

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕДЕНЦОВ «ДЕНТОС» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

Варина Н.Р.<sup>1</sup>, Куркин В.А.<sup>1</sup>, Авдеева Е.В.<sup>1</sup>, Климова Л.Д.<sup>1</sup>, Щербовских А.Е.<sup>1</sup>, Лапина А.С.<sup>1</sup>, Филиппова Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия (443099, Самара, ул. Чапаевская, 89), e-mail: kurkinvladimir@yandex.ru, shagalieva.nr@mail.ru

На основе разработанного ранее лекарственного препарата «Дентос» (сложная настойка на основе пяти видов лекарственного растительного сырья с добавлением эвгенола) для лечения и профилактики заболеваний пародонта разработана лекарственная форма – леденцы «Дентос» для более широкого использования по поводу инфекционно-воспалительных заболеваний ротовой полости, в частности, для ЛОР-практики. На основании проведенных технологических и фитохимических исследований были обоснованы состав и подходы к стандартизации леденцов, предложен вариант пробоподготовки лекарственного препарата и разработаны методики качественного и количественного анализа. Качественный анализ включает в себя оценку характера УФ-спектра и служит как для подтверждения подлинности, так и для количественного определения действующих веществ. Для леденцов, как и для самого «Дентоса», характерно наличие максимума при 278 нм ± 3 нм (фенолальдегиды терпеноидов и флавоноиды) и «плеча» (перегиба) при 327 нм ± 3 нм (фенилпропаноиды). Количественное определение предложено проводить по двум группам биологически активных соединений (БАС) – фенилпропаноидам и фенолальдегидам терпеноидов. Определение суммы фенилпропаноидов в пересчете на кофейную кислоту в ЛП леденцы «Дентос» осуществляется методом прямой спектрофотометрии спирто-водных извлечений при аналитической длине волны 327 нм. В качестве нижнего предела содержания суммы фенилпропаноидов в леденцах «Дентос» рекомендовано значение: не менее 0,1%. Количественное определение фенолальдегидов терпеноидов в пересчете на эвкалимин в леденцах «Дентос» предложено проводить методом прямой спектрофотометрии раствора гексанового извлечения после предварительной пробоподготовки ЛП. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 278 нм. В качестве нижнего предела содержание суммы фенолальдегидов терпеноидов рекомендовано значение: не менее 0,05%.

Ключевые слова: лекарственный препарат «Дентос», инфекционно-воспалительные заболевания ротовой полости, лекарственная форма леденцы, фенилпропаноиды, фенолальдегиды терпеноидов, стандартизация, спектрофотометрия.

## STANDARTIZATION OF THE DENTOS SUGAR CANDIES FOR TREATMENT AND PREVENTION OF INFECTIONES AND INFLAMMATORY DISEASES OF A PARODONT

Varina N.R.<sup>1</sup>, Kurkin V.A.<sup>1</sup>, Avdeeva E.V.<sup>1</sup>, Klimova L.D.<sup>1</sup>, Shcherbovskih A.E.<sup>1</sup>, Lapina A.S.<sup>1</sup>, Philippova E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara State Medical University, Samara, Russia (443079, Samara, Ul. Chapayevskaya, 89), e-mail: kurkinvladimir@yandex.ru, shagalieva.nr@mail.ru

There was developed the dosage form – the «Dentos sugar candies» on the basis of the medicine «Dentos», which was created earlier (complex tincture on the basis of five types of medicinal plants with addition of an eugenol) which is proposed for treatment and prevention of infectiones and inflammatory diseases of a parodont in particular, for otorhinolaryngological practice. On the basis of the conducted technological and phytochemical researches the composition and approaches to standardization of sugar candies were proved. There were offered the preparation of the medicine and methodics of the qualitative and quantitative analysis. The qualitative analysis includes an assessment of character of the UV-spectrum and serves both for authenticity confirmation, and for quantitative determination of active ingredients. For sugar candies, as well as for «Dentos», is characteristic existence of a maximum at 278 ± 3 nm (phenolaldehydes of terpenoids and flavonoids) and «shoulder» (excess) at 327 ± 3 nm (phenylpropanoids). It is offered to carry out quantitative determination on two groups of the biologically active compounds (BAC) – to phenylpropanoids and phenolaldehydes of terpenoids. Determination of the total phenylpropanoids calculated on caffeic acid in the remedie «Dentos sugar candies» is carried out by method of a direct spectrophotometry of water-alcoholic extraction at the analytical

wavelength of 327 nm. As the lower value of the containing of the total of phenylpropanoids in the «Dentos sugar candies» is recommended: not less than 0,1%. In the «Dentos sugar candies» it is offered to carry out quantitative determination of phenolaldehydes of terpenoids calculated on eucalimin by method of a direct spectrophotometry of solution of hexan extraction after preliminary sample preparation of medicine. Measurement of optical density is taken at the wavelength of 278 nm. As the lower value of the containing of the total phenolaldehydes of terpenoids is recommended value: not less than 0,05%.

Keywords: Dentos medicine, infectious and inflammatory diseases of a mouth, dosage form of sugar candies, phenylpropanoids, phenolaldehydes of terpenoids, standartization, spectrophotometry.

На базе Самарского государственного медицинского университета творческим коллективом кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии совместно с кафедрой челюстно-лицевой хирургии и стоматологии (проф. И.Б. Байриков) и общей и клинической микробиологии, аллергологии и иммунологии (проф. А.В. Жестков и доц. С.Д. Колпакