1 и *Candida albicans* штамм 18/1.

Одну ЛПл (размером 1x2 см), содержащую кислоту янтарную и ЦПХ, растворяли при нагревании в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида на водяной бане при температуре 40⁰ С, раствор охлаждали и доводили тем же растворителем до метки в мерной колбе объемом 25 мл. Далее готовили ряды разведений в соотношениях (1:10, 1:100, 1:1000). Аналогично в тех же условиях готовили серию разведений, используя ЛПл «плацебо», не содержащую действующие вещества.

В стерильные пробирки отмеряли по 0,9 мл каждого разведения. В каждую пробу вносили по 0,1 мл предварительно подготовленной взвеси суточной культуры одного из микроорганизмов: бульонные культуры бактерий, выращенные на мясо-пептоном бульоне и *Candida albicans*, выращенную на жидкой среде Сабуро, разведенные в стерильном физиологическом растворе, который доводили до мутности 0,5 по Мак – Фарланду ($1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл).

Для контроля роста микроорганизмов в стерильные пробирки без определяемых веществ вносили по 0,9 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида и по 0,1 мл тест – культуры. В каждую пробирку вносили 9 мл мясо-пептонового бульона или среды Сабуро соответственно используемой культуре микроорганизмов.

Пробирки инкубировали в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 72 ч – для грибов, после чего определяли антимикробную эффективность по изменению прозрачности пробы визуально и измеряли с помощью денситометра DEN-18 степень мутности клеточных суспензий. Параллельно измеряли мутность растворов клеточных суспензий без внесения действующих веществ (контроль бактерий) и растворов питательных сред (контроль сред).

Определение общей антиокислительной активности (ОАА)

Определение проводили СФ - методом по методике Волчегорского И. А. с

соавторами [91].

Реактивы: 1) 28% водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), содержащий ЭДТА (трилон Б) в концентрации 0,1%; 2) 1% раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 50% водном растворе уксусной кислоты; 3) 0,04 М Na-фосфатный буфер приготовленный на 0,9% растворе NaCl (pH= 7,4).

Методика определения: в две пробирки вносили по 1,8 мл изотонического натрий-фосфатного буфера (pH=7,4). В одну из пробирок (контроль на окисляемость) последовательно добавляли 1 мл раствора ТХУ с ЭДТА, 0,2 мл гомогената и 0,2 мл исследуемого раствора ЛПл.

Во вторую пробирку (опытную) вносили те же количества раствор гомогената и тестируемый раствор, пробирку инкубировали в условиях доступа воздуха при 37° С в течение 60 минут, после чего липопероксидацию останавливали добавлением 1 мл ТХУ с ЭДТА. Параллельно оценивали окисляемость используемого гомогената (контроль на окисляемость) в отсутствие исследуемого раствора (вместо него в пробирки вносили по 0,2 мл натрий-фосфат

Предварительно одну ЛПл, размером 1x2 см, содержащую кислоту янтарную и ЦПХ, растворяли при нагревании в изотоническом натрий-фосфатном буфере (pH=7,4), на водяной бане при температуре не более 400 С. Раствор охлаждали и доводили тем же растворителем до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, фильтровали через бумажный фильтр «белая лента». Из фильтрата готовили ряды разведений в соотношениях (1:10, 1:100, 1:1000). ного буфера, в остальном ход определения не менялся).

В пробах определяли содержание ТБК-РП: регистрировали оптическую плотность полученных растворов при длине волны 532 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм относительно контрольного раствора, содержащего все реактивы. Определение ОАА проводили в 5 параллельных пробах.

ОАА оценивали по степени подавления липопероксидации *in vitro* в присутствии тестируемого раствора, выражая результат расчетов в процентах от соответствующих значений контроля на окисляемость:

$$OAA = \left(1 - \frac{(A_{o,60} - A_{o,0})}{A_{k,60} - A_{k,0}}\right) \times 100\% \quad (2.6)$$

где, $A_{o,60}$ и $A_{o,0}$ – значения оптической плотности через 60 минут инкубации и на «нулевой» момент времени для проб, содержащих извлечение ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ;

$A_{o,60}$ и $A_{o,0}$ - значения оптической плотности через 60 минут инкубации и на «нулевой» момент контрольных проб;

Примечание: Получение гомогената проводили, используя головной мозг лабораторных крыс, который гомогенизировали в 0,9 % растворе натрия хлорида. Полученную суспензию освобождали от крупных частиц центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант дополнительно фильтровали через два слоя марли, перед проведением ТБК-теста гомогенат разводили средой выделения до конечной концентрации 20 %.

Определение противоперекисной активности

Определение проводили спектрофотометрическим методом Королюка [36], используя раствор молибдата аммония. Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс жёлтого цвета.

Реактивы: 1) 0,03% раствор перекиси водорода; 2) 4 % раствор аммония молибдата.

Методика: в опытную пробирку вносили 2 мл свежеприготовленного 0,03% раствора перекиси водорода, 100 мкл выделенной суспензии нейтрофилов (в концентрации $5 \cdot 10^9$ клеток/мл) и 0,1 мл раствора ЛПл.

Предварительно одну ЛПл, размером 1x2 см, содержащую кислоту янтарную и ЦПХ растворяли при нагревании в изотоническом 0,9 % растворе натрия хлорида на водяной бане при температуре 40° С, раствор охлаждали и доводили тем же растворителем до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, фильтровали через бумажный фильтр «белая лента». Из фильтрата готовили ряды разведений в соотношениях (1:10, 1:100, 1:1000).

В контрольный раствор отмеряли 2,1 мл воды очищенной и 100 мкл суспензии

нейтрофилов. В качестве холостой пробы использовали раствор, состоящий из 2 мл 0,03% раствора пероксида водорода и 0,2 мл воды очищенной. Подготовленные таким образом растворы инкубировали при 37° С в течение 10 минут, а затем в каждую пробирку вносили по 1 мл 4% раствора аммония молибдата. Интенсивность окрашивания образовавшегося пероксомолибдат-иона измеряли при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Измерения проводили относительно контрольной пробы. Определение проводили в 5 параллельных пробах.

Величину противоперекисной активности, рассчитывали по формуле 2.7:

$$AOA = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100\% \quad (2.7)$$

где, A_1 - оптическая плотность в холостом опыте;

A_2 - оптическая плотность исследуемого раствора.

Примечание: Выделение нейтрофилов проводили, используя кровь доноров мужского пола в возрасте 20 – 22 лет. Все манипуляции для предотвращения активации нейтрофилов проводили при 4° С. Использовали фиколл-урографин с плотностью $\rho = 1,077$ г/см³ и $\rho = 1,119$ г/см³. Вначале создавали двойной градиент фиколл-урографина: первым в пробирку вносили раствор фиколл-урографина ($\rho = 1,119$ г/см³), затем на него аккуратно наслаивали раствор фиколла ($\rho = 1,077$ г/см³). Гепаринизированную кровь наслаивали на двойной градиент фиколл-урографина, центрифугировали 45 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования получали кольца мононуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (нижнее). Полученное кольцо мононуклеарных клеток удаляли. Нейтрофильное кольцо отбирали, переносили в чистую пробирку, со средой, не содержащей ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} . Клетки дважды отмывали путем центрифугирования при 1500 об/мин 10 мин. Количество нейтрофилов в клеточной суспензии подсчитывали в камере Горяева с использованием метиленового синего в уксусной кислоте 3%. Концентрация нейтрофилов составляла $5 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Статистическая обработка результатов эксперимента и валидация аналитических методик

Статистическую обработку результатов физико-химических исследований проводили согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ РФ XIV изд.

Статистический анализ лабораторных исследований в условиях *in vitro* проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica v. 6.0 for Windows». Для количественных показателей рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку, для сравнения средних значений применяли критерий непараметрической статистики Манна-Уитни.

Хроматографическую информацию обрабатывали с помощью программного обеспечения «LabSolutions».

Валидационную оценку результатов экспериментов разработанных методик проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV изд. [23].

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

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

На первом этапе исследования была изучена подвижность янтарной кислоты в чистых растворителях с различной полярностью. Растворители подбирались с учетом их доступности и относительно низкой токсичности. Испытания проводили по методике, приведенной в главе 2 «Объекты и методы исследования», используя спиртовой раствор янтарной кислоты.

На основании экспериментальных данных был составлен ряд подвижности янтарной кислоты на сорбенте - силикагеле в присутствии различных растворителей (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Ряд подвижности янтарной кислоты на сорбенте силикагеле

№ п/п	Растворитель	Диэлектрическая проницаемость	Значение фактора удерживания (Rf) янтарной кислоты, $X_{ср} \pm \Delta X$ (n=3)
1.	толуол	2,3	0,00
2.	хлороформ	4,8	0,00
3.	этилацетат	6,0	0,00
4.	бензол	2,3	0,05 \pm 0,02
5.	пиридин	12,9	0,05 \pm 0,02
6.	диэтиловый эфир	4,2	0,45 \pm 0,05
7.	изоамиловый спирт	15,2	0,65 \pm 0,08
8.	н-бутиловый спирт	17,8	0,72 \pm 0,08
9.	ацетонитрил	37,5	0,74 \pm 0,06
10.	ацетон	20,7	0,80 \pm 0,06
11.	этиловый спирт (95%)	24,5	0,80 \pm 0,05
12.	уксусная кислота (безводная)	6,2	0,84 \pm 0,04
13.	ДМФА	36,5	0,90 \pm 0,06
14.	вода	78,5	0,96 \pm 0,04
15.	аммиак (водный)	16,5	0,98 \pm 0,06

Из полученных данных следует, что величина значения фактора удерживания (Rf) янтарной кислоты равная 0,4 – 0,7 наблюдалась при

использовании растворителей с величиной диэлектрической проницаемости растворителя не более 20.

Приготовить систему растворителей с заданной элюирующей способностью возможно путем смешивания растворителей с разной полярностью. На основании полученного элюотропного ряда выбрана бинарная система растворителей: этилацетат – этиловый спирт, и рассчитана элюирующая способность данной системы при различном соотношении более полярного растворителя - этилового спирта.

Расчёт элюирующей способности выбранной бинарной системы растворителей с разным соотношением компонентов проводили по формуле, приведенной главе 2 «Объекты и методы исследования». Расчетные числовые данные приведены в таблице 3.2.

Зависимость элюирующей способности бинарной системы растворителей этилацетат : этиловый спирт от содержания более полярного растворителя (этилового спирта) представлена на рисунке 3.1.

Из теоретических расчетов элюирующей способности бинарной системы следует, что введение более полярного растворителя, этилового спирта, вызывает сначала резкое увеличение элюирующей способности исследуемой системы растворителей (в объемной концентрации до 20%).

Однако последующее возрастание его концентрации практически не изменяет свойств системы, носит асимптотический характер, что согласуется с литературными данными [14]. Крутизна начального подъема экспоненциальной кривой тем больше, чем больше различия в полярности обоих растворителей.

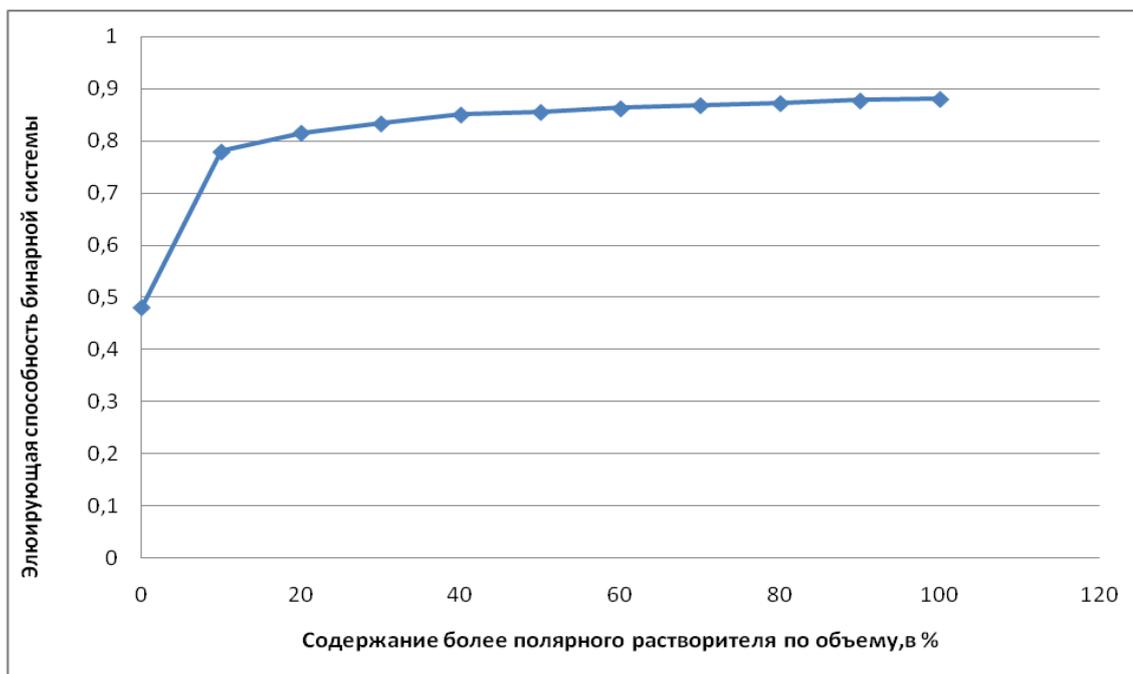


Рисунок 3.1 – Зависимость элюирующей способности бинарной системы растворителей этилацетат : этиловый спирт от содержания этилового спирта

Далее проводили экспериментальное определение подвижности янтарной кислоты в системе растворителей этилацетат : этиловый спирт путем хроматографирования, детектирование осуществляли 0,1% спиртовым раствором метилового красного.

Результаты определения величины значения фактора удерживания (R_f) янтарной кислоты приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Результаты определения элюирующей способности бинарной системы растворителей и значения фактора удерживания янтарной кислоты

Соотношение растворителей этилацетат : этиловый спирт	Рассчитанная элюирующая способность системы растворителей	Значение R_f янтарной кислоты. $X_{ср} \pm \Delta X (n=3)$
90:10	0,78	$0,76 \pm 0,05$
80:20	0,82	$0,80 \pm 0,03$
70:30	0,83	$0,81 \pm 0,06$
60:40	0,85	$0,81 \pm 0,03$
50:50	0,85	$0,82 \pm 0,03$
40:60	0,86	$0,82 \pm 0,06$
30:70	0,87	$0,83 \pm 0,05$
20:80	0,87	$0,83 \pm 0,06$
10:90	0,88	$0,84 \pm 0,05$
0:100	0,88	$0,85 \pm 0,04$
100:1	0,48	0,00

Практическими хроматографическими исследованиями установлено, что повышение концентрации этилового спирта, как более полярного растворителя, приводит к увеличению значения фактора удерживания (R_f) янтарной кислоты (рисунок 3.2), но только в малых его концентрациях (в объемной концентрации примерно до 20%), что было ранее подтверждено теоретическими расчетами элюирующей способности бинарной системы растворителей.

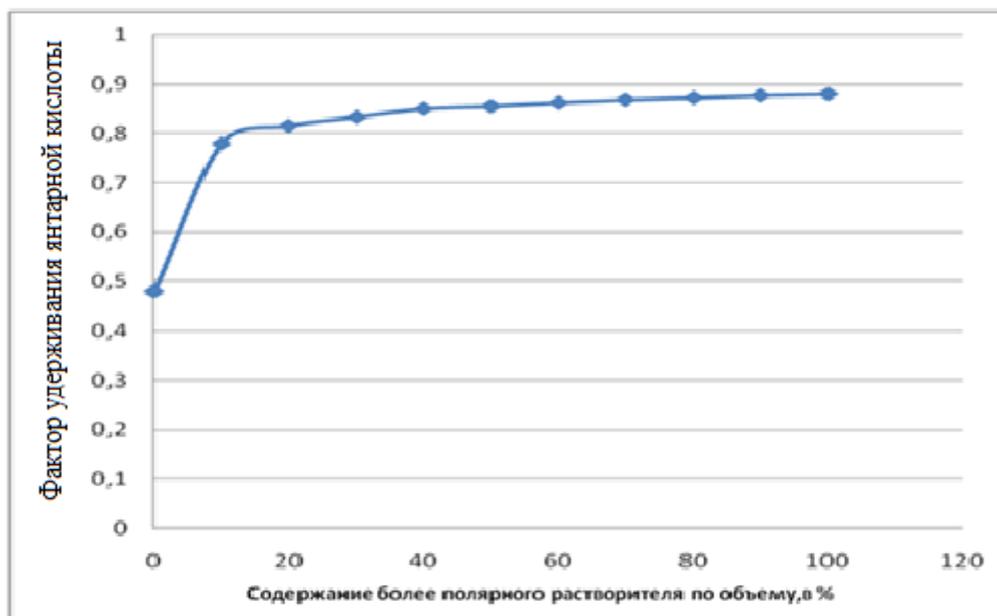


Рисунок 3.2 – Зависимость фактора удерживания (R_f) янтарной кислоты в бинарной системе растворителей этилацетат : этиловый спирт от содержания этилового спирта

Таким образом, используя только элюотропный ряд растворителей теоретически можно подобрать подвижную фазу с заданной элюирующей способностью.

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований системой растворителей для определения подлинности янтарной кислоты методом ТСХ является бинарная система этилацетат : этиловый спирт в объемном соотношении растворителей 80:20. Детектирование янтарной кислоты необходимо осуществлять 0,1% спиртовым раствором метилового красного, приготовленного по ОФС 1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы» [23]. Значение фактора удерживания (R_f) янтарной кислоты в данных условиях равно $0,80 \pm 0,03$.

Поскольку перед нами стояла задача разработать методику определения подлинности янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии методом ТСХ, то на следующем этапе исследования было проведено хроматографирование раствора ЦПХ в подобранных выше условиях. Для нанесения на хроматографические пластинки использовали спиртовой раствор ЦПХ, детектирование осуществляли реактивом Драгендорфа, поскольку спиртовой раствор метилового красного не был эффективен при обнаружении ЦПХ (методика приготовления растворов изложена в главе 2 «Объекты и методы исследования»).

На хроматограмме наблюдали появление желто-оранжевой зоны адсорбции на линии старта ($R_f=0$), что соответствует зоне адсорбции ЦПХ, поэтому в систему растворителей был добавлен третий компонент - раствор аммиака концентрированный, применяемый в составе элюирующих систем при определении четвертичных аммониевых солей методом ТСХ.

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что оптимальной трехкомпонентной системой растворителей для оценки подлинности ЦПХ является система: этилацетат: этиловый спирт: раствор аммиака концентрированный (в объемном соотношении 80:20:20). Поскольку дальнейшее увеличение концентрации раствора аммиака не приводит к значительному увеличению значения коэффициента подвижности ЦПХ, который в данный условиях равен $0,60 \pm 0,05$.

На следующем этапе исследования был проведен подбор детектора, для одновременной идентификации янтарной кислоты и ЦПХ в системе растворителей: этилацетат: этиловый спирт: раствор аммиака концентрированный (80:20:20). С этой целью были приготовлены 0,1% спиртовые растворы сульфоталеиновых индикаторов: фенолового красного, тимолового синего, бромфенолового синего, бромкрезолового пурпурового, бромтимолового синего, которыми были обработаны пластины, после нанесения на них и хроматографирования стандартного раствора, содержащего янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Растворы индикаторов были приготовлены согласно требованиям ОФС 1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы» ГФ РФ XIV изд. [23].

В ходе проведенных исследований в качестве детектора был выбран 0,1% раствор бромфенолового синего, на хроматограмме были получены две зоны адсорбции, резко отличающиеся по цвету: светло-желтая (янтарная кислота) и темно-синяя (ЦПХ). Следовательно, была подобрана система растворителей и детектор, для проведения совместного ТСХ-анализа.

На следующем этапе исследования для совместной оценки подлинности янтарной кислоты и ЦПХ в составе ЛПл, было проведено хроматографирование спиртового извлечение из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ. Параллельно на пластину наносили стандартный раствор, содержащий ЦПХ и янтарную кислоты.

Для идентификации янтарной кислоты в ЛПл, в которой она находится в виде соли – сукцината, было предложено предварительно выдерживать ЛПл в камере, насыщенной парами концентрированной хлористоводородной кислоты в течение 5 мин.

Результаты хроматографического ТСХ-анализа показывают, что в подобранных условиях происходит полное разделение действующих веществ ЛПл, и зоны адсорбции янтарной кислоты и ЦПХ по величине и интенсивности совпадают с зонами адсорбции их образцов сравнения.

На основании проведенных экспериментальных исследований была разработана методика качественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ТСХ-анализа.

Подробное описание методики приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственную пленку, содержащую янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, в разделе «Подлинность, метод ТСХ» (Приложение 2).

Основные хроматографические параметры методики совместного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Хроматографические параметры методики совместного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ТСХ

	Условия проведения испытания
--	------------------------------

Пластинка	ТСХ пластинка со слоем силикагеля F ₂₅₄ .
Подвижная фаза (ПФ)	этилацетат – этиловый спирт – раствор аммиака концентрированный 80:20:20
Детектор	0,1% спиртовой раствор бромфенолового синего, на хроматограмме наблюдают две зоны адсорбции: светло-желтая (янтарная кислота) и темно-синяя (ЦПХ)

Валидацию методик испытания на подлинность согласно ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV изд. проводят только по одной характеристике «Специфичность методики» [23].

«Специфичность» разработанной методики ТСХ определяли, оценивая подлинность янтарной кислоты и ЦПХ хроматографированием извлечений из ЛПл, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ, и хроматографированием стандартного раствора янтарной кислоты и ЦПХ. Зоны адсорбции янтарной кислоты и ЦПХ в извлечении из ЛПл, совпадают с зонами адсорбции их образцов сравнения.

При хроматографировании пленки «плацебо», не содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, не было обнаружено зон адсорбции, соответствующих зонам адсорбции янтарной кислоты или ЦПХ.

Разработанная хроматографическая методика совместного качественного определения янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в ЛПл включена в проект Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка на десну, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид», в раздел «Подлинность, метод ТСХ» (Приложение 2).

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

Выбор подвижной фазы и способа элюирования

Высокоэффективная жидкостная хроматография является одним из наиболее универсальных фармакопейных методов анализа многокомпонентных лекарственных форм.

Выбор условий хроматографического разделения действующих компонентов разрабатываемого лекарственного средства проводили на обращенно-фазной колонке Luna C18(2) 100A (4,6 × 250 mm, 5 μm).

При выборе состава подвижной фазы и способа элюирования учитывали физико-химические свойства разделяемых компонентов. Янтарная кислота является гидрофильным соединением, поэтому слабо удерживается на колонке с обращенно-фазным сорбентом. Гидрофобный характер ЦПХ, связанный с наличием в структуре молекулы протяженной углеводородной цепи, обуславливает его сильное сродство к неподвижной фазе C18.

В качестве элюента была выбрана смесь на основе ацетонитрила и 0,1 % водного раствора фосфорной кислоты. Выбор «кислого» элюента связан с необходимостью перевода янтарной кислоты в молекулярную (неионизированную) форму, что способствует ее лучшему удерживанию на обращенно-фазном сорбенте. Принимая во внимание слабое удерживание янтарной кислоты на неполярном сорбенте, были опробованы подвижные фазы с концентрацией ацетонитрила на уровне 2, 3 и 5%.

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 3.3).

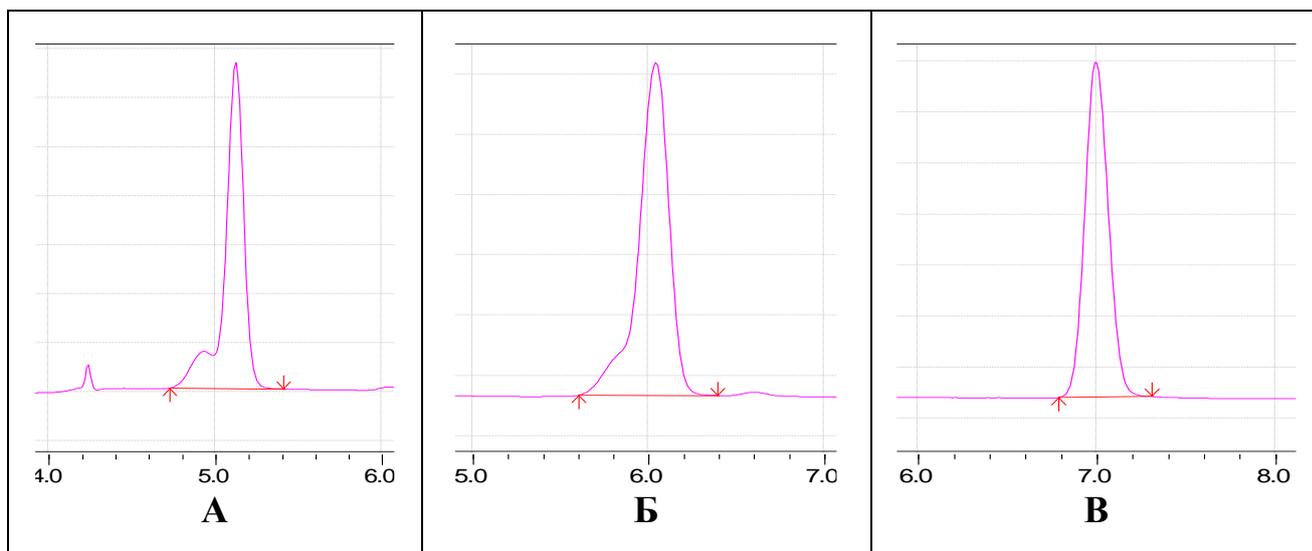


Рисунок 3.3 – Хроматограммы раствора янтарной кислоты (концентрация 125 мкг/мл) при использовании подвижной фазы с содержанием ацетонитрила: 5% (А), 3% (Б) и 2% (В)

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 мин с использованием подвижной фазы с минимальной долей ацетонитрила. Затем для элюирования гидрофобного ЦПХ линейно увеличивали долю ацетонитрила с 2% до 85% за 10 минут. Скорость потока составила 1 мл/мин, температура термостата колонки 30° С.

В подобранных условиях янтарная кислота и ЦПХ элюировались в виде симметричных пиков со временем удерживания 7,37 мин и 15,67 мин, соответственно.

На рисунках 3.4 – 3.5 представлены хроматограммы стандартного раствора, содержащего 125 мкг/мл янтарной кислоты и 50 мкг/мл ЦПХ, и испытуемого раствора ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.

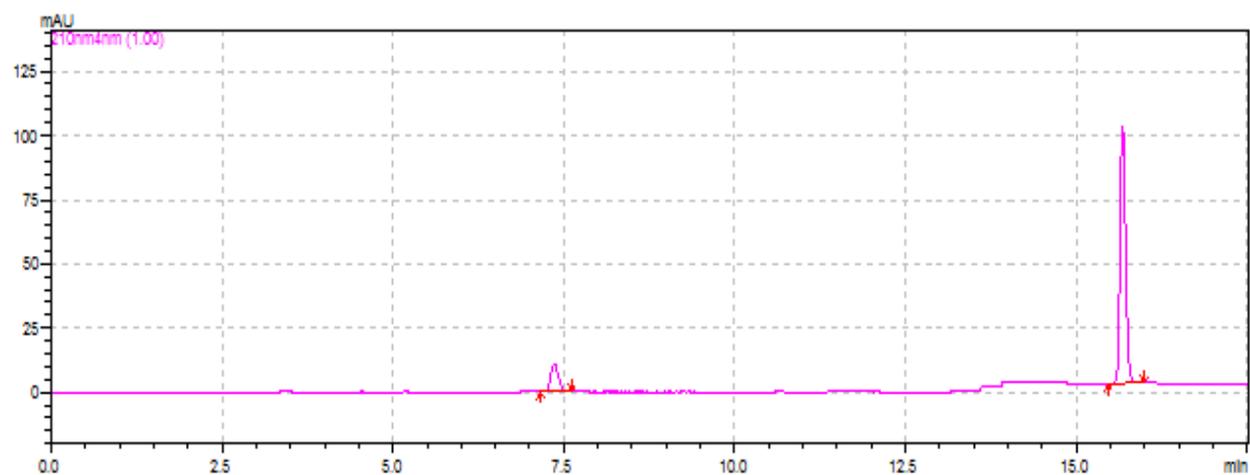
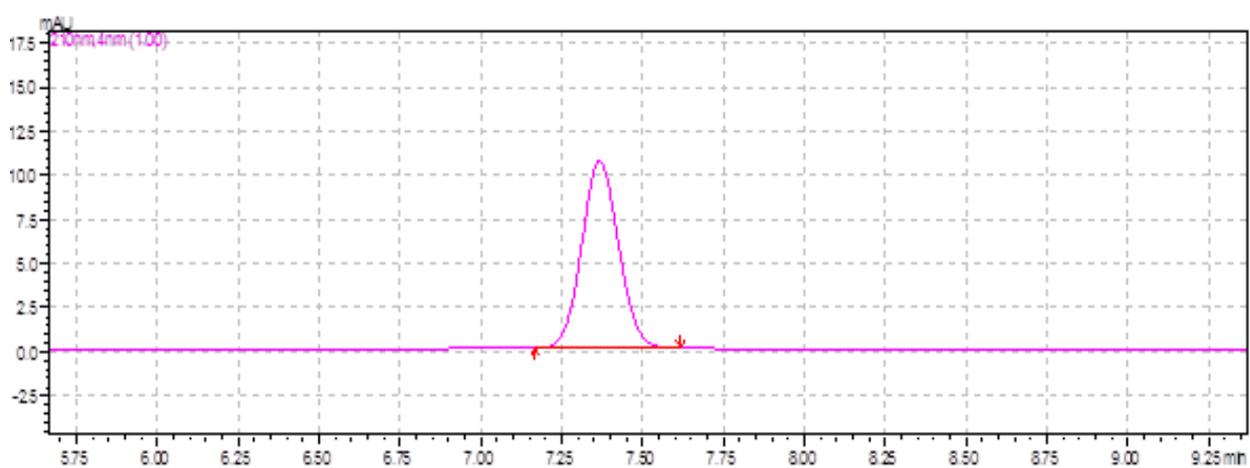
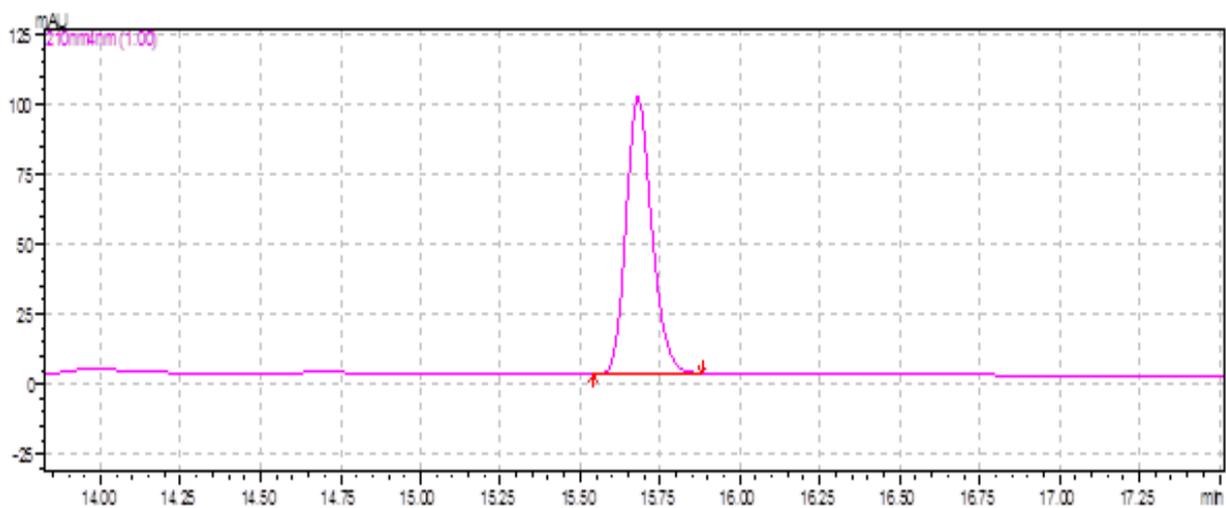
**А****Б****В**

Рисунок 3.4 – Хроматограмма стандартного раствора, содержащего янтарную кислоту и ЦПХ (А), хроматографические пики янтарной кислоты (Б) и ЦПХ (В)

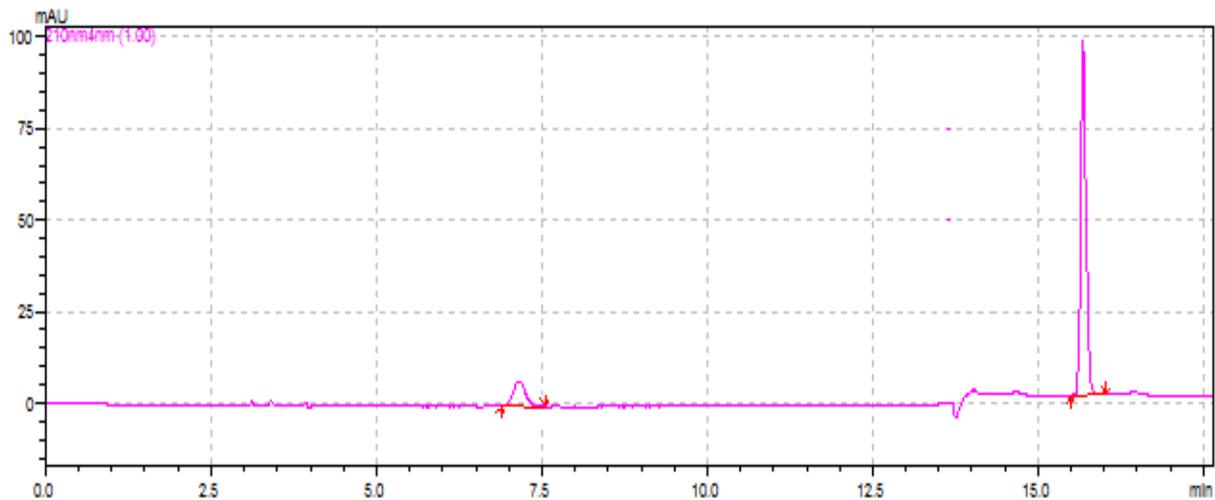


Рисунок 3.5 – Хроматограмма испытуемого раствора ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Выбор длины волны детектирования

На рисунках 3.6 – 3.7 представлены УФ - спектры янтарной кислоты и ЦПХ в подвижной фазе. 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 длине волны 214 нм и 258 нм.

Учитывая значительное поглощение обоих соединений при 210 нм, данная длина волны была выбрана в качестве общей волны детектирования янтарной кислоты и ЦПХ.

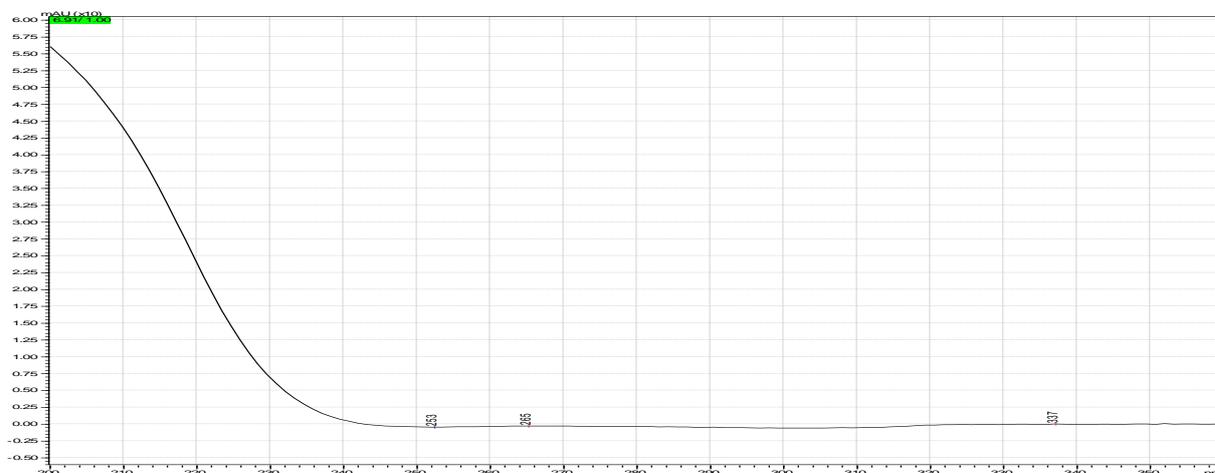


Рисунок 3.6 – УФ - спектр янтарной кислоты в подвижной фазе

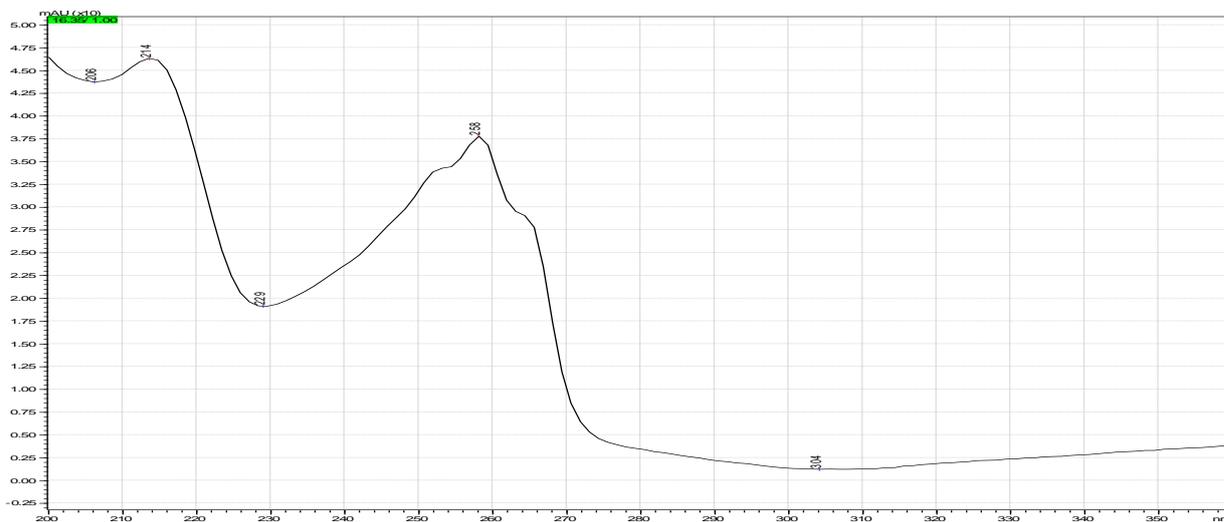


Рисунок 3.7 – УФ - спектр ЦПХ в подвижной фазе

Оценка пригодности хроматографической системы

Для оценки разрешающей способности и воспроизводимости хроматографической системы были проведены соответствующие тесты с использованием стандартного раствора янтарной кислоты и ЦПХ с концентрациями 125 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно.

После пятикратного инжестрирования 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 (ТТ), коэффициент разрешения.

Средние значения данных параметров, а также значения относительного стандартного отклонения (RSD,%) представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Параметры пригодности хроматографической системы при определении янтарной кислоты и ЦПХ методом ВЭЖХ

Параметры хроматографической системы	Янтарная кислота	ЦПХ
Время удерживания, мин	7,37	15,66
	7,37	15,67
	7,38	15,66
	7,37	15,66
	7,37	15,68

	X _{ср.} 7,37 RSD,% 0,05	X _{ср.} 15,67 RSD,% 0,06
Площадь хроматографического пика	77425	500689
	77449	501209
	77389	500704
	77319	500644
	77620	500715
	X _{ср.} 77440 RSD,% 0,14	X _{ср.} 500792 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 (пределы от 0,8 до 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 ЦПХ не превышают 1,0%, что удовлетворяет требованиям воспроизводимости [23].

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

Хроматографические параметры методики

На основании проведенных экспериментальных исследований была разработана методика оценки качественного и количественного содержания янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, содержащей

янтарную кислоту и ЦПХ, методом ВЭЖХ. Хроматографические параметры разработанной методики ВЭЖХ – определения приведены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Хроматографические параметры методики оценки содержания янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ

Условия проведения испытания	
Колонка	Luna C18(2) 100A (4,6 ×250 mm, 5µm)
Температура колонки	30 °С
Скорость потока	1 мл/мин
Режим хроматографирования	градиентный, в течение 8 минут с использованием подвижной фазы с минимальной долей ацетонитрила (2%), затем увеличивают долю ацетонитрила с 2 до 85% за 10 минут
Детектор	спектофотометрический, аналитическая длина волны 210 нм
Объем пробы	10 мкл
Время хроматографирования	18 мин

Методика, после проведения валидационной оценки, может быть включена в проект Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка на десну, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид», в разделы «Подлинность, метод ВЭЖХ», и «Количественное содержание» (Приложение 2).

3.3. Валидация методики качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в лекарственной пленке методом ВЭЖХ

Валидацию разработанной методики качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в лекарственной пленке методом ВЭЖХ проводили в соответствии с требованиями ОФС «Валидация аналитических методик» XIV изд. [23].

Определение специфичности методики

На хроматограммах, полученных после инъекций растворителя, раствора

пленки «плацебо» (раствор из лекарственной пленки, не содержащей янтарную кислоту и ЦПХ) отсутствовали хроматографические пики, имеющие одинаковые времена удерживания с хроматографическими пиками янтарной кислоты и ЦПХ соответствующих стандартных растворов.

Хроматограмма раствора пленки «плацебо» (раствора вспомогательных компонентов ЛПл) представлена на рисунке 3.8.

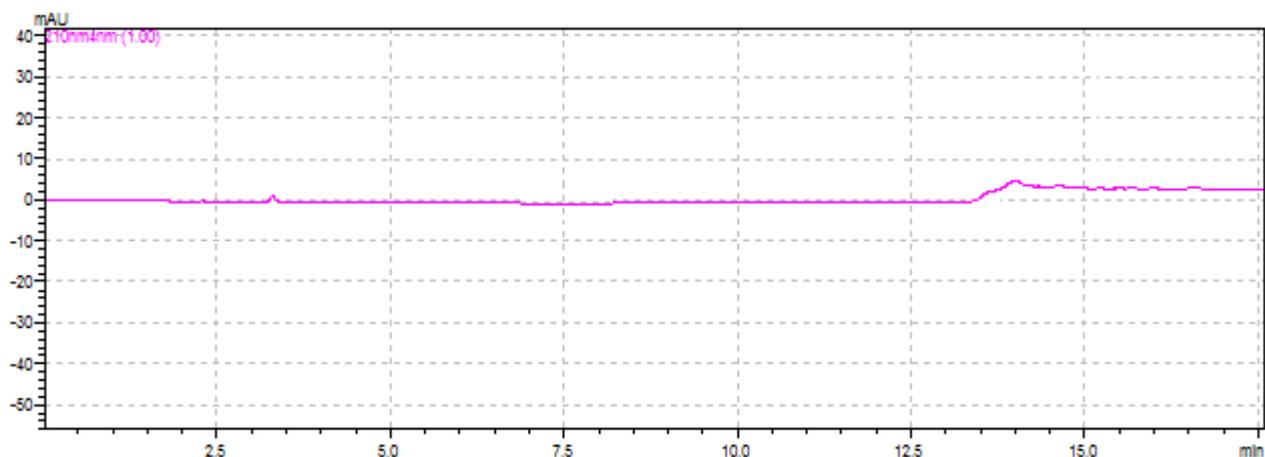


Рисунок 3.8 – Хроматограмма раствора пленки «плацебо»

Таким образом, разработанные условия ВЭЖХ являются специфичными и могут использоваться для одновременного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ, согласно условиям разработанной методики.

Определение линейность методики

Линейность методики была исследована для янтарной кислоты и ЦПХ на семи уровнях концентраций (в диапазоне от 70 % до 130 % от номинальной концентрации соединений в испытуемом растворе).

Приготовление исходных растворов янтарной кислоты и ЦПХ приведено в главе 2 «Объекты и методы исследования». Путем соответствующих разведений из исходных растворов были приготовлены *рабочие калибровочные растворы* для определения линейности методики с концентрациями:

– для янтарной кислоты 87,96; 100,52; 113,09; 125,65; 138,22; 150,78 и 163,35 мкг/мл;

– для ЦПХ 35,53; 40,60; 45,68; 50,75; 55,83; 60,90 и 65,98 мкг/мл. Растворителем для калибровочных растворов являлся начальный состав подвижной фазы.

Каждый из рабочих калибровочных растворов хроматографировался трижды в разработанных условиях методики, по результатам определения рассчитывалась средняя площадь хроматографического пика. Хроматографические данные для построения калибровочного графика количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ методом ВЭЖХ представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Хроматографические данные для построения калибровочного графика количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ методом ВЭЖХ

Соединение	Концентрация калибровочного раствора, мкг/мл	Площадь хроматографического пика (среднее из 3 определений)
Янтарная кислота	87,96	53908
	100,52	61753
	113,09	69276
	125,65	77437
	138,22	84738
	150,78	91856
	163,35	100220
ЦПХ	35,53	350760
	40,6	399056
	45,68	450321
	50,75	500534
	55,83	550806
	60,90	599216
	65,98	650602

На основании полученных данных строили калибровочные графики рабочих калибровочных растворов янтарной кислоты и ЦПХ, полученные графики представлены на рисунках 3.9 – 3.10.

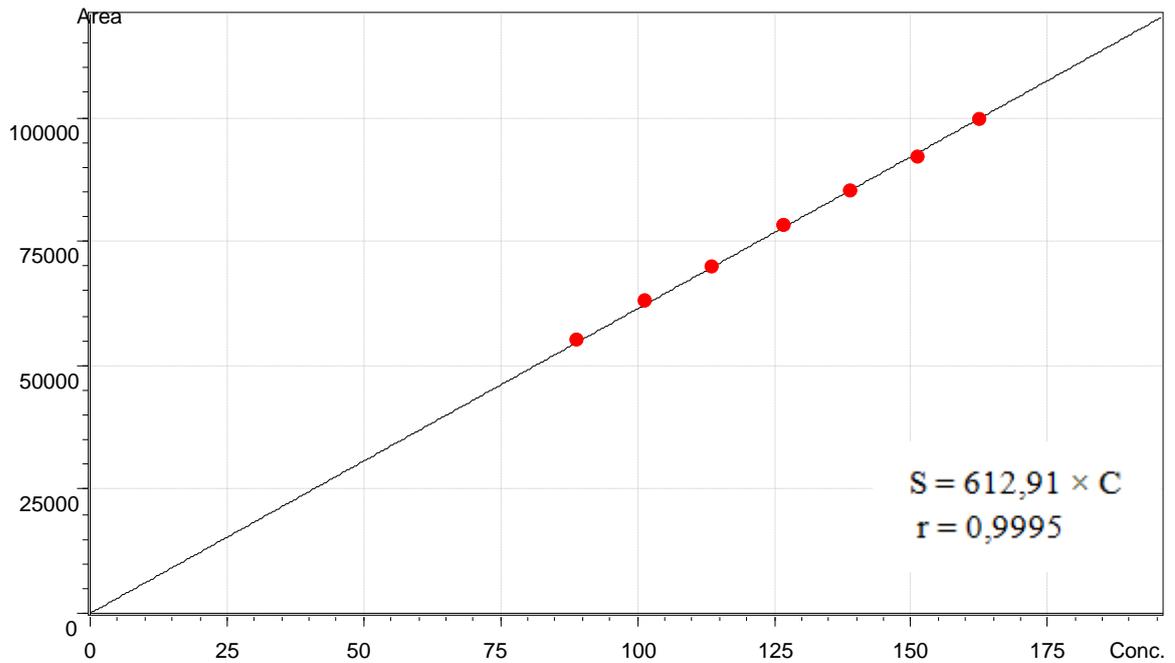


Рисунок 3.9 – Калибровочный график количественной оценки янтарной кислоты методом ВЭЖХ в условиях разработанной методики

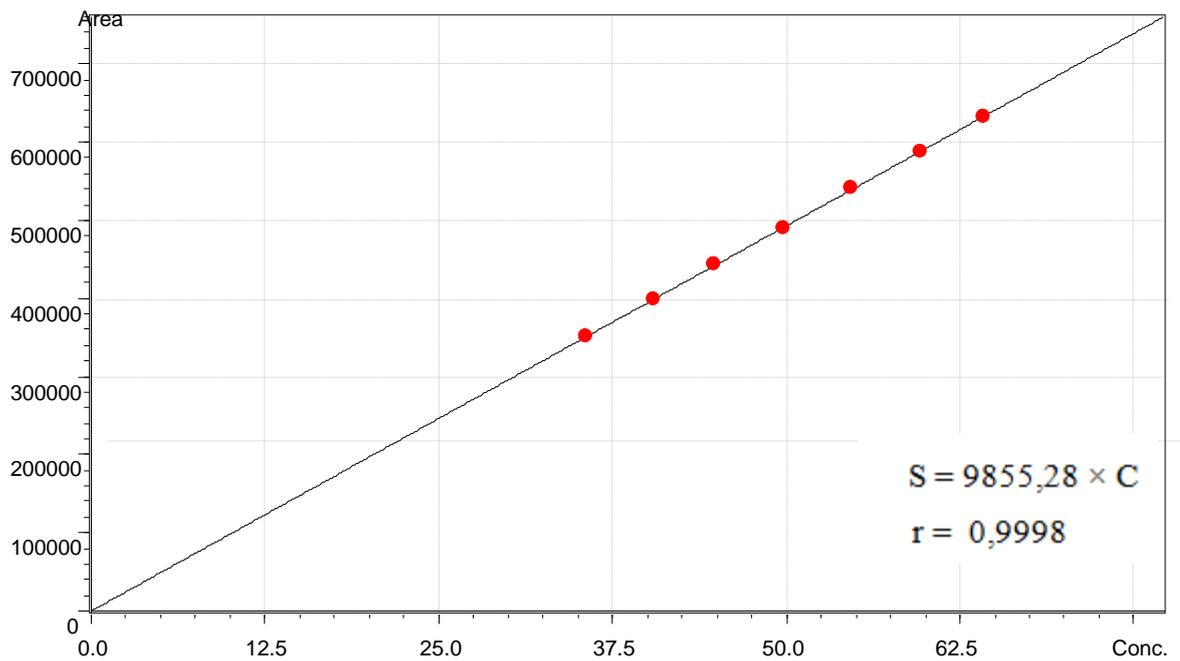


Рисунок 3.10 – Калибровочный график количественной оценки ЦПХ методом ВЭЖХ в условиях разработанной методики

Уравнения линейной зависимости калибровочных графиков имели вид: $S = 612,91 \times C$ (для янтарной кислоты) и $S = 9855,28 \times C$ (для цетилпиридиния хлорида), 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 удовлетворяет требованиям к линейности методики.

Правильность методики

Правильность разработанной хроматографической методики определяли путём анализа модельных смесей на основе растворов «плацебо», в которые вводили известные количества янтарной кислоты и ЦПХ. Для этого готовили по три модельных раствора на основе лекарственной пленки «плацебо» с добавлением известных количеств янтарной кислоты и ЦПХ на трех уровнях концентраций: 80, 100 и 120% от номинального содержания действующих веществ в испытуемом растворе лекарственного средства (всего было приготовлено девять растворов).

Приготовление модельных растворов из ЛПл

Точные навески янтарной кислоты и ЦПХ (массы навесок приведены в таблицах 3.7 и 3.8) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 15 мл воды очищенной. Доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали (исходный раствор).

Приготовление испытуемого раствора из ЛПл, а также приготовление стандартного раствора янтарной кислоты (раствор А) и ЦПХ (раствор Б) изложено в главе 2 «Объекты и методы исследования».

2,0 мл раствора А и 1,0 мл раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 25 и доводили объем до метки растворителем.

Хроматографировали стандартный раствор и модельные растворы, получая для каждого образца не менее 3 хроматограмм.

Количественное содержание X (мкг/мл) янтарной кислоты в модельных растворах рассчитывали по формуле 3.1:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 2}{S_0 \times 50 \times 25} \quad (3.1)$$

где, S – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме модельного раствора;
 S_0 – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме стандартного раствора;
 a_0 – навеска янтарной кислоты, в миллиграммах.

Количественное содержание X (мкг/мл) ЦПХ в модельных растворах рассчитывали по формуле 3.2:

$$X = \frac{S \times a_0}{S_0 \times 50 \times 25} \quad (3.2)$$

где, S – площадь пика ЦПХ на хроматограмме модельного раствора;
 S_0 – площадь пика ЦПХ на хроматограмме стандартного раствора;
 a_0 – навеска ЦПХ, в миллиграммах.

Результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в модельных растворах представлены в таблицах 3.7 – 3.8.

Таблица 3.7 – 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 3.8 – 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 (отношение рассчитанной концентрации к номинальной концентрации вещества в модельном растворе, в $\%$). Рассчитывали метрологические характеристики – стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение ($RSD, \%$), доверительный интервал среднего значения результата определения (ΔX).

Статистическая обработка результатов количественного анализа янтарной кислоты и ЦПХ в модельных смесях при определении правильности разработанной методики ВЭЖХ – анализа представлена в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Статистическая обработка результатов количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в модельных смесях при определении правильности методики

Вещество	Открываемость, $R, \%$	Метрологические характеристики открываемости ($P = 0,95; n = 9$)			
		\bar{x}	SD	RSD	$\Delta \bar{x}$
Янтарная кислота	99,23	99,90	0,67	0,67	0,52
	98,91				
	98,96				
	100,28				
	100,19				
	100,09				

	100,47				
	100,51				
	100,48				
ЦПХ	100,07	99,71	0,51	0,51	0,40
	100,17				
	100,32				
	99,09				
	99,66				
	100,12				
	99,24				
	98,93				
	99,80				

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, полученные результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ методом ВЭЖХ не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики

Прецизионность методики ВЭЖХ оценивали путем исследования сходимости результатов, 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. Объектом исследования была одна экспериментальная серия ЛПл, содержащая янтарную кислоту и ЦПХ.

Каждый из аналитиков готовил серию из 6 испытуемых растворов и проводил количественное определение действующих компонентов лекарственной пленки с помощью разработанной методики. Приготовление испытуемого раствора из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид, а также приготовление стандартных растворов янтарной кислоты (раствор А) и ЦПХ (раствор Б) изложено в главе 2 «Объекты и методы исследования».

Расчет количественного содержания (X , мг) действующих компонентов ЛПл проводили в пересчете на среднюю массу лекарственной пленки по формулам 3.3 – 3.4:

для янтарной кислоты:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 2 \times 25 \times P}{S_0 \times 50 \times 25 \times a} \quad (3.3)$$

где, S – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме стандартного раствора;

a_0 – навеска янтарной кислоты, в миллиграммах;

a – навеска пленочной массы, в миллиграммах;

P – средняя масса лекарственной пленки, в миллиграммах.

для ЦПХ:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 25 \times P}{S_0 \times 50 \times 25 \times a} \quad (3.4)$$

где, S – площадь пика ЦПХ на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика ЦПХ на хроматограмме стандартного раствора;

a_0 – навеска ЦПХ, в миллиграммах;

a – навеска пленочной массы, в миллиграммах;

P – средняя масса лекарственной пленки, в миллиграммах.

Результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ВЭЖХ, а также результаты их статистической обработки представлены в таблицах 3.10 – 3.12.

Таблица 3.10 – Результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ВЭЖХ при оценке прецизионности методики (результаты 1-го анализатора)

№ определения	Навеска пленочной массы, г	Площадь пика янтарной кислоты в испытуемом растворе (среднее из 3 определений)	Рассчитанное содержание янтарной кислоты, мг	Площадь пика ЦПХ в испытуемом растворе (среднее из 3 определений)	Рассчитанное содержание ЦПХ, мг
1	0,11355	84313	2,44	580728	1,05
2	0,10420	78322	2,47	563362	1,11
3	0,11286	83114	2,42	588194	1,07
4	0,09934	73762	2,44	522570	1,08
5	0,10169	76126	2,46	529979	1,07
6	0,10408	78548	2,48	532296	1,05

Навеска янтарной кислоты для приготовления стандартного раствора: 80,67 мг
Площадь пика янтарной кислоты в стандартном растворе (среднее 3 определений): 79538
Навеска ЦПХ для приготовления стандартного раствора: 64,45 мг
Площадь пика ЦПХ в стандартном растворе (среднее 3 определений): 508551
Средняя масса ЛПл – 0,081 г.

Таблица 3.11 – Результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ВЭЖХ при оценке прецизионности методики (результаты 2-го аналитика)

№ определения	Навеска пленочной массы, г	Площадь пика янтарной кислоты в испытуемом растворе (среднее из 3 определений)	Рассчитанное содержание янтарной кислоты, мг	Площадь пика ЦПХ в испытуемом растворе (среднее из 3 определений)	Рассчитанное содержание ЦПХ, мг
1	0,12073	90024	2,45	623245	1,06
2	0,10081	76705	2,50	530231	1,08
3	0,09777	73796	2,48	519003	1,09
4	0,10300	76176	2,43	536733	1,07
5	0,10715	78593	2,41	568795	1,09
6	0,10423	78672	2,48	543143	1,07

Навеска янтарной кислоты для приготовления стандартного раствора: 81,24 мг
Площадь пика янтарной кислоты в стандартном растворе (среднее 3 определений): 80111
Навеска ЦПХ для приготовления стандартного раствора: 65,29 мг
Площадь пика ЦПХ в стандартном растворе (среднее 3 определений): 515109
Средняя масса ЛПл – 0,081 г.

Таблица 3.12 – 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	
Критерий Фишера (P=0,95, n=6)		5,05	

Результаты проведенного исследования показали, что относительные стандартные отклонения среднего результата каждого из аналитиков не превышают 2 %, при определении янтарной кислоты относительное стандартное отклонение среднего результата – 1,22 % и 1,87 % при определении ЦПХ, что свидетельствует о прецизионности методики.

Расчетные значения критерия Фишера меньше табличного значения 5,05 (P=0,95, n=6) при определении янтарной кислоты и ЦПХ, что подтверждает статистическую незначимость между результатами количественного анализа действующих веществ ЛПл двух аналитиков.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

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.

2. 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 и могут быть внесены в проект нормативной документации на данную ЛФ в раздел «Подлинность, метод ТСХ» (Приложение 2).

3. 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.

4. 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 (среднее значение для янтарной кислоты – 1,15, ЦПХ – 1,28).

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.

4. Проведена валидационная оценка методики качественной оценки 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. 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 оценивали 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 не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики доказана как сходимость результатов, получаемых одним аналитиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня, и 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.

5. Результаты разработки и валидации методики качественного и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ВЭЖХ свидетельствуют о пригодности методики и могут быть внесены в проект нормативной документации на данную ЛФ в разделы «Подлинность, метод ВЭЖХ» и «Количественное содержание» (Приложение 2).

Материалы данной главы отражены в следующих работах:

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. 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. 75-88.3. 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.

**ГЛАВА 4. НОРМИРОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И
ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЁНКИ,
СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ**

4.1. 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 выбран ЦПХ; компонент для коррекции процессов свободно-радикального окисления в тканях пародонта – янтарная кислота.

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.

С целью выявления возможного физико-химического влияния янтарной кислоты на противомикробные свойства ЦПХ было проведено изучение противомикробного действия ЦПХ в присутствии янтарной кислоты в опытах *in vitro* по методике, приведенной в главе 2 «Объекты и методы исследования».

В стерильных условиях готовили исходные растворы, используя в качестве растворителя стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида:

- раствор янтарной кислоты в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл;
- раствор ЦПХ в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл;
- раствор, содержащий янтарную кислоту в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл и ЦПХ в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл (в соотношении янтарной кислоты и ЦПХ 2,5:1).

Из полученных исходных растворов готовили соответствующие серии разведений, используя тот же растворитель.

В ходе исследования антимикробного действия растворов было установлено, что янтарная кислота не влияет на антимикробную активность ЦПХ во всех исследуемых уровнях концентраций (рисунок 4.1 – 4.3), с уменьшением концентрации ЦПХ в исследуемых растворах уменьшается и степень его

антимикробного действия.

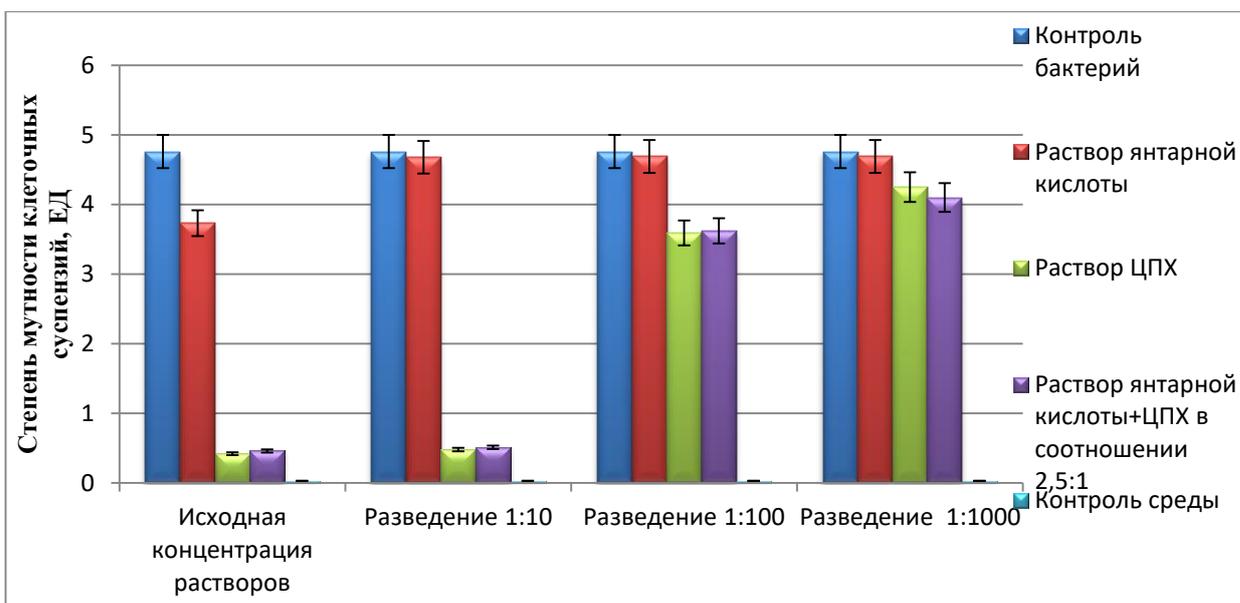


Рисунок 4.1 – Антимикробное действие ЦПХ в присутствии янтарной кислоты относительно микроорганизмов *Staphylococcus aureus*

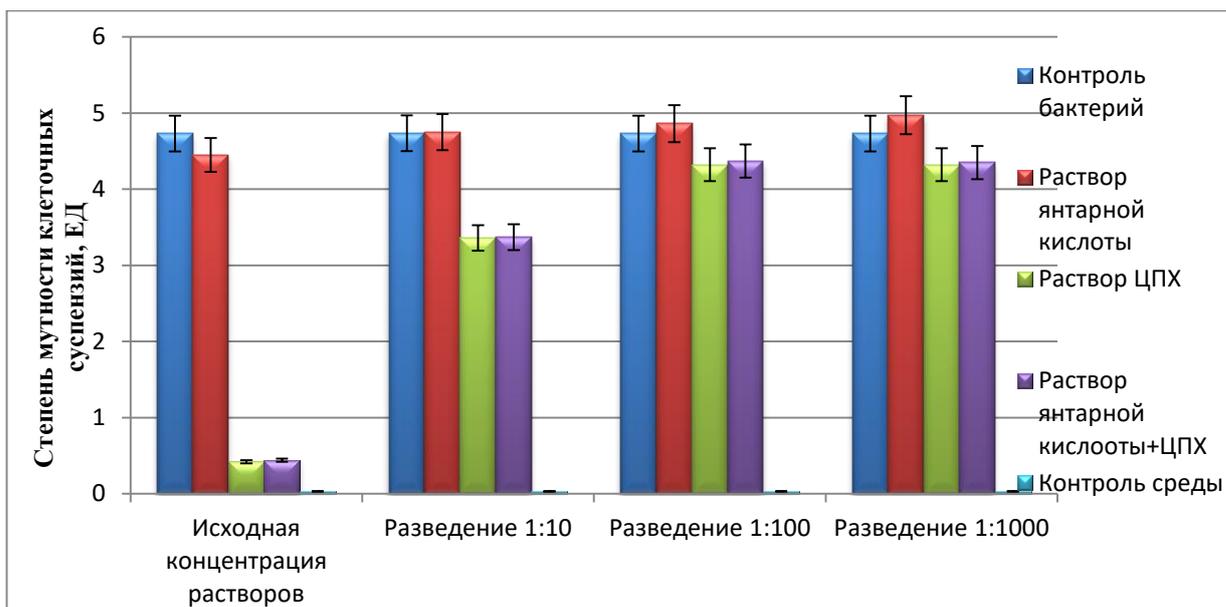


Рисунок 4.2 – Антимикробное действие ЦПХ в присутствии янтарной кислоты относительно микроорганизмов *Escherichia coli*

На уровне низких концентраций концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл и $1 \cdot 10^{-8}$ г/мл ЦПХ стимулировал рост бактерий *Ps. aeruginosa*, что также наблюдалось и в присутствии раствора ЦПХ и янтарной кислоты, следовательно, антисептик ЦПХ на уровне

низких концентраций не активен в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

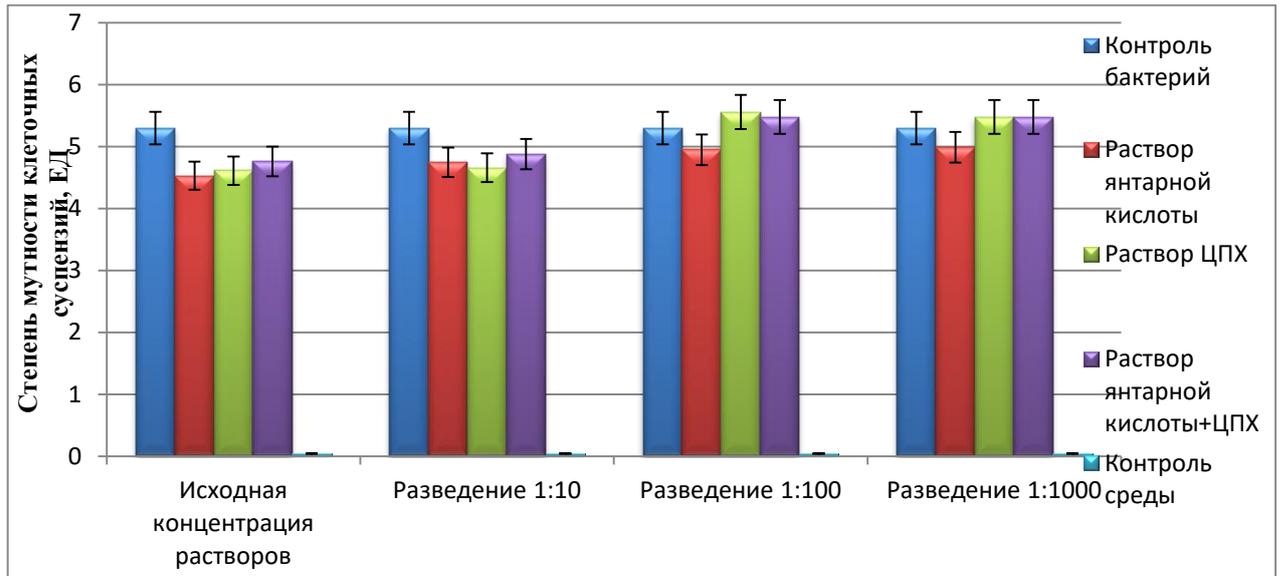


Рисунок 4.3 – Антимикробное действие ЦПХ в присутствии янтарной кислоты относительно микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*

На всех уровнях концентраций раствора ЦПХ наблюдается снижение степени мутности клеточных суспензий дрожжеподобных грибов *Candida albicans*, что свидетельствует о наличии фунгицидного действия (рисунок 4.4), янтарная кислота не влияет на активность ЦПХ.

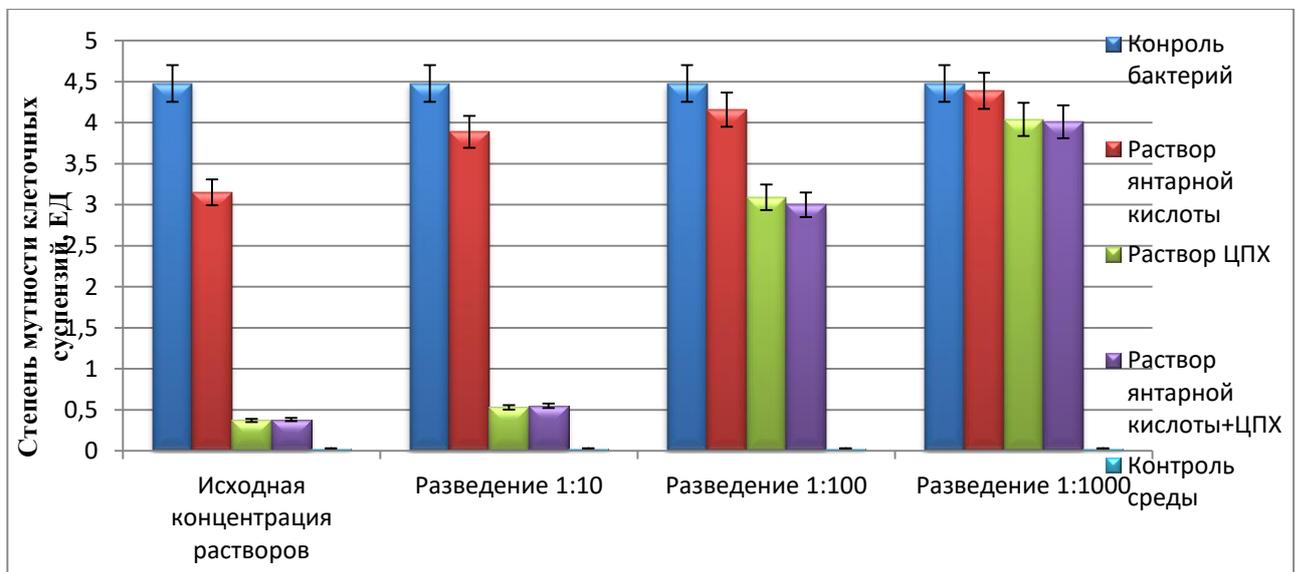


Рисунок 4.4 – Фунгицидное действие ЦПХ в присутствии янтарной кислоты относительно *Candida albicans*

Таким образом, в опытах *in vitro* установлено наличие антимикробного и фунгистатического действия растворов, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ в соотношении 2,5:1, в отношении всех изученных в эксперименте штаммов

микроорганизмов. Янтарная кислота не влияет на антимикробное действие ЦПХ, степень действия на микроорганизмы зависит от концентрации ЦПХ в растворе.

На следующем этапе исследования осуществляли эмпирическим путем подбор состава ЛПл, необходимый для обеспечения оптимального высвобождения действующих веществ. Осуществляли выбор полимеров для матриц-носителей, модельные образцы ЛПл готовили методом испарения (составы модельных растворов пленкообразователей приведены в главе 2 «Объекты и методы исследования»).

Для растворов высокомолекулярных соединений характерно явление термодинамической неустойчивости - коагуляции - слипания частиц с образованием более крупных агрегатов. Поэтому была проанализирована совместимость субстанций с растворами пленкообразователей. Концентрация янтарной кислоты – 2,5 мг; ЦПХ 1 мг в пересчете на одну ЛПл, размером 10x20 мм. При введении в пленочную массу на основе Na-КМЦ и ПВС янтарной кислоты и ЦПХ происходит расслоение пленочной массы и образование белых хлопьев, выпадающих в осадок, т.е. проявляется несовместимость компонентов пленочной массы. При введении действующих веществ в раствор пленкообразователя – раствора желатина образуется прозрачный раствор, при застывании которого образуется прозрачная пленка. Приемлемыми характеристиками обладали пленки, приготовленные на растворе *желатина 5%*. При повышении его концентрации образуются толстые и липкие пленки, уменьшение ведет к снижению эластичности и повышению хрупкости пленок.

При изучении свойств выбранной модельной пленочной массы было установлено, что содержание влаги не превышает 5%, толщина пленочной массы не более 0,5 мм, что влияет на адгезионную способность пленочной массы, определяющую силу сцепления ЛПл с местом ее аппликации (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Оценка свойств модельной пленочной массы (n=3)

П

Толщина, мм	Содержание влаги, %	Адгезивная способность, Па
0,28±0,4	4,24±0,24	80,76±17,04

Структурно-механические свойства пленкообразователя изучали с помощью ротационного вискозиметра (глава 2 «Объекты и методы исследования»). Строили реограмму течения 5% раствора желатина – график зависимость скорости вращения цилиндра (N, об/с) пленочной массы, от величины нагрузки (P, г) (рисунок 4.5).

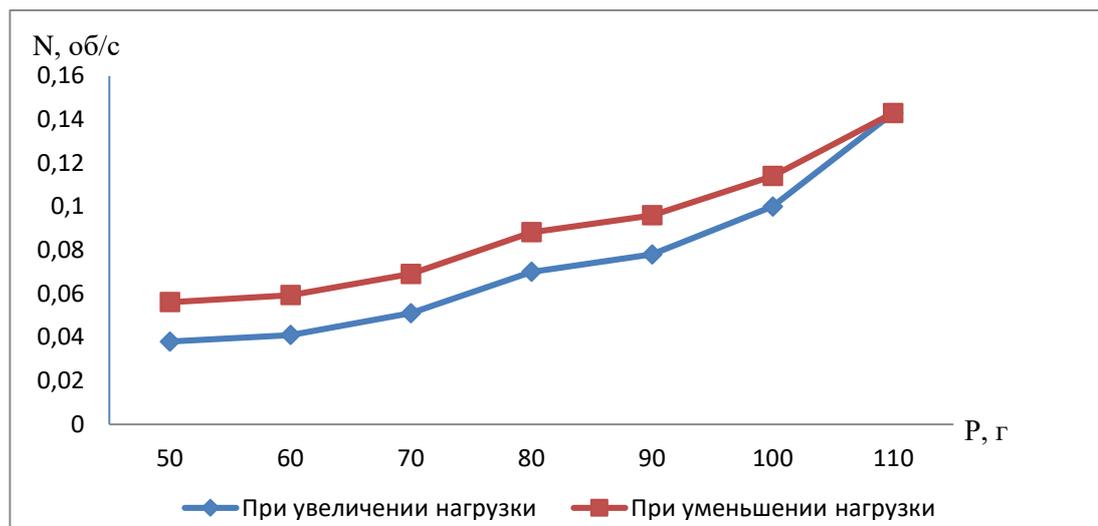


Рисунок 4.5 - Реограмма течения раствора пленкообразователя

Реологические кривые течения включают «восходящую» и «нисходящую» часть кривой и образует петлю гистерезиса, которая свидетельствует о наличии упруго-пластических свойств и структурированной системы пленкообразователя. Пленкообразователь равномерно распределяется по подложки, образуя однородную пленку, обладает достаточной адгезией и придает ЛПл пластичность.

Во избежание высыхания желатиновой массы и потери эластичности в процессе хранения, в состав пленкообразующего раствора необходимо введение пластификатора. При выборе пластификатора для пленочной массы, на основе 5% раствора желатина, установлено, что оптимальным пленкообразователем является глицерин в концентрации 5%. При уменьшении его концентрации снижается прочность пленки на излом, а увеличение концентрации свыше 5 % ухудшало качество пленки, пленки плохо застывали и отделялись от подложки.

Особое значение при применении показатель рН. Значение рН водного раствора желатина смещено в кислую область, янтарная кислота [92] проявляет в растворах также кислотные свойства ($pK_{a(1)} = 4,80$ и $pK_{a(2)} = 5,64$). Однако данный показатель должен быть физиологически приемлемым для слюны и слизистых оболочек полости рта (6,4-7,2).

рН водных извлечений из модельных образцов ЛПл определяли потенциометрическим методом (глава 2 «Объекты и методы исследования»). Значение рН извлечений из ЛПл составило $4,7 \pm 0,1$, что не является физиологически приемлемым, следовательно, необходимо довести значение рН до нормы. В случае замены 1/2 части используемой воды очищенной для получения ЛПл на 1% раствор натрия гидрокарбоната, в котором растворяли янтарную кислоту, величина рН раствора увеличивалась до $7,0 \pm 0,2$.

На следующем этапе исследования была определена адсорбционная и осмотическая активность модельных образцов ЛПл. Для установления осмотической активности использовали метод диализа; адсорбционную активность модельных образцов ЛПл определяли спектрофотометрическим методом (глава 2 «Объекты и методы исследования»). В данной композиции отмечается достаточная адсорбционная способность пленочной основы и осмотическая активность (не более 300%). Результаты определений представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Оценка осмотической и адсорбционной способности модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=5)

<p style="text-align: center;">Осмотическая активность, % $X_{\text{ср}} \pm \Delta X$</p>	<p style="text-align: center;">29 0,3 6± 0,1 8</p>
<p style="text-align: center;">Адсорбционная активность, г/1г ЛПл $X_{\text{ср}} \pm \Delta X$</p>	<p style="text-align: center;">0,0 65 ±0, 01</p>

Через слизистую оболочку полости рта могут проникать лекарственные вещества, растворимые в воде и в жирах, при воспалительных процессах

проницаемость слизистых оболочек возрастает. Одним из главных показателей качества ЛФ является достаточная биологическая доступность.

На начальном этапе исследования оценивали высвобождение действующих веществ из ЛПл с кондуктометрическим контролем (глава 2 «Объекты и методы исследования»). Параллельно измеряли электропроводность раствора пленки «плацебо», не содержащей действующих веществ (рисунок 4.6).

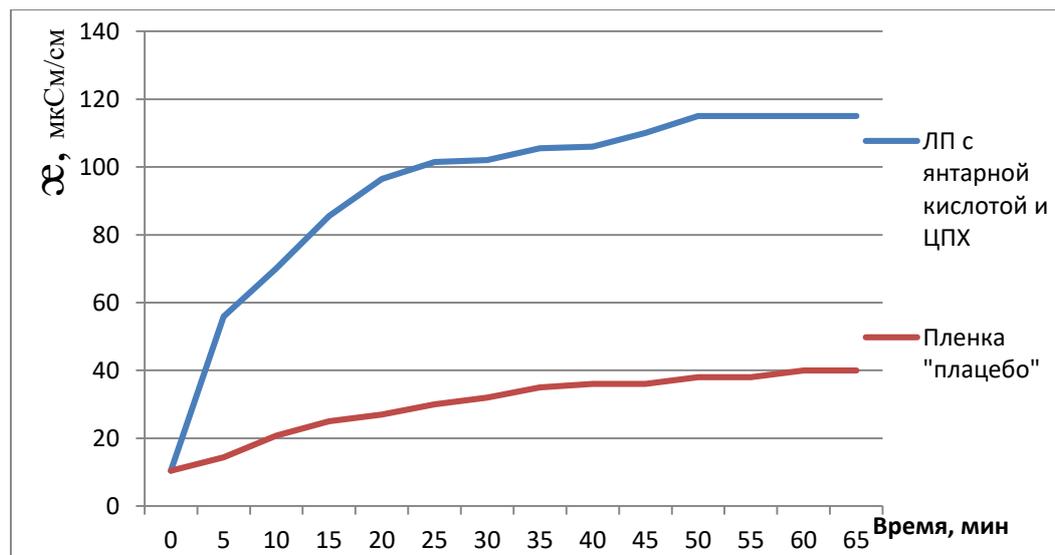


Рисунок 4.6 – Оценка высвобождения действующих веществ из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, и из пленки «плацебо» в воду очищенную с кондуктометрическим контролем

Из полученных профилей высвобождения следует, что действующие вещества высвобождаются постепенно: с увеличением времени нахождения ЛПл в воде очищенной увеличивается значение электропроводности, что свидетельствует об увеличении концентрации ионов в среде растворения.

Исследование высвобождения действующих веществ из модельных образцов ЛПл было проведено в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», при температуре $37 \pm 2^{\circ} \text{C}$, пробы отбирали через заданные промежутки времени.

Количественно определяли содержание ЦПХ и янтарной кислоты в ЛПл методом ВЭЖХ по разработанной и валидированной методике (глава 3 «Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты

и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ»). Подробное описание методики проведения испытаний приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка на десну, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид», в разделе теста «Растворение» (Приложение 2).

В качестве растворителя использовали среду, имитирующую слюну [19], состав которой приведен в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Химический состав среды, имитирующей слюну

Состав раствора, имитирующий слюну	4,2 г натрия гидрокарбоната, 0,5 г натрия хлорида, 0,2 г калия карбоната	Воды очищенной до 1 л
------------------------------------	--	--------------------------

Результаты оценки высвобождения действующих веществ из модельных образцов ЛПл в среду растворения, имитирующую слюну, с использованием разработанной методики ВЭЖХ, представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Результаты оценки высвобождения действующих веществ из модельной ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ (n=5), с использованием методики ВЭЖХ

Пок азат ели	Результаты определений $X_{cp} \pm \Delta X$	
Вре мя пол ного раст воре ния, мин	60 \pm 2	
С т е п е н ь в ы	1	28 \pm 2
	5	
	10	
	30	51 \pm 1

с в о б о ж д е н и я я н т а р н о й к и с л о т ы в с р е д у , и м и т и р у ю щ у ю с	н	
	4 5 м и н	80 \pm 2
	6 0 м и н	99 \pm 1

Л ю н у %		
С т е п е н ь в ы с в о б о ж д е н и я Ц П Х в с р е д у , и м и т и р у ю щ у	1 5 м и н	20 \pm 3
	3 0 м и н	48 \pm 2
	4 5 м и н	82 \pm 2
	6 0 м и н	100 \pm 2

ю с л ю н у %		
---------------------------------	--	--

Согласно действующей НД, ЛПл обладает достаточной биодоступностью, если за 45 мин в раствор переходит не менее 75% действующего вещества от исходного его содержания [23]. Степень высвобождения янтарной кислоты и ЦПХ из модельных образцов ЛПл в среду, имитирующую слюну соответствует требованиям ГФ РФ XIV изд.

В результате проведенного исследования был обоснован состав ЛПл, содержащей в качестве действующих веществ янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид (таблица 4.5).

Полученные лекарственные пленки прямоугольной формы 10x20мм, толщиной около 0,28 мм; имеют гладкую поверхность, без воздушных или механических включений, прозрачные.

Таблица 4.5 – Состав лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, для лечения и терапии воспалительных заболеваний пародонта

Компонент ЛПл	Содержание компонентов пленки, в пересчете на 1 пленку, в г
Желатин	0,04
Глицерин	0,04
Цетилпиридиния хлорид	0,001
Янтарная кислота	0,0025
Раствор NaHCO ₃ 1%	0,4
Вода очищенная	0,4

Заявленный состав ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, позволяет стабилизировать лекарственную форму по величине pH и способствует максимальному высвобождению действующих веществ; исключается возможность

неточного дозирования действующих веществ, а также контаминации ЛПл микроорганизмами.

На ЛПл получен патент РФ № 2617238 «Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиний хлоридом местного действия» (Приложение 1).

4.2. Установление показателей качества лекарственной плёнки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Для определения показателей качества ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, было приготовлено три опытных серии по 100 штук ЛПл в каждой: серия 1; серия 2; серия 3. Полученные образцы оценивали в соответствии с требованиями действующей нормативной документации, по показателям качества, такими как: описание, размер ЛФ, однородность массы (средняя масса), рН, потеря в массе при высушивании, подлинность, однородность дозирования действующих веществ и другие.

Описание. Размеры лекарственной пленки

Испытание по показателю «Описание» проводили визуально. Геометрические размеры единичной пленки и ее толщину измеряли микрометром (глава 2 «Объекты и методы исследования»), измерения проводили в средней пробе (n=5) каждой партии (таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Результаты определения норм качества ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, по показателю «Описание», (n=5)

Показатель качества	Номер серии		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3
Описание	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости
Размеры единичной пленки 10×20 мм±0,2мм	соответствует	соответствует	соответствует

Толщина 0,28±0,4 мм	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости

Исследуемая ЛПл, содержащая янтарную кислоту и ЦПХ, представляет собой однородную гомогенную прозрачную эластичную пленку, со слабым характерным запахом, не содержащую механических включений. Размеры ЛПл и ее толщина определяет степень адгезии и равномерный контакт со слизистой оболочкой полости рта. Единичная пленка должна иметь прямоугольную форму, размер 10x20±0,2 мм.

Определение водородного показателя (рН раствора)

Водное извлечение пленочной массы должно иметь нейтральное значение рН раствора и соответствовать рН ротовой полости. Кислотность раствора ЛПл определяли потенциометрическим методом, используя среднюю пробу (n=5) каждой партии (глава 2 «Объекты и методы исследования»), результаты определения представлены в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Результаты определения рН водных извлечений ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=5)

Показатель качества	Номер серии		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3
Значение рН растворов	7,2	6,9	7,1
	7,0	7,2	6,8
	7,1	7,1	6,9
	7,0	6,8	7,2
	6,9	6,9	7,1
Метрологические характеристики $X_{cp} \pm \Delta X$	7,0±0,1	7,0±0,2	7,0±0,2
Среднее значение рН (интервал показателя рН)	7,0±0,2 рН = 6,8-7,2		
Качество пленок	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости

Исходя из полученных результатов, ЛПл удовлетворяет требованиям по

показателю рН и, следовательно, не будет обладать раздражающим действием на слизистые оболочки полости рта и изменять кислотность слюны.

Однородность массы (средняя масса) лекарственных пленок

Определение проводили в средней пробе (n=20) каждой партии, путем взвешивания каждой единицы ЛФ в отдельности с точностью до 0,001 г (глава 2 «Объекты и методы исследования»).

Качество ЛПл считают удовлетворительным, если не более 2-х индивидуальных масс пленок отклоняются от средней массы, на величину, превышающее допустимое отклонение, равное $\pm 7,5\%$ (таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Результаты определения средней массы ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=20)

Номер серии					
Серия 1		Серия 2		Серия 3	
Средняя масса ЛП, г	Отклонение от средней массы, %	Средняя масса ЛП, г	Отклонение от средней массы, %	Средняя масса ЛП, г	Отклонение от средней массы, %
0,082	3,8	0,082	2,5	0,080	0
0,080	1,3	0,078	2,5	0,082	2,5
0,079	0	0,081	1,3	0,079	1,3
0,080	1,3	0,079	1,3	0,081	1,3
0,079	0	0,078	2,5	0,077	3,8
0,078	1,3	0,077	3,8	0,081	1,3
0,079	0	0,081	1,3	0,079	1,3
0,080	1,3	0,080	0	0,078	2,5
0,080	1,3	0,079	1,3	0,078	2,5
0,079	1,3	0,080	0	0,080	0
0,080	1,3	0,079	1,3	0,079	2,5
0,079	0	0,080	0	0,079	1,3
0,079	0	0,078	2,5	0,077	3,8
0,078	1,3	0,080	0	0,081	1,3
0,081	2,5	0,081	1,3	0,082	2,5
0,079	0	0,082	2,5	0,079	2,5
0,079	0	0,079	1,3	0,081	1,3
0,078	1,3	0,078	2,5	0,078	2,5

0,081	2,5	0,080	0	0,081	1,3
0,080	1,3	0,079	1,3	0,082	2,5
Метрологические характеристики $X_{ср} \pm \Delta X$		Метрологические характеристики $X_{ср} \pm \Delta X$		Метрологические характеристики $X_{ср} \pm \Delta X$	
Средняя масса ЛПл $0,079 \pm 0,001$		Средняя масса ЛПл $0,080 \pm 0,001$		Средняя масса ЛПл $0,080 \pm 0,001$	
Значение отклонения от средней массы должно быть в пределах не более $\pm 7,5\%$. Средняя масса ЛПл равна 0,080 г					
Качество пленок соответствует критериям приемлемости		Качество пленок соответствует критериям приемлемости		Качество пленок соответствует критериям приемлемости	

Отклонения от средней массы единичной ЛПл каждой партии не превышает допустимых значений, следовательно, исследуемые ЛПл выдерживают испытание на «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

В ОФС 1.4.1.0035.18 «Пленки» прописано: «Если предусмотрено испытание на однородность дозирования, то контроль однородности массы не требуется», однако, при расчетах в испытаниях «Однородность дозирования» и «Количественное определение» необходимо учитывать в расчетах среднюю массу ЛПл, следовательно, необходимо определять данную величину для каждой партии ЛФ [23].

Потеря в массе при высушивании

Определение проводили гравиметрическим методом в средней пробе (n=5) каждой серии (глава 2 «Объекты и методы исследования»). Содержащийся в биodeградируемой пленке избыток влаги является хорошей питательной средой для размножения микроорганизмов, поэтому показатель является одним из критериев стабильности ЛПл при хранении (таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Результаты определения потери в массе при высушивании ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=5)

Показатель качества	Номер серии		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3
Потеря в массе при высушивании, %	4,14	4,06	4,29
	4,21	3,93	3,95
	4,40	3,88	4,23
	3,93	4,31	3,89

	3,84	4,15	4,32
Метрологические характеристики Х _{ср} ±ΔХ	4,10±0,27	4,07±0,21	4,14±0,24
Среднее значение показателя «Потеря в массе при высушивании» равно 4,10%			
Значение показателя «Потеря в массе при высушивании» должно быть не более 5%.			
Качество ЛПл	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости

Исходя из полученных результатов, ЛПл удовлетворяет требованиям по показателю потеря в массе при высушивании. Для поддержания остаточной влажности ЛПл применяют герметичную упаковку, предохраняющую ЛПл от высыхания, а также от накопления избыточной влаги.

Подлинность

1. Метод ТСХ.

Установление подлинности действующих веществ ЛПл проводили методом ТСХ (глава 2 «Объекты и методы исследования»), в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» [23], по разработанной методике (глава 3 «Разработка методики совместного качественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в лекарственной пленке методом ТСХ»).

Подробное описание методики совместного качественного ТСХ-анализа действующих веществ ЛПл приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид» (Приложение 2).

Условия проведения испытания качественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ТСХ приведены в таблице 4.10.

Таблица 4.10 - Условия проведения ТСХ для оценки подлинности янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, при совместном присутствии

Условия проведения испытания	
Пластинка	ТСХ пластинка со слоем силикагеля F ₂₅₄ .

Подвижная фаза (ПФ)	этилацетат – этиловый спирт – раствор аммиака концентрированный 80:20:20
Детектор	0,1% спиртовой раствор бромфенолового синего, на хроматограмме две зоны адсорбции: светло-желтая (янтарная кислота) и темно-синяя (ЦПХ)

Изучаемые ЛПл соответствовали требованиям по показателю качества «Подлинность. Метод ТСХ», на хроматограммах испытуемого раствора в подобранной хроматографической системе зоны адсорбции извлечения из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, соответствовала основной зоне адсорбции по положению, интенсивности окраски и величине на хроматограмме соответствующих растворов сравнения.

2. Метод ВЭЖХ.

Установление подлинности действующих веществ ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, проводили методом ВЭЖХ (глава 2 «Объекты и методы исследования»), в условиях испытания «Количественное определение» в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ XIV изд. Определение проводили по разработанной и валидированной методике (глава 3 «Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ»).

Подробное описание методики ВЭЖХ-анализа приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид» (Приложение 2).

Время удерживания основного пика янтарной кислоты и ЦПХ на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика янтарной кислоты и ЦПХ на хроматограмме соответствующего стандартного раствора. Результаты оценки качества ЛПл по показателю «Подлинность» приведены в таблице 4.11.

Таблица 4.11 – Результаты определения подлинности действующих веществ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ВЭЖХ, (n=5)

Номер серии						
Метод ВЭЖХ	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Действующие вещества		Действующие вещества		Действующие вещества	
	янтарная кислота	ЦПХ	янтарная кислота	ЦПХ	янтарная кислота	ЦПХ
	Время удерживания		Время удерживания		Время удерживания	
	7,38	15,66	7,37	15,67	7,36	15,68
	7,37	15,67	7,38	15,66	7,38	15,67
	7,36	15,66	7,37	15,66	7,37	15,68
	7,38	15,66	7,36	15,67	7,37	15,67
	7,37	15,68	7,38	15,68	7,37	15,67
	Метрологические характеристики: $\bar{X} \pm \Delta X$					
7,37 \pm 0,01	15,67 \pm 0,01	7,37 \pm 0,01	15,67 \pm 0,01	7,37 \pm 0,01	15,67 \pm 0,01	
Время удерживания пика янтарной кислоты стандартного раствора совпадает со временем удерживания пика янтарной кислоты в извлечении ЛПл						
Время удерживания пика ЦПХ стандартного раствора совпадает со временем удерживания пика ЦПХ в извлечении ЛПл						
Качество пленок	соответствует критериям приемлемости		соответствует критериям приемлемости		соответствует критериям приемлемости	

Однородность дозирования действующих веществ

Контроль равномерного распределения янтарной кислоты и ЦПХ по отдельно взятым ЛПл проводили в соответствии с ОФС.1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования», ГФ РФ XIV изд., способ 1 (глава 2 «Материалы и методы исследования»).

Испытание осуществляли в каждой из 10 отобранных единиц ЛПл в условиях испытания «Количественное определение», метод ВЭЖХ, по разработанной и валидированной методике (глава 3 «Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ»).

Подробное описание методики приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид», в разделе «Однородность дозирования действующих веществ» (Приложение 2).

Испытуемый раствор

Около 0,10 г (точная навеска) измельченной ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 15 мл

подвижной фазы (начальный состав), нагревали на водяной бане (40-50° С) до полного растворения, охлаждали до комнатной температуры. Доводили объем до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр (размер пор 0,45 мкм).

Интерпретация результатов

Содержание действующих веществ ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, выражали в процентах от номинального значения, определяли соответственно найденной величине (X_{cp}) эталонное значение дозы (M) и рассчитывали значения первого показателя приемлемости результатов испытания на «Однородность дозирования» (AV , %), допустимое значение которого не должно превышать 15%.

Результаты проведенных испытаний на соответствие ЛПл по показателю качества «Однородность дозирования» действующих веществ (янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида) и их интерпретация представлены в таблице 4.12 и 4.13.

Таблица 4.12 – Результаты определения однородности дозирования янтарной кислоты в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=10)

	Масса навески ЛПл, г	Найдено янтарной кислоты, %	Метрологические характеристики
Серия 1	0,11355	99,1	$X_{cp} = 98,4\%$ $S(SD) = 0,68$ $AV = M - X_{cp} + kxS$ при $X_{cp} \leq 98,5\%$ $M = 98,5\%$ $k=2,4$ при $n=10$ $AV = 1,7\%$ (допустимое значение - не более 15%)
	0,10420	98,8	
	0,11286	96,8	
	0,09934	97,8	
	0,10169	98,6	
	0,10408	99,0	
	0,09432	98,2	
	0,11034	98,7	
	0,09851	98,4	
	0,10411	98,5	
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости
Серия 2	0,09551	97,8	$X_{cp} = 98,1\%$ $S(SD) = 0,73$ $AV = M - X_{cp} + kxS$ при $X_{cp} \leq 98,5\%$ $M = 98,5\%$
	0,10320	98,2	
	0,10401	99,2	
	0,10451	98,6	
	0,10169	98,3	
	0,10355	98,1	

	0,09438	97,2	k = 2,4 при n=10 AV=2,2% (допустимое значение - не более 15%)
	0,11054	98,3	
	0,09934	98,9	
	0,11286	96,8	
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости
Серия 3	0,10154	99,5	X _{ср} = 98,5% S(SD) = 0,81 AV= M – X _{ср} + KxS = KxS при 98,5 % ≤ X _{ср} ≤ 101,5 % M = X _{ср} K= 2,4 (n=10) AV= 1,9% (допустимое значение - не более 15%)
	0,10316	97,6	
	0,11277	98,3	
	0,10442	99,3	
	0,10369	97,5	
	0,09387	98,1	
	0,11084	97,8	
	0,10551	98,2	
	0,09984	98,4	
	0,09485	99,8	
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости

Таблица 4.13 – Результаты определения однородности дозирования ЦПХ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=10)

Номер серии	Масса навески ЛПл, г	Найдено ЦПХ, %	Метрологические характеристики
Серия 1	0,11355	106,5	X _{ср} = 107,2% S(SD) = 2,00 при X ≥ 101,5 % M= 101,5% AV= M – X _{ср} + kxS k=2,4 (n=10) AV= ±10,5% (допустимое значение - не более 15%)
	0,10420	110,1	
	0,11286	105,3	
	0,09934	111,2	
	0,10169	107,1	
	0,10408	108,2	
	0,09846	106,5	
	0,10156	105,4	
	0,09943	105,8	
	0,10875	106,2	
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости
Серия 2	0,09946	109,2	X _{ср} = 107,6% S(SD) = 1,3 AV= M – X _{ср} + kxS при X ≥ 101,5 % M=101,5% k= 2,4 (n=10) AV=9,1% (допустимое значение -
	0,10408	106,3	
	0,09954	107,5	
	0,10161	108,1	
	0,10156	106,3	
	0,11286	109,4	
	0,09408	107,1	
	0,11272	108,9	

	0,09943	106,7	не более 15%)
	0,10165	106,1	
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости
Серия 3	0,09957	107,1	$X_{cp} = 106,5\%$ $S(SD) = 1,5$ $AV = M - X_{cp} + kxS$ при $X \geq 101,5\%$ $M = 101,5\%$ $k = 2,4 (n=10)$ $AV = 8,6\%$ (допустимое значение - не более 15%)
	0,11276	105,3	
	0,09943	106,7	
	0,10165	107,2	
	0,10091	103,9	
	0,12073	108,8	
	0,11286	107,9	
	0,10408	104,8	
	0,09777	106,1	
	0,10081	106,7	
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости

При определении однородности дозирования действующих веществ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, был рассчитан первый показатель приемлемости (AV, %), который в каждой партии ЛФ, как для янтарной кислоты, так и для ЦПХ не превышал 15%, что удовлетворяет требованиям действующей ОФС [23].

Полученные результаты свидетельствуют о надлежащей степени однородности распределения действующих веществ (янтарной кислоты и ЦПХ) по единичной ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ.

Микробиологическая чистота

Для уменьшения процесса обсемененности ЛФ патогенными микроорганизмами необходимо введение в основу таких ЛФ антимикробных компонентов, однако сам ЦПХ, как действующее вещество, обладает антимикробным действием и препятствует микробной контаминации разработанных ЛПл.

В соответствии с требованиями ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» ГФ РФ XIV изд. исследуемые ЛПл относятся по показателю

микробиологической чистоты лекарственных препаратов к категории 2.

Анализ микробиологической чистоты проводили согласно методике, описанной в разделе (глава 2 «Объекты и методы исследования»). Для определения общего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий и грибов в 1 г препарата использовали двухслойный агаровый метод. В качестве питательных сред были взяты соево-казеиновый агар и среда агар Сабуро с глюкозой. После культивирования подсчитывали число КОЕ/г препарата.

Исследование микробной обсемененности модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, были проведены на базе лабораторий ЦНИЛ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Результаты по исследованию микробиологической чистоты трех партий ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ представлены в таблице 4.14.

Таблица 4.14 – Результаты оценки микробиологической обсемененности образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, (n=5)

	Испытание на микробиологическую чистоту, категория 2	Рекомендуемые требования (нормы)	Результат испытаний образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ		
			Серия 1	Серия 2	Серия 3
1.	Общее число аэробных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл	не более 10^2 КОЕ	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
2.	Общее число дрожжевых и плесневых грибов в 1 г или в 1 мл	не более 10^1 КОЕ	$<10^1$	$<10^2$	$<10^2$
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г или в 1 мл	отсутствие	отсутствие	отсутствие	отсутствие
4.	<i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г или в 1 мл	отсутствие	отсутствие	отсутствие	отсутствие
Качество ЛПл			соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости	соответствует критериям приемлемости

Исходя из полученных результатов исследования микробиологической обсемененности ЛПл следует, что рост патогенных микроорганизмов на питательных средах в присутствии модельных образцов ЛФ, содержащих

янтарную кислоту и ЦПХ, отсутствует. На основании полученных результатов установлено, что ЛПл с янтарной кислотой и ЦПХ удовлетворяют требованиям ГФ РФ XIV изд., категории 2.

Растворение

Данное испытание проводят для подтверждения соответствующего высвобождения действующих веществ из ЛФ.

Определение осуществляли в каждой партии отобранных единиц ЛПл, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с требованиями ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (глава 2 «Объекты и методы исследования»).

Анализ проводили методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение», по разработанной и валидированной методике (глава 3 «Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ»).

Подробное описание методики приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид» (Приложение 2).

В результате проведения испытания были подобраны условия для проведения теста «Растворение» с учетом содержания действующих веществ в единичном образце ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ (таблица 4.15).

Таблица 4.15 – Условия проведения теста «Растворение» для оценки качества ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Условия проведения испытания	
Аппарат	«Проточная ячейка»
Среда растворения	0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2
Объем среды растворения	25 мл
Температура	37±0,5 ⁰ С
Скорость потока	16 мл/мин
Время растворения	45 минут

Каждую единичную ЛПл, содержащую янтарную кислоту и ЦПХ, помещали

в ячейку прибора, с предварительно нагретой средой растворения. Через 45 минут отбирали пробу раствора и фильтровали, отбрасывая первые порции фильтрата. В фильтрате определяли количественное содержание янтарной кислоты и ЦПХ. Результаты оценки ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, по показателю качества «Растворение» приведены в таблице 4.16.

Таблица 4.16 – Результаты оценки высвобождения янтарной кислоты и ЦПХ из ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в условиях теста «Растворение», (n=6)

Номер серии					
Серия 1		Серия 2		Серия 3	
Рассчитанное содержание янтарной кислоты, %	Рассчитанное содержание ЦПХ, %	Рассчитанное содержание янтарной кислоты, %	Рассчитанное содержание ЦПХ, %	Рассчитанное содержание янтарной кислоты, %	Рассчитанное содержание ЦПХ, %
86	87	85	88	84	87
85	88	86	85	86	85
86	87	85	87	85	88
84	85	84	86	84	86
86	86	84	87	85	87
85	87	86	88	83	88
Метрологические характеристики: Х _{ср} ±ΔХ					
85 _{±1}	87 _{±1}	85 _{±1}	87 _{±1}	85 _{±1}	87 _{±1}
Качество ЛПл соответствует критериям приемлемости		Качество ЛПл соответствует критериям приемлемости		Качество ЛПл соответствует критериям приемлемости	

Для каждой испытуемой единицы ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, за 45 минут должно высвободиться не менее 75(Q)+5% от заявленного содержания янтарной кислоты и ЦПХ. Согласно полученным данным, в среду растворения за 45 минут высвобождается из ЛПл более 80% от заявленного содержания янтарной кислоты и ЦПХ.

Нами были проведены исследования по определению показателя качества «Растворение» для ЛПл, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ, следовательно, испытание пленок по показателю качества «Распадаемость» согласно ГФ РФ XIV изд. не является обязательным, поэтому исследуемые ЛПл не были подвергнуты

данному испытанию.

Количественное определение

Количественное определение содержания янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл проводили в каждой партии отобранных единиц ЛПл, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ, по разработанной и валидированной методике (глава 3 «Разработка методики качественной оценки и количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ при совместном присутствии в ЛПл методом ВЭЖХ»).

Подробное описание методики приведено в проекте Фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид» (Приложение 2).

Условия проведения испытания «Количественное определение» для оценки количественного содержания янтарной кислоты и ЦПХ в испытуемых образцах ЛПл методом ВЭЖХ приведены в таблице 4.17.

Таблица 4.17 – Условия проведения испытания «Количественное определение» для оценки количественного содержания янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл методом ВЭЖХ

Хроматографические условия	Параметры хроматографической системы
Колонка	Luna C18(2) 100A (4,6 ×250 mm, 5µm)
Температура колонки	30 °С
Скорость потока	1 мл/мин
Подвижная фаза	0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2
Режим хроматографирования	градиентный, в течение 8 минут с использованием подвижной фазы с минимальной долей ацетонитрила (2%), затем увеличивают долю ацетонитрила с 2 до 85% за 10 минут
Детектор	спектрофотометрический, аналитическая длина волны 210 нм
Объем пробы	10 мкл
Время хроматографирования	18 мин

Хроматографированию подвергали испытуемый раствор и стандартные растворы янтарной кислоты и ЦПХ, получая для каждого образца не менее 3

хроматограмм.

При проведении количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, необходимо, чтобы выполнялись требования к подобранной хроматографической системе.

Пригодность хроматографической системы

На хроматограмме стандартного раствора, содержащего янтарную кислоту и ЦПХ должно быть:

- *относительные стандартные отклонения* площади пика янтарной кислоты и ЦПХ должны быть не более 5,0 % (6 определений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику янтарной кислоты и ЦПХ, должна оставлять не менее 2000 теоретических тарелок (6 определений);

- *фактор асимметрии пика (As)* янтарной кислоты и ЦПХ должен быть не более 1,5.

Количественное содержание янтарной кислоты в одной ЛПл в процентах от заявленного количества (X, %) вычисляли по формуле 5.1:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 25 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot L} \quad (4.1)$$

где, S – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора ЛПл;

S_0 – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме стандартного раствора;

a_0 – навеска янтарной кислоты, в миллиграммах;

a – навеска пленочной массы, в миллиграммах;

P – средняя масса ЛПл, в миллиграммах;

L – заявленное содержание ЦПХ в одной ЛПл, в миллиграммах;

G – содержание янтарной кислоты в стандартном образце, в %.

Количественное содержание ЦПХ в одной ЛПл в процентах от заявленного количества (X, %) вычисляли по формуле 5.2:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot L} \quad (4.2)$$

где, S – площадь пика ЦПХ на хроматограмме испытуемого раствора ЛПл;

S_0 – площадь пика ЦПХ на хроматограмме стандартного раствора;

a_0 – навеска ЦПХ, в миллиграммах;

a – навеска пленочной массы, в миллиграммах;

P – средняя масса ЛПл, в миллиграммах;

L – заявленное содержание ЦПХ в одной ЛПл, в миллиграммах;

G – содержание ЦПХ в стандартном образце, в %.

Количественное содержание янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, согласно требованиям действующей нормативной документации должно быть не менее 90,0 % и не более 110,0 %; ЦПХ – не менее 85,0 % и не более 115,0 % [23].

Результаты количественного определения янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, и их статистической обработки представлены в таблице 4.18.

Таблица 4.18 – Результаты определения количественного содержания янтарной кислоты и ЦПХ в ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом ВЭЖХ-анализа, (n=6)

Серия 1				
Навеска пленочной массы, г	Площадь пика янтарной кислоты (среднее из 3 определений)	Рассчитанное содержание янтарной кислоты, %	Площадь пика ЦПХ (среднее из 3 определений)	Рассчитанное содержание ЦПХ, %
0,11355	84313	97,6	580728	105,3
0,10420	78322	98,8	563362	111,2
0,11286	83114	96,8	588194	107,1
0,09934	73762	97,8	522570	108,2
0,10169	76126	98,4	529979	107,5
0,10408	78548	99,1	532296	105,4
Метрологические характеристики: Хср ±ΔХ		98,1±0,9	Метрологические характеристики: Хср ±ΔХ	107,5±2,3
Качество пленок – соответствует критериям приемлемости				

Серия 2				
0,10169	76126	99,4	529979	107,2
0,09777	73796	99,2	519003	108,8
0,10408	78548	99,5	532296	104,8
0,12073	90024	98,0	623245	106,1
0,11286	83114	96,8	588194	106,7
0,10081	76705	100,1	530231	107,9
Метрологические характеристики Хср ±ΔХ		98,8±1,3	Метрологические характеристики Хср ±ΔХ	106,9±1,4
Качество пленок – соответствует критериям приемлемости				
Серия 3				
0,12073	90024	98,1	623245	105,6
0,10081	76705	100,5	530221	107,0
0,09777	73796	99,2	519000	108,4
0,10300	76176	97,2	536733	107,1
0,10715	78593	97,4	568793	108,6
0,10423	78672	99,2	543145	103,6
Метрологические характеристики Хср ±ΔХ		98,6±1,3	Метрологические характеристики Хср ±ΔХ	106,7±1,9
Качество пленок – соответствует критериям приемлемости				
Навеска янтарной кислоты для приготовления стандартного раствора: 81,24 мг Площадь пика янтарной кислоты в стандартном растворе (среднее 3 определений): 80110 Навеска ЦПХ для приготовления стандартного раствора: 65,29 мг Площадь пика ЦПХ в стандартном растворе (среднее 3 определений): 515109 Средняя масса ЛПл – 0,081 г.				

Результаты проведенных исследований показывают, что количественное содержание янтарной кислоты и ЦПХ в каждой из серий ЛПл соответствует требованиям к данному показателю качества ЛПл.

Таким образом, нами 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 (таблица 4.20). Все три опытные серии модельных образцов ЛПл соответствовали критериям

приемлемости.

Таблица 4. 20 – 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 \pm 0,2 мм, толщина 0,28 \pm 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 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 \pm 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 $+15^{\circ}\text{C}$	
Срок годности	2 года	
Состав на 1 лекарственную пленку: Янтарной кислоты - 0,0025 г Цетилпиридиния хлорида - 0,001 г Желатина - 0,04 г Глицерина - 0,04 г Раствор натрия гидрокарбоната 1% - 0,4 г Воды очищенной - 0,4 г		

На основании разработанных хроматографических методик и результатов проведенных комплексных исследований был разработан проект Фармакопейной статьи на новый лекарственный препарат для стоматологической практики «Лекарственная плёнка на десну, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид» (Приложение 2).

4.3. Исследование стабильности лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ в процессе хранения

Определение сроков годности ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, 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 $8-15^{\circ}\text{C}$.

Для проведения испытания были наработаны 3 серии препарата, каждые 6 месяцев проводили отбор проб, которые подвергались испытаниям, изложенным в «Спецификации на срок годности лекарственной пленки, содержащей янтарную

кислоту и цетилпиридиния хлорид», приведенной выше.

Результаты определения срока годности модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом долгосрочных испытаний приведены в таблице 4.21.

Таблица 4.21 – Результаты определения срока хранения модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом долгосрочных испытаний

Показатель качества лекарственных пленок с янтарной кислотой и ЦПХ												
Номер серии	Требования к показателям качества лекарственных пленок с янтарной кислотой и ЦПХ											Срок хранения, мес.
	Описание	Размер	Подлинность	Однородность массы	Потеря в массе при высушивании	Однородность дозирования	pH раствора	Растворение	Количественное содержание		Микробиологическая чистота	
	Однородные, эластичные, бесцветные, прозрачные пластины со слабым характерным запахом	Пластины прямоугольной формы 10x20±0,2 мм, толщина 2,8±0,2 мм	1.ТСХ 2.ВЭЖХ	Отклонение от средней массы не более ±7,5%	Не более 5%	Первый показатель приемлемости не более 15%	6,8 - 7,2	Не менее 80% за 45 мин	ЦПХ, не менее 85,0% и не более 115,0%	Янтарная кислота, не менее 90,0% и не более 110,0%	Категория 2	
Серия 1	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	6,9	Соответств.	108,2	99,6	Соответств.	0
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	6,8	Соответств.	108,2	98,5	Соответств.	6
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	107,7	96,3	Соответств.	12
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,1	Соответств.	107,6	96,5	Соответств.	18
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,1	Соответств.	107,3	95,2	Соответств.	24
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	106,8	95,0	Соответств.	30
Серия 2	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	6,8	Соответств.	108,1	98,7	Соответств.	0
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	107,8	97,3	Соответств.	6
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	106,9	96,3	Соответств.	12
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	6,9	Соответств.	106,8	95,3	Соответств.	18
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	107,0	95,1	Соответств.	24
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,1	Соответств.	106,1	95,1	Соответств.	30
Серия 3	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	6,9	Соответств.	107,5	99,6	Соответств.	0
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	107,6	98,5	Соответств.	6
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	6,9	Соответств.	107,8	97,3	Соответств.	12
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	107,2	96,3	Соответств.	18
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,0	Соответств.	106,4	95,5	Соответств.	24
	Соответствует	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	Соответств.	7,1	Соответств.	106,0	95,1	Соответств.	30

На основании полученных результатов исследования, установлено, что микробиологическая чистота, физико-химические показатели ЛПл, а также количественное содержание действующих веществ в модельных образцах ЛПл, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, в процессе естественного хранения метода долгосрочных испытаний соответствовали нормам качества. Следовательно, срок годности ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, составляет не менее 2 лет при хранении в прохладном месте при температуре не выше +15⁰ С.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. 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.

2. В результате исследований эмпирическим путем обоснован состав ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ. Получен патент РФ № 2617238 «Способ получения лекарственного средства с кислотой янтарной и цетилпиридиний хлоридом местного действия» (Приложение 1).

3. Определены показатели качества и критерии их приемлемости для ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания.

4. Проведено исследование по установлению методов и разработке методик определения основных показателей качества исследуемой ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в соответствии с требованиями нормативной документации.

5. 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.

6. 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.

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

8. 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 +15⁰ С.

Материалы данной главы отражены в следующих работах:

1. 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. Синицкий, О.И. Филимонова, Ю.С. Шишкова, Е.О. Белоусова.

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. 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.

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. 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.

6. Ножкина, Н.Н. Комплексные исследования пленок лекарственных с антибактериальным и антигипоксантичным 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.

7. 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.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКРОБНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЯНТАРНУЮ КИСЛОТУ И ЦПХ

Исследование антимикробного и антиокислительного действия модельных образцов ЛПл были проведены на базе лабораторий ЦНИЛ и экспериментально-биологической клиники (вивария) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

5.1. Исследование антимикробного действия лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ

Определение бактериостатического и фунгистатического действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в опытах *in vitro* проводили методом диффузии в агар (метод "агаровых пластин") и методом серийных разведений в жидких питательных средах.

Исследование антимикробного действия ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом диффузии в агар

При скрининговом исследовании антимикробного действия модельных образцов пленки использовали метод диффузии в агар (методика приведена в главе 2 «Объекты и методы исследования»). Для определения бактериостатического действия использовали соево-казеиновый агар, при исследовании фунгистатической активности – агар Сабуро, в который вносили взвесь соответствующих тест-микроорганизмов и раствор испытуемой лекарственной формы.

Антимикробное действие определяли по величине зоны задержки роста микроорганизмов (в мм) путем измерения расстояния от края лунки до границы роста микроорганизмов. В качестве контроля использовали раствор ЦПХ в концентрации, соответствующей содержанию в ЛПл, взятой для испытания.

Антимикробное действие оценивали по диаметру задержки роста микроорганизмов: диаметр роста до 9 мм или сплошной рост трактовали как

отсутствии антимикробной активности; диаметр 10-15 мм – слабая активность, при диаметре свыше 15-20 мм - средняя и при диаметре выше 20 мм – высокая антимикробная активность. Результаты определения антимикробного действия (среднее значение 5 определений) методом диффузии в агар изучаемой ЛФ приведены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Результаты определения антимикробного действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом диффузии в агар, (n=5)

Зона задержки роста микроорганизмов (X _{ср} ±ΔX)	Тип микроорганизмов			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
в присутствии извлечения из ЛПл, в мм	25±1	17±1	6±1	25±1
в присутствии раствора ЦПХ, в мм	26±1	18±1	6±1	26±1

В предварительных исследованиях установлено, что ЛПл активна в отношении изучаемых микроорганизмов, ЦПХ хорошо диффундирует из нее и проявляет в отношении *Staphylococcus aureus* и грибов *Candida albicans* достаточно высокое антимикробное действие. Среднее действие наблюдается в отношении *Escherichia coli* и отсутствие антимикробного действия – в отношении микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*.

Также установлено, что антимикробное действие ЦПХ в составе модельных образцов ЛПл, содержащей ЦПХ и янтарную кислоту, практически не уменьшается в сравнении с субстанцией ЦПХ.

Исследование антимикробного действия ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, методом серийных разведений в жидких питательных средах

Определение антимикробного действия экспериментальных образцов ЛПл методом серийных разведений в жидких питательных средах проводили в отношении микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* по методике, приведенной в главе 2 «Объекты и

методы исследования». Антимикробное действие оценивали по изменению прозрачности пробы визуально, а также измеряли степень мутности клеточных суспензий с помощью денситометра DEN-18. Исследования проводили в пяти повторах, проводя контроль питательных сред и контроль роста микроорганизмов.

Результаты изучения антибактериального действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, методом серийных разведений в жидких питательных средах (среднее значение 5 определений) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 - Результаты изучения антибактериального действия модельных образцов ЛПл методом серийных разведений в жидких питательных средах, (n=5)

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

При регистрации результатов установлено, что растворы, приготовленные из модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, во всех разведениях продемонстрировали способность угнетать жизнедеятельность исследуемых микроорганизмов. Максимальное антимикробное действие наблюдалось в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, и отсутствие активности - в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

При исследовании антимикробного действия относительно *Staphylococcus*

aureus установлено (рисунок 5.1), что практически полное угнетение микроорганизмов наблюдается в растворе с максимальным содержанием ЦПХ и янтарной кислоты (0,04 мг/мл и 0,1 мг/мл, соответственно).

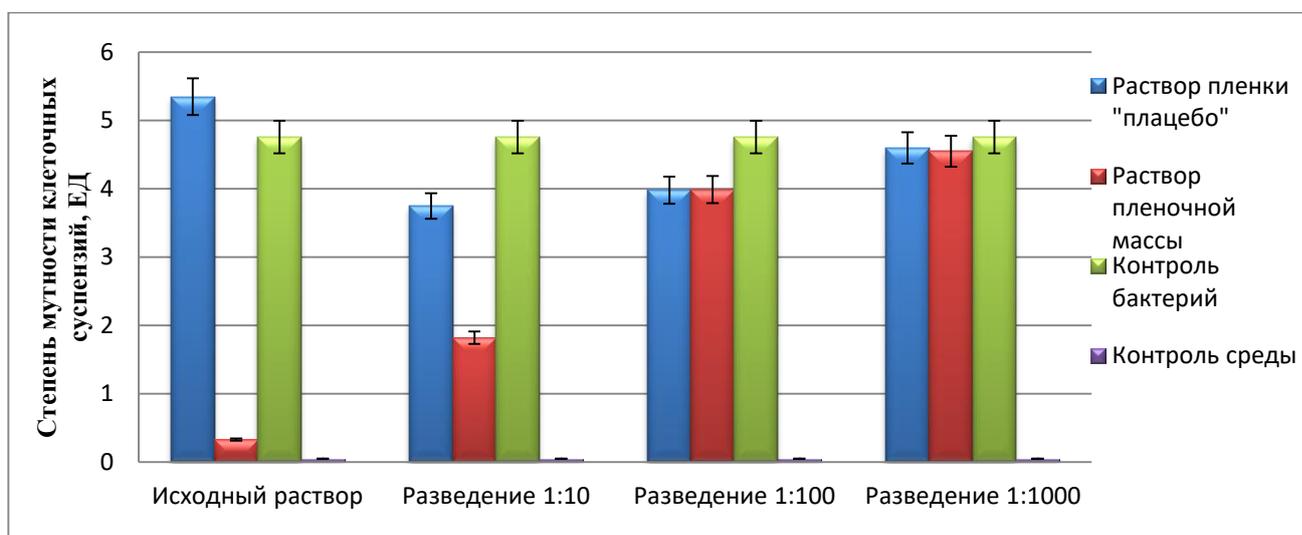


Рисунок 5.1 - Антимикробное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, относительно микроорганизмов *Staphylococcus aureus*

Для пленки «плацебо» в этом же разведении наблюдается увеличение роста колоний микроорганизмов, что может быть связано с тем, что компоненты матрицы пленки являются субстратом для роста данного вида микроорганизмов.

В растворах пленочной массы, в разведении 1:10 и 1:100 также наблюдается снижение роста колоний микроорганизмов, при этом с каждым разведением антимикробная активность уменьшается примерно вдвое. В растворах пленочной массы, в максимальном разведении 1:1000 (содержащих 0,0001 мг янтарной кислоты и 0,00004 мг ЦПХ в 1мл раствора) антимикробное действие практически не проявляется.

При исследовании антимикробного действия модельных образцов ЛПл в отношении *Escherichia coli* установлено (рисунок 5.2), что практически полное угнетение роста микроорганизмов наблюдается в растворе с максимальным содержанием ЦПХ и янтарной кислоты (соответственно 0,04 мг/мл и 0,1 мг/мл).

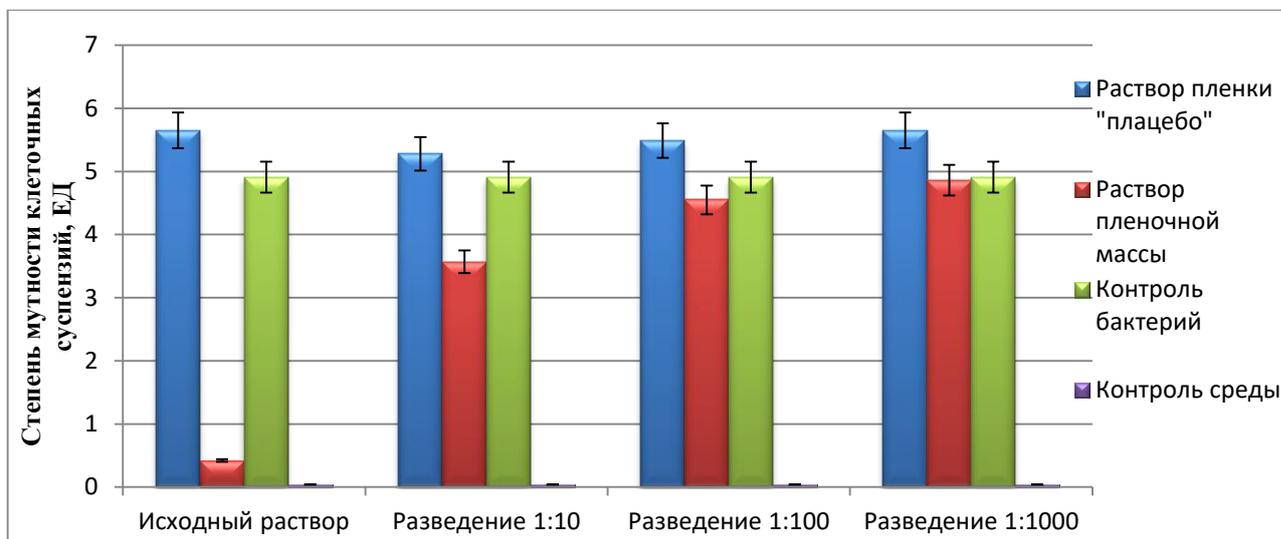


Рисунок 5.2 – Антимикробное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, относительно микроорганизмов *Escherichia coli*

В последующем разведении (1:10) наблюдается резкое снижение антимикробного действия. В последующих разведениях 1:100 и 1:1000 антимикробное действие практически не наблюдается. Также во всех разведениях наблюдается рост микроорганизмов в растворах пленок «плацебо».

При исследовании антимикробного действия модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в отношении *Pseudomonas aeruginosa* установлено (рисунок 5.3), что во всех разведениях не наблюдается проявления антимикробного действия относительно контрольного раствора микроорганизмов. Однако в исходном растворе и в разведении 1:10 степень мутности исследуемых растворов меньше, чем в растворах пленок - «плацебо», что указывает на то, что растворы пленочной массы угнетают жизнедеятельность исследуемых микроорганизмов.

В разведении 1:100 и 1:1000 наблюдается рост микроорганизмов относительно контроля микроорганизмов в растворе ЛПл и пленки «плацебо», не содержащей действующих веществ.

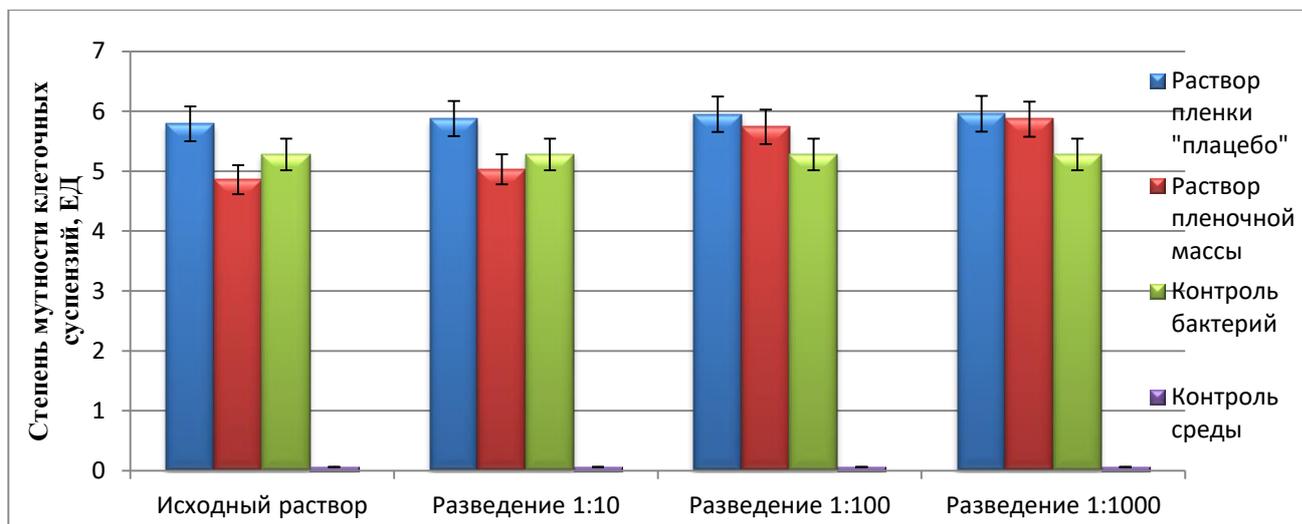


Рисунок 5.3 - Антимикробное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, относительно микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*

Также выявлено выраженное фунгицидное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в отношении *Candida albicans* во всех исследуемых разведениях, однако степень действия существенно снижается с уменьшением содержания ЦПХ и янтарной кислоты в растворе (рисунок 5.4). 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).

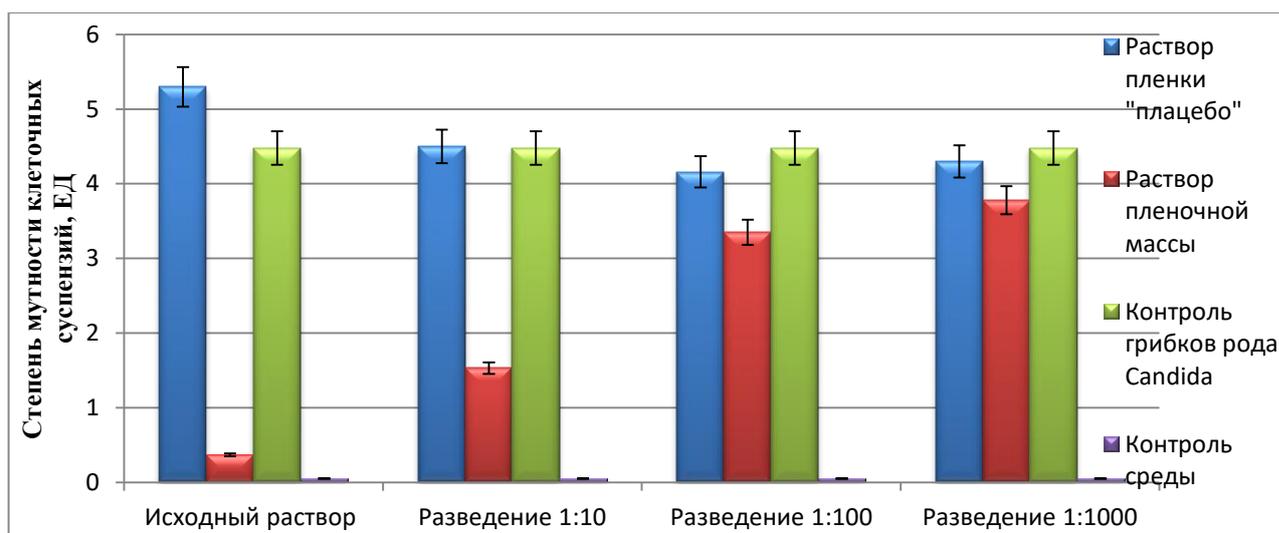


Рисунок 5.4 - Фунгицидное действие модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, относительно *Candida albicans*

В исходном растворе пленки «плацебо» наблюдается увеличение роста колоний грибков рода *Candida* относительно контроля микроорганизмов, 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.

Полученные результаты исследования антимикробного действия методом серийных разведений в жидких питательных средах соответствуют выводам ранее проведенных скрининговых исследований антимикробного действия методом диффузии в агар. Антимикробная активность модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, напрямую связана с наличием в ее составе антисептического компонента – цетилпиридиния хлорида.

5.2. Исследование антиоксидантного действия модельных образцов лекарственной пленки, содержащих янтарную кислоту и ЦПХ

Оценку общей *антиокислительной активности* (ОАА) модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в модельной тест-системе *in vitro* производили, регистрируя ингибирование липопероксидации (накопление веществ, реагирующих с ТБК - реактивными продуктами), согласно методике, приведенной в главе 2 «Объекты и методы исследования». Для определения общей антиокислительной активности применяли заранее заготовленные препараты гомогената головного мозга лабораторных крыс. ОАА оценивали по степени снижения липопероксидации в условиях *in vitro* в присутствии тестируемого раствора в процентах от соответствующих значений контроля на окисляемость.

Установлено, что приготовленные из модельных образцов лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, исследуемые растворы во всех разведениях продемонстрировали способность ингибировать процессы липопероксидации в условиях *in vitro* (рисунок 5.5). Прирост ТБ-РП был значительно меньше контрольных значений.

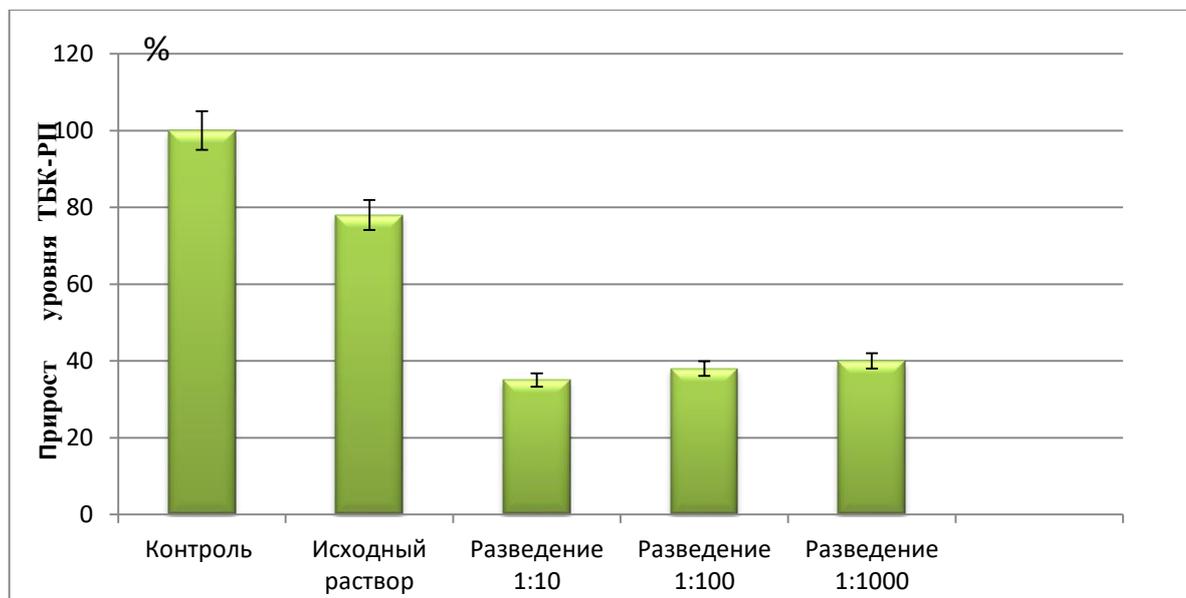


Рисунок 5.5 – Влияние извлечений модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, на перекисление липидов в условиях *in vitro*

ОАА модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, наблюдается на всех уровнях исследуемых разведений. Однако, выраженность антиоксидантного действия исходного тестируемого раствора (содержащий 0,1 мг/мл янтарной кислоты и 0,04 мг/мл ЦПХ) была наименьшей: уровень ТБК-реактивных продуктов был всего лишь на 21,7% меньше контрольных значений и статистически значимо не отличался от них.

В растворах пленочной массы, в разведении 1:10 (содержащих 0,01 мг/мл янтарной кислоты и 0,004 мг/мл ЦПХ), наблюдалось максимальное выраженное антиоксидантное действие, т.к. прирост ТБК - реактивных продуктов статистически значимо отличался от контрольных значений и не превышал 40%-ного уровня относительно контроля на окисляемость.

Выраженная ОАА модельных образцов ЛПл проявляется в диапазоне разведений 10-1000 раз, при этом прооксидантный эффект исследуемой лекарственной формы не проявляется на всех уровнях концентраций.

Определение *противоперекисного действия* модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в условиях *in vitro* проводили спектрофотометрически по методу Королюка М.А., согласно методике, приведенной в главе 2 «Объекты и методы исследования».

Методика основана на реакции с раствором молибдата аммония, с которым пероксид водорода взаимодействует с образованием окрашенного в желтый цвет комплекса с максимумом светопоглощения при длине волны 410 нм.

Противоперекисное действие модельных образцов исследуемых ЛПл представлено на рисунке 5.6.

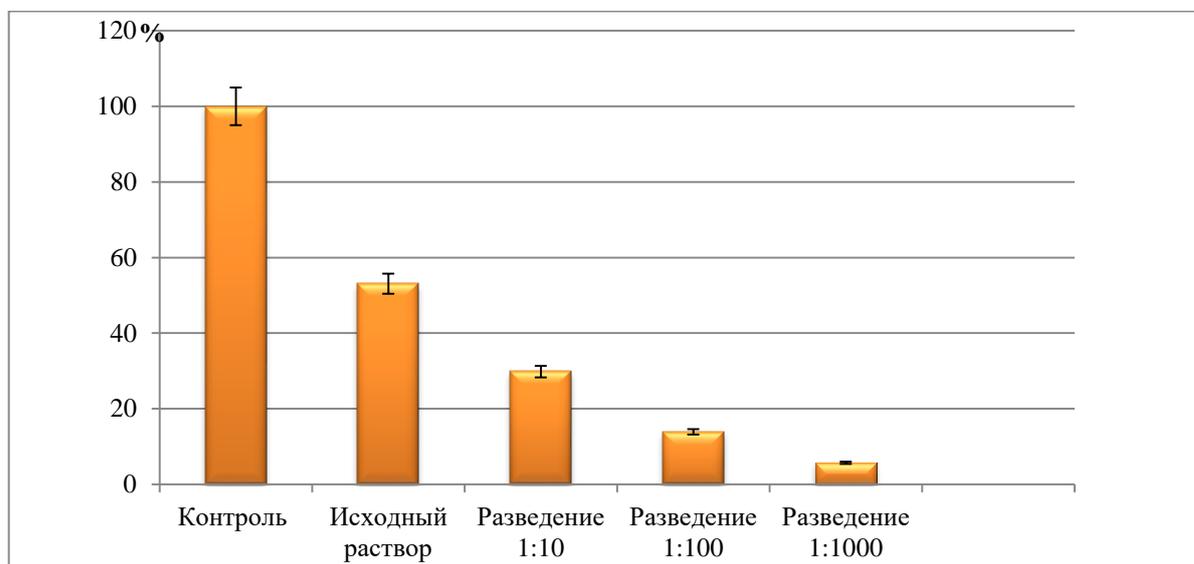


Рисунок 5.6 – Определение противоперекисного действия извлечений модельных образцов ЛПл, содержащей янтарную кислоту и ЦПХ, в условиях *in vitro*

Исходя из полученных результатов, выраженное противоперекисное действие модельных образцов ЛПл, содержащих ЦПХ и янтарную кислоту, проявляется во всем диапазоне разведений. Однако способность растворов утилизировать пероксид водорода снижается с увеличением разведения: исходный тестируемый раствор (содержащий 0,1 мг/мл янтарной кислоты и 0,04 мг/мл ЦПХ) обладает максимальным противоперекисным действием (около 60%), а в разведении 1:1000 наблюдается минимальное действие (не более 6%).

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. 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.

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

Материалы данной главы отражены в следующих работах:

1. 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.

2. 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.

3. 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 биолог. химии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. – Москва, 2019. – С. 62-65.

4. Ножкина, Н.Н. Комплексные исследования пленок лекарственных с антибактериальным и антигипоксантным 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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.

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 не отягощены 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 +15⁰ 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 цетилпиридиния хлорид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамзон, А.А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ,

свойства, применение : учеб. пособие для вузов / А.А. Абрамзон, Л.П. Зайченко, С.И. Файнгольд; под ред. А.А. Абрамзона. – Ленинград : Химия, 1988. – 200 с. – ISBN 5-7245-0001-9.

2. Алексеева, И.В. Комплексные исследования с целью создания лекарственных форм для лечения раневых и воспалительных процессов на основе местноанестезирующего средства : специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : дис.... д-ра фарм. наук / Алексеева Ирина Владимировна. – Пермь, 2009. – 314 с.

3. Алексеева, И.В. Разработка состава, технологии и оценка качества фитопленок на основе сухих растительных экстрактов / И.В. Алексеева, К.Л. Соловьева, Т.А. Веселкова. – Текст электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5. – URL : <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7174> (дата обращения : 23.11.2022).

4. Алексеева, И.В. Состояние и перспективы внедрения лекарственных форм анилокаина в медицинскую практику / И.В. Алексеева, В.И. Панцуркин // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10, ч.15. – С. 3472-3476.

5. Анурова, М.Н. Изучение осмотической активности офтальмологических гелей / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.В. Лапик [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 3. – С. 30-34.

6. Безопасность лекарственных препаратов. – Текст электронный // Государственный реестр лекарственных средств [сайт]. – URL : <http://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения : 23.11.2022).

7. Благоразумная, Е.Ю. Разработка технологии и стандартизация суппозиторий и мази с бактерицидом ветеринарного назначения : специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : дис.... канд. фарм. наук / Благоразумная Екатерина Юрьевна. – Пятигорск, 2008. – 146 с.

8. Блинова, О.А. Пленки с препаратом медицинской пиявки / О.А. Блинова, Г.И. Олешко, С.Д. Марченко, Д.М. Андреева // Фармация. – 2005. – № 2. – С. 18-20.

9. Блинова, О.А. Теоретические и экспериментальные аспекты создания лекарственных средств на основе сырья природного происхождения : специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : дис. ... д-ра фарм. наук / Блинова Ольга Алексеевна. – Пермь, 2009. – 329 с.
10. Бутюгин, И.А. Сравнительный анализ эффективности местного применения антиоксидантов в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита / И.А. Бутюгин, Н.В. Корнилова, О.В. Абрамов // Стоматология. – 2013. – Т. 92, № 1. – С. 31-34.
11. Вавилова, Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта : учеб. пособие / Т.П. Вавилова. – 2-е изд. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 208 с. – ISBN 978-5-9704-1861-1.
12. Воробьев, А.Н. Использование метода ВЭЖХ для количественного определения циннаризина и кислоты янтарной при совместном присутствии / А.Н. Воробьев, А.Ю. Петров // Человек и его здоровье. – 2009. – № 2. – С. 130-133.
13. Гаража, Н.Н. Эффективность антиоксидантного препарата мексидол в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / Н.Н. Гаража, Я.Н. Гарус, А.В. Ивашова, А.А. Сакуро // Стоматология. – 2006. – № 6. – С.19-21.
14. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография) : т. 2 / Ф. Гейсс; под ред. В.Г. Березкина. – Москва, 1999. – 348 с.
15. Гингивит и болезни пародонта. – Текст электронный // Международная классификация болезней МКБ-10 [сайт]. – URL : <http://www.mkb10.ru/?class=11&bloc=111&diag=4586> (дата обращения : 23.11.2022).
16. Голованенко, А.Л. Исследования по разработке состава, технологии и стандартизации стоматологических пленок анестезирующего действия: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического

дела» : дис. ... канд. фарм. наук / Голованенко Анна Леонидовна. – Пермь, 2000. – 159 с.

17. Голованенко, А.Л. Основные подходы к стандартизации пленок лекарственных / А.Л. Голованенко, М.М. Смирнова, И.В. Алексеева, О.А. Блинова. – Текст электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – URL : <https://science-education.ru/ru/article/view?id=5694> (дата обращения : 23.11.2022).

18. Голуб, В.А. Асептика и антисептика / В.А. Голуб. – Волгоград : ВолгГМУ, 2019. – 85 с.

19. ГОСТ 25779-90. Игрушки. Общие требования безопасности и методы контроля : межгосударственный стандарт : дата введения 1992-01-01. – Москва : ИПК изд-во Стандартов, 2008. – 17 с.

20. ГОСТ 30828-2002. Вещества поверхностно-активные анионные. Методы определения активного вещества : межгосударственный стандарт : дата введения 2004-09-01. – Минск : Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2004. – 8 с.

21. ГОСТ 32152-2013. Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы определения содержания янтарной, молочной и 3D-оксимасляной кислот : межгосударственный стандарт : дата введения 2015-07-01. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 14 с.

22. ГОСТ 54375-2011. Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы определения содержания янтарной, молочной и 3D-оксимасляной кислот : межгосударственный стандарт : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5 августа 2011 г. № 220-ст : дата введения 2012-07-01. – Москва : Стандартинформ, 2012. – 17 с.

23. Государственная фармакопея Российской Федерации. – Текст электронный. – XIV изд. // Федеральная электронная медицинская библиотека [сайт]. – Москва, 2018. – URL : <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения : 23.11.2022).

24. Грудянов, А.И. Профилактика воспалительных заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, В.В. Овчинникова. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2007. – 80 с. – ISBN 5-89481-499-5.
25. Дзюба, В.Ф. Разработка методов стандартизации новых ноотропных препаратов на основе пантогама и кислоты янтарной с использованием физико-химических методов / В.Ф. Дзюба, А.И. Сливкин, С.Н. Суслина и др. // Вестник Воронежского государственного университета, 2011. – № 1. – С. 177-185. – (Серия «Химия. Биология. Фармация»).
26. Диплен-Дента М (с метронидазолом), Норд-Ост. – Текст электронный // ТЕХСТОМ [сайт]. – URL : <https://tehstom.ru/catalog/1960/23246/> (дата обращения : 23.11.2022).
27. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение) : физиологические и клиничко-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – Санкт-Петербург : Мед. пресса, 2006. – 397 с. – ISBN 5-85474-072-9.
28. Жезняковская, Л.Ф. Стоматологические пленки на основе растительных экстрактов / Л.Ф. Жезняковская, Д.Г. Долинина, Л.Б. Оконенко // Фармация. – 2012. – № 7. – С. 35-37.
29. Заболевания слизистой оболочки рта : учеб.-метод. пособие / М.Н. Волкова, Ю.П. Чернявский, Н.А. Сахарук, Ю.Р. Еленская. – Витебск : ВГМУ, 2016. – 236 с.
30. Зеленский, И.В. Анализ эффективности препаратов для лечения патологии пародонта / И.В. Зеленский, Б.Б. Сысуев, В.А. Зеленский, А.А. Долгалев. – Текст электронный // DENTAL MAGAZINE [сайт]. – URL : <https://dentalmagazine.ru/posts/analiz-jeffektivnosti-preparatov-dlja-lechenija-patologii-parodonta.html> (дата обращения : 23.11.2022).
31. Измерение концентраций вредных веществ в воздухе рабочей зоны : сб. метод. указаний. – Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – Вып. 45. – 199 с.
32. Клинические рекомендации (протоколы лечения) при диагнозе гингивит. –

Текст электронный // Официальный сайт Стоматологической Ассоциации России [сайт]. – URL : https://e-stomatology.ru/director/protokols/protokols_30-09-2014/5_gingivit_8aug2018.docx (дата обращения : 23.11.2022).

33. Клинические рекомендации (протоколы лечения) при диагнозе пародонтит. – Текст электронный // Министерство здравоохранения Мурманской области [сайт]. – URL : https://minzdrav.gov-murman.ru/documents/poryadki-okazaniya-meditsinskoj-promoshchi/8_parodontit.pdf (дата обращения : 23.11.2022).

34. Кожокеева, В.А. Воспалительные заболевания пародонта. Пародонтологическое лечение с позиций доказательной медицины / В.А. Кожокеева. – Бишкек, 2011. – 118 с. – ISBN 978-9967-05-783-8.

35. Корнилова, Н.В. Клинико-лабораторное обоснование эффективности применения производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на этапе медикаментозного лечения хронического генерализованного пародонтита : специальность 14.01.14 «Стоматология», 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» : дис. ... канд. мед. наук / Корнилова Наталья Валентиновна. – Екатеринбург, 2011. – 130 с.

36. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

37. КП-Пласт антимикробный. – Текст электронный // Владмива [сайт]. – URL: <https://tdvladmiva.ru/product/kp-plast-antimikr-dvukhsloynye-2sht-vladmiv/> (дата обращения : 28.11.2022).

38. Кравец, О.Н. Выявление и коррекция нарушений свободнорадикального окисления в ротовой жидкости при хроническом генерализованном пародонтите : специальность 14.00.21 «Стоматология» : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Кравец Ольга Николаевна. – Уфа, 2007. – 22 с.

39. Курганова, В.А. Экспериментальное и клиническое исследование лечения пародонтита трансмембранным диализом янтарной кислоты и витаминов В1, рр, с / В.А. Курганова, Л.С. Васильева, В.Д. Молоков // Сибирский медицинский

журнал. – 2006. – № 6. – С. 26-29.

40. Лемецкая, Т.И. Влияние мексидола на мягкие ткани полости рта в условиях стоматологической патологии / Т.И. Лемецкая, Т.В. Сухова, Ю.А. Петрович // Стоматология. – 2008. – № 6. – С. 31-35.

41. Леонов, К.А. Совместное определение янтарной кислоты и водорастворимых витаминов методом ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии / К.А. Леонов, А.В. Пустовойтов, Д.А. Вишенкова // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73, № 4. – С. 271-277.

42. Лосенкова, С.О. Стандартизация трансдермального пластыря с мексидолом / С.О. Лосенкова, Э.Ф. Степанова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012. – Т. 17, № 4. – С. 220-222. – (Серия «Медицина. Фармация»).

43. Маринина, Т.Ф. Разработка технологии и анализ двухслойных стоматологических пленок противовоспалительного и анестезирующего действия / Т.Ф. Маринина, Х.Н. Гюльбякова. – Текст электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – URL : <https://science-education.ru/ru/article/view?id=13902> (дата обращения : 29.11.2022).

44. Мельников, О.Ф. Экспериментальное изучение влияния препарата септолете плюс на факторы противовирусного иммунитета *in vitro*. – Текст электронный / О.Ф. Мельников, М.Д. Тимченко, Л.Д. Кривохатская, Э.А. Мурзина // MEDI.RU [сайт]. – URL : <https://medi.ru/info/5701/> (дата обращения : 29.11.2022).

45. Методические рекомендации по применению лекарственных желатиновых пленок, желатиновых стоматологических шин, желатиновых гранул, желатиновых трубочек, в основе механизма действия которых лежит нанотехнологическая матрица доставки лекарственных веществ. – Текст электронный // Аптека Реагент [сайт]. – Тюмень, 2010. – URL : <https://apteka-reagent.ru/Продукция/Рекомендации> (дата обращения : 29.11.2022).

46. Моросанова, М.А. Твердофазно-спектрофотометрическое определение

- катионных поверхностно-активных веществ на основе системы кремний-титановый ксерогель–пирокатехиновый фиолетовый / М.А. Моросанова, Е.И. Моросанова // Журнал аналитической химии. – 2021. – Т. 76. – № 1. – С. 59-66.
47. О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации : указ Президента Российской Федерации от 02.07.2021 г. № 400. – Текст электронный // Официальный интернет-портал правовой информации [сайт]. – URL :<http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202107030001?index=0&rangeSize=1> (дата обращения: 28.11.2022).
48. Опарин, С.В. Применение Мексидола в композиции лекарственных препаратов, иммобилизованных на желатиновых шинах, для местной активной патогенетической терапии начальных стадий воспалительных заболеваний пародонта / С.В. Опарин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006, прил. № 1. – С. 209.
49. Ополаскиватель для полости рта Colgate Plax. – Текст электронный / Colgateprofessional [сайт]. – URL: <https://www.colgateprofessional.ru/products/products-list/colgate-plax> (дата обращения : 29.11.2022).
50. Определение органических кислот в напитках. – Текст электронный // Люмэкс [сайт]. – URL: https://www.lumex.ru/complete_solutions/12ar03_01_09_1.php (дата обращения : 29.11.2022).
51. Определение остаточных количеств цетилпиридиний хлорида в мясе кур и продуктах его переработки : метод. указания. – Москва, 2009. – 9 с.
52. Орехов, Д.В. Показатели рН смешанной слюны у больных для сохранения интактных зубных рядов / Д.В. Орехов, В.О. Никулин, Л.А. Ячменева, Т.В. Кубрушко // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 6. – С. 52-53.
53. Пассет, Б.В. Практикум по техническому анализу и контролю в производстве химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков / Б.В. Пассет, М.А. Антипов. – Москва : Медицина, 1981. – 272 с.
54. Патент № 1658043 Российская Федерация. Способ определения цетилпиридиния в водных растворах : № 4640051/04 : заявл. 24.01.1989: опубл.

- 23.06.1991 / Чернова Р.К., Штыков С.Н., Бронштейн Ю.М., Гвоздева Е.М.
55. Патент № 1755134 Российская Федерация. Способ количественного определения катионных поверхностно-активных веществ : № 4879993/25 : заявл. 05.11.1990 : опубл. 15.08.1992 / Сухан В.В., Запорожец О.А., Куличенко С.А., Доленко С.А.
56. Патент № 2075965 Российская Федерация. Средство для лечения заболеваний полости рта : № 94036668/14 : заявл. 29.09.1994 : опубл. 27.03.1997 / Чухаджян Г.А., Чухаджян А.Г., Чухаджян А.Г.
57. Патент № 2155071 Российская Федерация. Способ получения лекарственной фитопленки : № 99117395/14 : заявл. 10.08.1999 : опубл. 27.08.2000 / Мизина П. Г., Куркин В. А., Косарев В. В.
58. Патент № 2190214 Российская Федерация. Способ хроматографического определения молочной кислоты : № 2001110672/13 : заявл. 20.04.2001 : опубл. 27.09.2002 / Нестеренко П.Н., Кебец П.А.
59. Патент № 2590980 Российская Федерация. Фармацевтическая композиция для местного применения, обладающая антибактериальным, противовоспалительным и иммуномодулирующим действием, и ее применения : № 2009148264/15: заявл. 24.12.2009 : опубл. 10.07.2016 / Купсин Е.В.
60. Побожьева, Л.В. Роль биопленки в патогенезе воспалительных заболеваний полости рта и способы ее устранения / Л.В. Побожьева, И.С. Копецкий // Лечебное дело. – 2012. – Т. 2. – С. 9-13.
61. Препараты с Цетилпиридиния хлорид (*Cetylpyridinium chloride*). – Текст электронный // VIDAL : справочник лекарственных средств [сайт]. – URL : <https://www.vidal.ru/drugs/molecule-in/204> (дата обращения: 29.11.2022).
62. Применение адгезивных плёнок «Диплен-Дента» в комплексном лечении пародонтита / В.Н. Царев, Р.В. Ушаков, Л.Я. Плахтий, Г.А. Чухаджан. – Москва, 2002. – 89 с. – ISBN 5-8336-0288-2.
63. Применение препарата Мексидол в профилактике и комплексном лечении воспалительных заболеваний полости рта : учеб.-метод. пособие для врачей. – Текст электронный / Т.И. Лемецкая, Э.М. Кузьмина, Т.В. Сухова, Ю.А. Петрович

// MEDI.RU [сайт]. – Москва, 2005. – URL : <https://medi.ru/info/1255/> (дата обращения : 29.11.2022).

64. Пуджюнене, Г. Разработка полимерных пленок содержащих иммобилизованную протеазу и диоксидин / Г. Пуджюнене, В. Вайчювенас, В. Янулис, Ю. Степановичюс // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 1. – С. 34-36.

65. Развитие фармацевтической и медицинской промышленности : гос. программа Российской Федерации. – Текст электронный // Правительство России [сайт]. – URL : <http://government.ru/rugovclassifier/843/events/> (дата обращения : 28.11.2022).

66. Сампиев, А.М. Современное состояние исследований в области создания стоматологических пленок / А.М. Сампиев, Е.Б. Никифорова, А.В. Соповская // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3-2. – С. 293-297.

67. Саушкина, А.С. Перспективы использования стоматологических лекарственных пленок с аскорбиновой кислотой и рутином для лечения и профилактики заболеваний пародонта / А.С. Саушкина, Л.Н. Савченко, Б.А. Чакчир, Т.Ф. Маринина // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2013. – № 3 (43). – С. 118-125.

68. Сеткина, С.Б. Биофармацевтические аспекты технологии лекарственных средств и пути модификации биодоступности / С.Б. Сеткина, О.М. Хишова // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 162-172.

69. Симонян, Е.В. Использование спектрофотометрии и ВЭЖХ для определения фармацевтической доступности и количественной оценки кислоты янтарной и никотиновой в суппозиториях / Е.В. Симонян, М.А. Хачатрян // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 5-4. – С. 602-607.

70. Симонян, Е.В. Исследование химического состава прополиса и теоретическое обоснование применения его в комплексе с производными

карбоновых кислот / Е.В. Симонян // Международный журнал экспериментального образования. – 2016. – № 5-3. – С. 309-313.

71. Сливкин, А.И. Фармацевтическая технология. Высокомолекулярные соединения в фармации и медицине / А.И. Сливкин; под ред. И.И. Краснюка. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 560 с. – ISBN 978-5-9704-3834-3.

72. Соловьева, А.М. Клиническая оценка противовоспалительной и противоналетной эффективности ополаскивателя на основе цетилпиридиний хлорида / А.М. Соловьева, Е.Е. Лях, К.А. Шумов // Научно-практический журнал института Стоматологии. – 2014. – № 1 (62). – С. 38-40.

73. Спектрофотометрическое измерение массовых концентраций 1-гексадецил-пиридиний хлорида моногидрата (цетилпиридиний хлорид моногидрат) в воздухе рабочей зоны : метод. указания. – Текст электронный // МедиаСервис [сайт]. – URL : <https://docinfo.ru/muk/muk-4-1-1716-03/> (дата обращения : 28.11.2022).

74. Стратегия лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года. – Текст электронный // ГАРАНТ.РУ [сайт]. – URL : <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70217532/> (дата обращения : 28.11.2022).

75. Терапевтическая стоматология : в 3 ч. Ч. 2. Болезни пародонта : учебник / под ред. Г. М. Барера. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 224 с. – ISBN 978-5-9704-0621-2.

76. Триус, Н.В. Общие требования и показатели качества лекарственной формы – пленки лекарственные / Н. В. Триус, В. Е. Чичиро // Сборник докладов, посвященный 20-летию создания ГНИИСКЛС МЗ СССР. – 1990. – Т. 1. – С.60-61.

77. Удянская, И.Л. Зубные пасты линейки «MEXIDOL dent» — парафармацевтические препараты с устойчивой антиоксидантной активностью / И.Л. Удянская, Т.К. Слонская, В.Г. Янкова [и др.] // Стоматология. – 2020. – Т. 99, № 2. – С. 45-49.

78. Улитовский, С.Б. Роль ополаскивателей в гигиене полости рта / С.Б.

Улитовский // Гигиена полости рта. – 2011. – № 2. – С. 63-64.

79. Усманова, И.Н. Роль условно-патогенной микрофлоры полости рта в развитии воспалительных заболеваний пародонта и слизистой полости рта (обзор литературы) / И.Н. Усманова, М.М. Туйгунов, Л.П. Герасимова [и др.] // Вестник Южно-Уральского государственного университета. – 2015. – Т. 15, № 2. – С. 37-44. – (Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура»).

80. Ушаков, Р.В. Перспективы разработки адгезивной двухслойной пленки Диплен-Дента с комбинированным антибактериальным и фунгицидным эффектом / Р.В. Ушаков, Т.В. Ушакова, Н.И. Пакшин [и др.] // Медицинский алфавит. – 2015. – Т. 1, № 1. – С. 15-18.

81. Ушаков, Р.В. Разработка адгезивной двухслойной пленки с комбинированным антимикробным, противовоспалительным и антиоксидантным действием для лечения воспалительных заболеваний пародонта / Р.В. Ушаков, В. Н. Царев, А. Р. Ушаков [и др.] // Пародонтология. – 2015. – Т. 20, № 3 (76). – С. 42-45.

82. Фармакотерапия заболеваний пародонта : учеб. пособие / сост. : Л.А. Усов, Н.Ф. Усова. – Иркутск : ИГМУ, 2011. – 29 с.

83. Фурин, В.А. Разработка методов применения лекарственных желатиновых пленок в военной и гражданской медицине : специальность 14.00.25 «Фармакология, клиническая фармакология» : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Фурин Виктор Александрович. – Уфа, 2004. – 20 с.

84. Царёв, В.Н. Пространственно-временная модель формирования биоплёнки полости рта : взаимосвязь процессов первичной адгезии и микробной колонизации / В.Н. Царёв, А.Г. Трефилов, Г.Н. Клейменова, А.В. Лёвкин // DENTAL FORUM. – 2011. – № 5. – С. 126-131.

85. Цвирова, И.М. Инструкция № 6 по применению дезинфицирующего средства «Оротол Плюс» / И.М. Цвирова, Л.С. Федорова, Л.Г. Пантелеева [и др.]. – Текст электронный // MEDEZ [сайт]. – URL : https://medez.ru/wp-content/uploads/2020/11/instruction_orotol-plus-instr-6-2007-pdf (дата обращения : 28.11.2022).

86. Церигель. – Текст электронный // WebApteka.RU [сайт]. – URL : <https://www.webapteka.ru/drugbase/name7328.html> (дата обращения : 29.11.2022).
87. Чернявский, Ю.П. Асептика и антисептика в терапевтической стоматологии : пособие / Ю.П. Чернявский, Т.И. Першукевич. – Витебск : ВГМУ, 2014. – 194 с. – ISBN 978-985-466-667-9.
88. Шикова, Ю.В. Влияние высокомолекулярных соединений на адсорбционную активность мази / Ю.В. Шикова, В.А. Лиходед, Е.В. Симонян, А.В. Епифанова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 2 (3). – С. 44-45.
89. Шорманов, В.К. Фотометрическое определение янтарной кислоты в жидких препаратах / В.К. Шорманов, О.М. Швец, М.А. Беликова, О.В. Тарасова // Фармация. – 2020. Т. 69, № 7. – С. 17-22.
90. Шульгина, М.В. Разработка принципов изучения механизма антибактериального действия веществ на доклиническом этапе создания лекарственных средств : специальность 14.00.25 «Фармакология», 03.00.07 «Микробиология» : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Шульгина Марина Владимировна. – Москва, 1999. – 47 с.
91. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптационных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников, В.Э. Цейликман. – Челябинск : Изд-во ЧГПУ, 2000. – 167 с. – ISBN 5-85716-312-9.
92. Электронный справочник : химические и физические свойства : янтарная кислота. – Текст электронный // CHEMPORT.RU [сайт]. – URL : http://www.chemport.ru/chemical_substance_1349.html (дата обращения : 28.11.2022).
93. Abdelwahab, N.S. Validated RP-HPLC and TLC-Densitometric Methods for Analysis of Ternary Mixture of Cetylpyridinium Chloride, Chlorocresol and Lidocaine in Oral Antiseptic Formulation / N.S. Abdelwahab, N.W. Ali, M. Abdelkawy, A.A. Emam // Journal of chromatographic science. – 2016. – Vol. 54, № 3. – P. 318-325.
94. Abe, Y. Antimicrobial effects of viscous mouthrinses containing cetylpyridinium chloride and isopropyl methylphenol / Y. Abe, Y. Okazaki, K.

Dainobu [et al.] // American Journal of Dentistry. – 2020. – Vol. 33, № 5. – P. 235-238.

95. Alvarez, D.M. Cetylpyridinium chloride blocks herpes simplex virus replication in gingival fibroblasts / D.M. Alvarez, L.F. Duarte, N. Corrales [et al.]. – Text electronic // Antiviral Research. – 2020. – Vol. 179. – URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354220302321?via%3Dihub> (дата обращения : 28.11.2022).

96. Araujo, H.C. Novel Colloidal Nanocarrier of Cetylpyridinium Chloride: Antifungal Activities on Candida Species and Cytotoxic Potential on Murine Fibroblasts / H.C. Araujo, L.S. Arias, A.C.M. Caldeirão [et al.] // Journal of fungi. – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 218.

97. Belal, T.S. Gradient HPLC-Diode Array Detector Stability-Indicating Determination of Lidocaine Hydrochloride and Cetylpyridinium Chloride in Two Combined Oral Gel Dosage Forms / T.S. Belal, R.A. Shaalan, R.S. and Haggag [et al.] // Journal of AOAC International. – 2011. – Vol. 94, № 2. – P. 503-512.

98. Benamor, M. Spectrophotometric determination of cetylpyridinium chloride in pharmaceutical products / M. Benamor, N. Aguersif, M.T. Draa // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2001. – Vol. 26, № 1. – P. 151-154.

99. Bereswill, S. Susceptibility in vitro of Helicobacter pylori to cetylpyridinium chloride / S. Bereswill, T. Vey, M. Kist // Immunology and medical microbiology. – 1999. – Vol. 24, № 2. – P. 189-192.

100. Bukanski, B.W. Analysis of domiphen bromide and cetylpyridinium chloride in cosmetic products by high-performance liquid chromatography / B.W. Bukanski // International journal of cosmetic science. – 1987. – Vol. 9, № 4. – P. 193-198.

101. Carrouel, F. Antiviral Activity of Reagents in Mouth Rinses against SARS-CoV-2 / F. Carrouel, L.S. Gonçalves, M.P. Conte [et al.] // Journal of dental research. – 2021. – Vol. 100, № 2. – P. 124-132.

102. Chen, Z.G. Simultaneous determination of eight organic acids in Fructus mume by RP-HPLC / Z.G. Chen, B.T. En, Z.Q. Zhang // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2006. – Vol. 31, № 21. – P. 1783-1786.

103. Ehrhardt, A. Glass ionomer cement modified by a imidazolium salt: adding antifungal properties to a biomaterial / A. Ehrhardt, J.Z. Mandelli, V. Bérghamo [et al.] // *Brazilian journal of microbiology*. – 2021. – Vol. 52, № 3. – P. 1347-1352.
104. Ensafi, A.A. Non-extraction flow injection determination of cationic surfactants using eriochrome black-T / A.A. Ensafi, B. Hemmateenejad, S. Barzegar // *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. – 2009. – Vol. 73, № 5. – P. 794-798.
105. Evans, A. Inhibitory effects of antiseptic mouthrinses on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus acidophilus* / A. Evans, S.J. Leishman, L.J. Walsh, W.K. Seow // *Australian dental journal*. – 2015. – Vol. 60, № 2. – P. 247-254.
106. Fabbri, S. High-Velocity Microsprays Enhance Antimicrobial Activity in *Streptococcus mutans* Biofilms / S. Fabbri, D.A. Johnston, A. Rmaile [et al.] // *Journal of dental*. – 2016. – Vol. 95, № 13. – P. 1494-1500.
107. Figuero, E. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: A systematic review and network meta-analyses / E. Figuero, D. Herrera, A. Tobías [et al.] // *Journal of clinical periodontology*. – 2019. – Vol. 46, № 7. – P. 723-739.
108. Firatli, E. Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation / E. Firatli, T. Unal, U. Onan, P. Sandalli // *Journal of clinical periodontology*. – 1994. – Vol. 21, № 10. – P. 680-683.
109. Funk, B. Efficacy and potential use of novel sustained release fillers as intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* biofilm in vitro / B. Funk, D. Kirmayer, S. Sahar-Heft [et al.] // *BMC oral health*. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 190.
110. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. – Text electronic // World Health Organization [site]. – URL : <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484> (дата обращения : 28.11.2022).
111. Green, A. In vitro assessment of the virucidal activity of four mouthwashes containing Cetylpyridinium Chloride, ethanol, zinc and a mix of enzyme and proteins against a human coronavirus / A. Green, G. Roberts, T. Tobery [et al.]. – Text

- electronic // BioRxiv [site]. – URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.28.359257v1> (дата обращения : 28.11.2022).
112. Guo, D.H. Simultaneous determination of 11 organic acids in fruit juice by ion exclusion chromatography / D.H. Guo, L. Xia // *Se Pu*. – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 276-278.
113. Herrera, D. Is the oral cavity relevant in SARS-CoV-2 pandemic? / D. Herrera, J. Serrano, S. Roldán, M. Sanz // *Clinical oral investigations*. – 2020. – Vol. 24, № 8. – P. 2925-2930.
114. Izzetti, R. COVID-19 Transmission in Dental Practice: Brief Review of Preventive Measures in Italy / R. Izzetti, M. Nisi, M. Gabriele [et al.] // *Journal of dental research*. – 2020. – Vol. 99, № 9. – P. 1030-1038.
115. Kim, Y.J. Prostaglandin production by human gingival fibroblasts inhibited by triclosan in the presence of cetylpyridinium chloride / Y.J. Kim, C.R. Jr., K.L. Kirkwood // *Journal of periodontology*. – 2005. – Vol. 76, № 10. – P. 1735-1742.
116. Langa, G.P.J. Antiplaque and antigingivitis efficacy of cetylpyridinium chloride with zinc lactate compared with essential oil mouthrinses : Randomized clinical trial / G.P.J. Langa, J. Cavagni, F.W.M.G. Muniz [et al.] // *The Journal of the American Dental Association*. – 2021. – Vol. 152, № 2. – P. 105-114.
117. Lee, J.E. The antiplaque and bleeding control effects of a cetylpyridinium chloride and tranexamic acid mouth rinse in patients with gingivitis / J.E. Lee, J.M. Lee, Y. Lee [et al.] // *Journal of periodontal & implant science*. – 2017. – Vol. 47, № 3. – P. 134-142.
118. Lee, S.S. Antiplaque/antigingivitis efficacy and safety of a cetylpyridinium chloride/zinc gluconate mucoadhesive gel. Results of a 6-month clinical trial / S.S. Lee, R.M. Apécio, W. Zhang [et al.] // *Compendium of continuing education in dentistry*. – 2008. – Vol. 29, № 5. – P. 302-304, 306, 308.
119. Lee, V.A. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride-containing nanoemulsion / V.A. Lee, R. Karthikeyan, H.R. Rawls, B.T. Amaechi // *Journal of dentistry*. – 2010. – Vol. 38, № 9. – P. 742-749.

120. LeeHuyck, C. The Effect of Cetylpyridinium Chloride on the Bacterial Growth in the Oral Cavity / LeeHuyck C. // Journal of the American Pharmaceutical Association. – 1945. – Vol. 34, issue 1. – P. 5-11.
121. Li, Z.Y. The prevention and control of a new coronavirus infection in department of stomatology / Z.Y. Li, L.Y. Meng. – Text electronic // Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2020. – Vol. 55. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32057210/> (дата обращения : 28.11.2022).
122. Lian, H.Z. Simultaneous determination of oxalic, fumaric, maleic and succinic acids in tartaric and malic acids for pharmaceutical use by ion-suppression reversed-phase high performance liquid chromatography / H.Z. Lian, L. Mao, X.L. Ye, J. Miao // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1999. – Vol. 19. – P. 621-625.
123. Lin, X. Determination of organic acids in rice wine by ion-exclusion chromatography / X. Lin, W. Wei, Z. He, X. Lin // Se Pu. – 2014. – Vol. 32, № 3. – P. 304-308.
124. Maillard, J.Y. Energy dispersive analysis of X-rays study of the distribution of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on the Pseudomonas aeruginosa bacteriophage F116 / J.Y. Maillard, A.C. Hann, T.S. Beggs [et al.] // Letters in applied microbiology. – 1995. – Vol. 20, № 6. – P. 357-360.
125. Mao, X. Cetylpyridinium Chloride : Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance / X. Mao, D.L. Auer, W. Buchalla [et al.]. – Text electronic // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2020. – Vol. 64, № 8. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7526810/> (дата обращения: 28.11.2022).
126. Maris, P. Modes of action of disinfectants / P. Maris // Revue scientifique et technique. – 1995. – Vol. 14, № 1. – P. 47-55.
127. Mateos-Moreno, M.V. Oral antiseptics against coronavirus : in-vitro and clinical evidence / M.V. Mateos-Moreno, A. Mira, V. Ausina-Márquez, M.D. Ferrer // The Journal of hospital infection. – 2021. – Vol. 113. – P. 30-43.
128. Minghetti, P. Buccoadhesive tablets for the slow delivery of cetylpyridinium chloride: design and in vitro/in vivo analysis / P. Minghetti, B. Pacchetti, L. Montanari

- [et al.] // *Bollettino chimico farmaceutico*. – 1997. – Vol. 136, № 7. – P. 543-548.
129. Miranda, S.L.F. In Vitro Antimicrobial Effect of Cetylpyridinium Chloride on Complex Multispecies Subgingival Biofilm / S.L.F. Miranda, J.T. Damaceno, M. Faveri [et al.] // *Brazilian dental journal*. – 2020. – Vol. 31, № 2. – P. 103-108.
130. Mohamed, G.G. Potentiometric determination of cetylpyridinium chloride using a new type of screen-printed ion selective electrodes / G.G. Mohamed, T.A. Ali, M.F. El-Shahat [et al.] // *Analytica chimica acta*. – 2010. – Vol. 673, № 1. – P. 79-87.
131. Mukherjee, P.K. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to assess the safety and effectiveness of a novel dual-action oral topical formulation against upper respiratory infections / P.K. Mukherjee, F. Esper, K. Buchheit [et al.] // *BMC infectious diseases*. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 74.
132. Paesen, J. Quantitative analysis of quaternary ammonium antiseptics using thin-layer densitometry / J. Paesen, I. Quintens, G. Thoithi [et al.] // *Journal of chromatography. A*. – 1994. – Vol. 677, № 2. – P. 377-384.
133. Paschoal, L.R. Simultaneous determination of benzocaine and cetylpyridinium chloride in tablets by first-derivative spectrophotometric method / L.R. Paschoal, W.A. Ferreira // *Farmaco*. – 2000. – Vol. 55, № 11-12. – P. 687-693.
134. Paunovska, M.L. Effects of Addition of Quaternary Ammonium Antimicrobial Compounds into Root Canal Sealers / M. L. Paunovska, N. J. Coleman, M. M. Stevanovic [et al.] // *European journal of dentistry*. – 2019. – Vol. 13, № 2. – P. 243-247.
135. Peck, M.T. The antimicrobial activity of four herbal based toothpastes against specific primary plaque colonizers / M.T. Peck. – Text electronic // University of the Western Cape [site]. – 2007. – URL : <http://hdl.handle.net/11394/2746> (дата обращения : 29.11.2022).
136. Popkin, D.L. Cetylpyridinium chloride (CPC) exhibits potent, rapid activity against influenza viruses in vitro and in vivo / D.L. Popkin, S. Zilka, M. Dimaano [et al.] // *Pathogens & immunity*. – 2017. – Vol. 2, № 2. – P. 252-269.
137. Quisno, R. Cetyl pyridinium chloride : I. Germicidal properties / R. Quisno, M.J. Foter // *Journal of bacteriology*. – 1946. – Vol. 52, № 1. – P. 111-117.

138. Rao, D. Efficacy of an alcohol-free CPC-containing mouthwash against oral multispecies biofilms / D. Rao, E. Arvanitidou, L. Du-Thumm, A.H. Rickard // *The Journal of clinical dentistry*. – 2011. – Vol. 22, № 6. – P. 187-194.
139. Rodríguez-Morales, S. Liquid chromatography determination of residue levels on apples treated with cetylpyridinium chloride / S. Rodríguez-Morales, X. Zhou, H. Salari [et al.] // *Journal of chromatography. A*. – 2005. – Vol. 1062, № 2. – P. 285-289.
140. Rösing, C.K. Efficacy of two mouthwashes with cetylpyridinium chloride : a controlled randomized clinical trial / C.K. Rösing, J. Cavagni, E.J. Gaio [et al.] // *Brazilian oral research*. – 2017. – Vol. 31. – P. 47.
141. Seneviratne, C.J. Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: randomized control trial in Singapore / C.J. Seneviratne, P. Balan, K.K.K. Ko [et al.] // *Infection*. – 2021. – Vol. 49, № 2. – P. 305-311.
142. Seo, H.W. Cetylpyridinium chloride interaction with the hepatitis B virus core protein inhibits capsid assembly / H.W. Seo, J.P. Seo, Y. Cho [et al.] // *Virus research*. – 2019. – Vol. 263. – P. 102-111.
143. So Yeon, L. Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride / L. So Yeon, L. Si Young // *Biocontrol science*. – 2019. – Vol. 24, № 1. – P. 13-21.
144. Steinberg, D. Testing a degradable topical varnish of cetylpyridinium chloride in an experimental dental biofilm model / D. Steinberg, M. Moldovan, D. Molukandov // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2001. – Vol. 48, issue 2. – P. 241-243.
145. Steyer, A. A Throat Lozenge with Fixed Combination of Cetylpyridinium Chloride and Benzydamine Hydrochloride Has Direct Virucidal Effect on SARS-CoV-2 / A. Steyer, M. Marušić, M. Kolenc, T. Triglav // *COVID*. – 2021. – Vol. 1, № 2. – P. 435-446.
146. Tadakamadla, S.K. Clinical efficacy of a new cetylpyridinium chloride-hyaluronic acid-based mouthrinse compared to chlorhexidine and placebo mouthrinses-A 21-day randomized clinical trial / S.K. Tadakamadla, V.V. Bharathwaj, P. Duraiswamy [et al.] // *International journal of dental hygiene*. – 2020. – Vol. 18, №

1. – P. 116-123.

147. Taylor, R.B. Capillary electrophoresis and liquid chromatography in the analysis of some quaternary ammonium salts used in lozenges as antibacterial agents / R.B. Taylor, S. Toasaksiri, R.G. Reid // *Journal of capillary electrophoresis*. – 1998. – Vol. 5, № 1-2. – P. 45-50.

148. Teng, F. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation / F. Teng, T. He, S. Huang [et al.] // *International journal of oral science*. – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 182-190.

149. Vergara-Buenaventura, A. Use of mouthwashes against COVID-19 in dentistry / A. Vergara-Buenaventura, C. Castro-Ruiz // *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. – 2020. – Vol. 58, № 8. – P. 924-927.

150. Verma, T. Evaluation of antimicrobial property of modified acrylic resin-containing cetylpyridinium chloride / T. Verma, P. Sharma, P. Kumar [et al.] // *Journal of orthodontic science*. – 2020. – Vol. 9, issue 1. – P. 1.

151. Wang, J. Determination of cetylpyridinium chloride and tetracaine hydrochloride in buccal tablets by RP-HPLC / J. Wang, J. Lu, L. Zhang, Y. Hu // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2003. – Vol. 32, № 2. – P. 381-386.

152. Watanabe, E. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against *Staphylococcus aureus*: an in vitro study / E. Watanabe, J.M. Tanomaru, A.P. Nascimento [et al.] // *Journal of applied oral science : revista FOB*. – 2008. – Vol. 16, № 4. – P. 275-279.

153. Zarei, A.R. Selective cloud point extraction for the spectrophotometric determination of cetylpyridinium chloride in pharmaceutical formulations / A.R. Zarei, H.B. Sadeghi, S. Abedin // *Iranian journal of pharmaceutical research*. – 2013. – Vol. 12, № 4. – P. 671-677.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Патент РФ на изобретение № 2617238

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2617238

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
С КИСЛОТОЙ ЯНТАРНОЙ И ЦЕТИЛПИРИДИНИЙ
ХЛОРИДОМ МЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2016112080

Приоритет изобретения 30 марта 2016 г.

Дата государственной регистрации в
Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 24 апреля 2017 г.

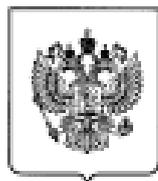
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 30 марта 2036 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 617 238**⁽¹³⁾ **C1**(51) МПК
A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/794 (2006.01)
A61K 33/70 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 9/40 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016112080, 30.03.2016

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
30.03.2016Дата регистрации:
24.04.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.03.2016

(45) Опубликовано: 24.04.2017 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, ГБОУ
ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Ножкина Наталья Николаевна (RU),
Самойли Елена Владимировна (RU),
Свищев Алгол Иванович (RU),
Фильмонова Ольга Ивановна (RU),
Шинкова Юлия Сергеевна (RU),
Белосорова Евгения Олеговна (RU)

(73) Патентообладатель(ы):

Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Южно-Уральский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России)
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2009014905 A1, 29.01.2009; US
20120301852 A1, 29.11.2012; US 20130082146
A1, 28.02.2013; EA 21695 B1, 31.08.2015; RU
2179454 C2, 20.02.2002.(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С КИСЛОТОЙ ЯНТАРНОЙ И
ЦЕТИЛПИРИДИНИЙ ХЛОРИДОМ МЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и стоматологии и представляет собой способ получения лекарственного средства местного действия для лечения заболеваний пародонта, включающего янтарную кислоту, цетилпиридиния хлорид, желатин, глицерин, 1% раствор NaHCO_3 и воду, где компоненты средства находятся в определенном соотношении на 1 пленку, а г, заключающийся в предварительном замачивании желатина в воде, который оставляют на 3 часа для набухания, а затем нагревают на водяной бане при температуре 60°C до полного растворения, при этом, кислоту янтарную растворяют в 1% растворе NaHCO_3 и слегка нагревают для полного удаления пузырьков газа,

далее постепенно добавляют при перемешивании к полученной массе цетилпиридиния хлорид и глицерин, после чего при непрерывном перемешивании полученный раствор добавляют в охлажденный раствор желатина, массу перемешивают и оставляют на 1 час при комнатной температуре для удаления воздуха, затем в обработанную 96% этиловым спиртом форму заливают полученную массу, равномерно распределяют и оставляют на 72 часа при комнатной температуре для высушивания, в результате чего получают эластичную пленку. Изобретение обеспечивает расширение арсенала лекарственных средств пролонгированного действия. 1 ил., 1 табл., 7 пр.

RU 2 617 238 C1

RU 2 617 238 C1

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

**Проект фармакопейной статьи на лекарственный препарат
«Лекарственная плёнка, содержащая янтарную кислоту и цетилпиридиния
хлорид»**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Лекарственная плёнка на десну,
содержащая янтарную кислоту
и цетилпиридиния хлорид**

ФС

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида (ЦПХ), лекарственная плёнка.

Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Пленки» и нижеприведенным требованиям.

Содержит не менее 90,0% и не более 110,0% от заявленного количества янтарной кислоты и не менее 85,0% и не более 115,0% от заявленного количества ЦПХ.

Описание. Однородные, бесцветные, прозрачные пластины прямоугольной формы.

Подлинность.

1. ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Пластика. ТСХ пластинка со слоем силикагеля силанизированного.

Подвижная фаза (ПФ). Этилацетат: этиловый спирт: раствор аммиака концентрированный (80:20:20).

Испытуемый раствор. Навеску измельченной пленочной массы, эквивалентную 2,5 мг янтарной кислоты и 1 мг ЦПХ, встряхивают с 1 мл этилового спирта 10 минут, фильтруют. Предварительно лекарственную пленку выдерживают в камере, насыщенной парами хлористоводородной кислоты, в течение 5 минут.

Раствор янтарной кислоты. 25 мг (точная навеска) стандартного образца янтарной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл этилового спирта, доводят до метки тем же растворителем, перемешивают.

Раствор ЦПХ. 25 мг (точная навеска) стандартного образца ЦПХ помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл этилового спирта, доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.

На линию старта пластинки наносят по 2 мкл испытуемого раствора и соответствующего раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ проходит около 80-90% от линии старта длины пластинки, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителя, затем опрыскивают 0,1% спиртовым раствором бромфенолового синего.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности окраски и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме соответствующего раствора сравнения.

2. ВЭЖХ. В соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», в

условиях проведения испытания «Количественное определение».

Время удерживания пика янтарной кислоты и ЦПХ на хроматограмме испытуемого раствора должно совпадать со временем удерживания пика на хроматограмме раствора стандартного образца янтарной кислоты и ЦПХ, соответственно.

рН. От 6,8 до 7,2 («Ионометрия», метод 3).

Однородность массы. В соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Потеря в массе при высушивании. Не более 5%, в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Растворение.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворение для твердых лекарственных форм» методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») в условиях проведения испытания «Количественное определение».

Условия испытания:

Аппарат: «Проточная ячейка»;

Среда растворения: 0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2;

Объем среды растворения: 25 мл;

Температура: $37 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$;

Скорость потока: 16 мл/мин;

Время растворения: 45 минут.

Испытуемый раствор. Каждую лекарственную пленку помещают в ячейку прибора, с предварительно нагретой средой растворения. Через 45 минут отбирают пробу раствора и фильтруют, отбрасывая первые порции фильтрата.

Для каждой испытуемой единицы лекарственной пленки за 45 минут должно высвободиться не менее $75(Q) + 5\%$ от заявленного содержания янтарной кислоты и ЦПХ.

Однородность дозирования.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность дозирования», способ 1, в условиях проведения испытания «Количественное определение».

Количественное определение.

Проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза. 0,1% раствор фосфорной кислоты – ацетонитрил в соотношении 98:2.

Испытуемый раствор. Около 100 мг (точная навеска) измельченной пленочной массы помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл подвижной фазы, нагревают на водяной бане ($40-50^{\circ} \text{C}$) до полного растворения, охлаждают. Доводят объем до метки тем же растворителем, перемешивают, фильтруют.

Раствор стандартного образца янтарной кислоты. Около 80 мг (точная навеска) стандартного образца янтарной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 15 мл подвижной фазы. Доводят объем до метки тем же растворителем, перемешивают (раствор А).

Раствор стандартного образца ЦПХ. Около 65 мг (точная навеска) стандартного образца ЦПХ помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 15 мл подвижной фазы. Доводят объем до метки тем же растворителем, перемешивают (раствор Б).

Раствор стандартного образца янтарной кислоты и ЦПХ. 2,0 мл раствора А и 1,0 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 25 и доводят объем до метки растворителем.

Хроматографические условия:

Колонка – Luna C18(2) 100A (4,6 × 250 mm, 5 μm);

Температура колонки – 30 °С; Скорость потока – 1 мл/мин;

Режим хроматографирования – градиентный, в течение 8 минут с использованием подвижной фазы с минимальной долей ацетонитрила (2%), затем увеличивают долю ацетонитрила с 2 до 85% за 10 минут;

Детектор – спектофотометрический, аналитическая длина волны 210 нм;

Объем пробы – 10 мкл;

Время хроматографирования – 18 мин;

Пригодность хроматографической системы

- относительные стандартные отклонения площади пика янтарной кислоты и ЦПХ не более 5,0 % (6 определений);

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику и янтарной кислоты и ЦПХ, не менее 2000 теоретических тарелок (6 определений);

- фактор асимметрии пика и янтарной кислоты и ЦПХ не более 1,5.

Количественное содержание янтарной кислоты в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 25 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot L}$$

где, S – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора ЛПл;

S₀ – площадь пика янтарной кислоты на хроматограмме стандартного образца;

a₀ – навеска стандартного образца янтарной кислоты, в миллиграммах;

a – навеска пленочной массы, в миллиграммах;

P – средняя масса ЛПл, в миллиграммах;

L – заявленное содержание ЦПХ в одной ЛПл, в миллиграммах;

G – содержание янтарной кислоты в стандартном образце, в %.

Количественное содержание ЦПХ в одной ЛПл в процентах от заявленного количества (X, %) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a \cdot L}$$

где, S – площадь пика ЦПХ на хроматограмме испытуемого раствора ЛПл;

S₀ – площадь пика ЦПХ на хроматограмме стандартного образца;

a₀ – навеска стандартного образца ЦПХ, в миллиграммах;

a – навеска пленочной массы, в миллиграммах;

P – средняя масса ЛПл, в миллиграммах;

L – заявленное содержание ЦПХ в одной ЛПл, в миллиграммах;

G – содержание ЦПХ в стандартном образце, в %.

Микробиологическая чистота.

В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота», категория 2.

Упаковка, маркировка и транспортирование.

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».

Акты внедрений и протоколы исследований



МИНЗДРАВ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Южно-Уральский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной, инновационной
и международной работе

Л.Ф.Телешева

ПРОТОКОЛ

исследования антимикробной активности образцов лекарственной пленки,
содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид

Челябинск, 2019



МИНЗДРАВ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Южно-Уральский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной, инновационной
и международной работе



Л.Ф. Телешева

ПРОТОКОЛ

исследования антиокислительной активности образцов лекарственной
пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид

Челябинск, 2019



МИНЗДРАВ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Южно-Уральский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России)



Проректор по научной, инновационной
и международной работе

Д.Ф. Телешева

ПРОТОКОЛ

**исследования микробой обсемененности образцов лекарственной пленки,
содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид**

Челябинск, 2019

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО ОрГМУ

Минздрава России

д.м.н., проф.

Мирошников И.В.

« 01 » 19/05/2023 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Ножкиной Натальи Николаевны на тему: «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетиловый спирт» по специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» в учебную работу кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Комиссия в составе: д.б.н., доцента И.В. Михайловой, ст.преподавателя Н.А. Кузьмичевой, ассистента А.И. Бондаренко подтверждает использование результатов, полученных Ножкиной Натальей Николаевной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетиловый спирт», в курсе обучения студентов фармацевтического факультета на кафедре фармацевтической химии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России.

Заведующий кафедрой фармацевтической химии, д.б.н., доцент

И.В. Михайлова

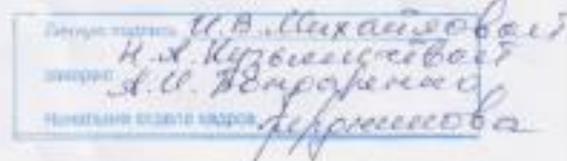
Старший преподаватель

Н.А. Кузьмичева

Ассистент

А.И. Бондаренко

460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ПО
ЭКСПЕРТИЗЕ, УЧЁТУ И АНАЛИЗУ ОБРАЩЕНИЯ СРЕДСТВ
МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» РОСЗДРАВНАДЗОРА
(КУРСКИЙ ФИЛИАЛ)**



АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1

Авторы внедрения: Н.Н. Ножкина, старший преподаватель кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России; О.Н. Дворская, д. фарм. н., доцент, заведующий кафедрой Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования Н.Н. Ножкиной «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид».

Объект внедрения: методика на основе обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектированием для совместного определения сильно различающихся по полярности действующих компонентов: янтарной кислоты и цетилпиридиния хлорида в лекарственных пленках, содержащих янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид.

Апробировано: с 01 сентября 2022 года в работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Информационно-методический центр по экспертизе, учёту и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (Курский филиал)».

Заключение: использование предложения позволяет достоверно обнаруживать сильно различающихся по полярности действующие компоненты лекарственной пленки: янтарную кислоту и цетилпиридиния хлорид, что будет способствовать повышению обеспечения контроля качества лекарственных форм.

Руководитель испытательной лаборатории
ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора
(Курский филиал), к.ф.н.

М.Л. Столяров

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор филиала



ООО «НПФ» «Материя медика Холдинг»

А. В. Смирнов

20 03 2022

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Авторы внедрения: Ножкина Н. Н., старший преподаватель кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России;

Дворская О.Н., д. фарм. н., доцент, заведующий кафедрой Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования Н.Н. Ножкиной «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.– Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Объект внедрения: методика на основе обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектированием для совместного определения сильно различающихся по полярности действующих компонентов: янтарной кислоты и цетилапиридиния хлорида в пленках лекарственных комплексного действия.

Использовано: с 01.09.2022 г. в работе контрольно-аналитической лаборатории филиала ООО «НПФ» «Материя медика Холдинг», 454139, г. Челябинск, ул. Бугурусланская, 54.

Заключение: применение данной методики позволяет достоверно обнаруживать сильно различающиеся по полярности действующие компоненты лекарственной пленки: янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид, что будет способствовать повышению обеспечения контроля качества лекарственных форм.

Методика и ее валидационная оценка опубликованы в журнале «Медицина», включенный в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук за № 1298. (Совместное определение янтарной кислоты и цетилапиридиния хлорида в пленках лекарственных методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии/ О. Н. Дворская, Н. Н. Ножкина // Медицина. – 2021. – Т. 9. – № 2. – С. 75-88).

Начальник отдела обеспечения качества
ООО «НПФ» «Материя медика Холдинг»

О.Н. Веремenco

454139, г. Челябинск, ул. Бугурусланская, 54.



МИНЗДРАВ РОССИИ
 Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования «Южно-Уральский
 государственный медицинский университет»
 Министерства здравоохранения
 Российской Федерации
 (ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной,
 инновационной и международной
 работе



Л.Ф. Телешина
 Л.Ф. Телешина
 «02» февраля 2023 г.

АКТ
 О внедрении в учебный процесс
 результатов диссертационной работы

Ножкиной Наталии Николаевны по теме «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид» в практику кафедры Фармация и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя, проректора по образовательной деятельности, доктора медицинских наук, доцента Абрамовских О.С., заведующего кафедрой Фармация и химии фармацевтического факультета доктора фармацевтических наук, доцента Дворской О.Н., заведующего учебной работой кафедры Фармация и химии фармацевтического факультета, кандидата фармацевтических наук Ушаковой В.А., удостоверяем, что результаты диссертационной работы Ножкиной Н.Н. «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид» внедрены в учебный процесс кафедры Фармация и химии фармацевтического факультета: в курс лекций (темы «Контрольно-разрешительная система РФ. Система GMP, валидация аналитических методик анализа лекарственных средств», «Использование химических и физико-химических методов для идентификации и оценки степени чистоты лекарственных средств») и курс практических занятий (тема «Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств») дисциплины «Фармацевтическая химия» для обучающихся по основной профессиональной образовательной программе высшего образования – программе специалитета (33.05.01 Фармация) с 01.02.2023 (Протокол № 05 от 31.01.2023).

В процессе выполнения диссертации «Разработка методик контроля качества лекарственной пленки, содержащей янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид» определены оптимальные условия хроматографического разделения янтарной кислоты и цетилапиридиния хлорида при совместном присутствии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработана и валидирована методика совместного определения янтарной кислоты и цетилапиридиния хлорида в лекарственной пленке, содержащей янтарную кислоту и цетилапиридиния хлорид, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиентном режиме. Разработана методика совместного определения янтарной кислоты и цетилапиридиния хлорида в лекарственных пленках методом тонкослойной хроматографии.

Проректор по образовательной деятельности,
доктор медицинских наук, доцент

О.С. Абрамовских

Заведующий кафедрой
Фармации и химии фармацевтического
факультета, доктор фармацевтических наук, доцент

О.Н. Дворская

Заведующий учебной работой кафедры
Фармации и химии фармацевтического
факультета, кандидат фармацевтических наук

В.А. Ушакова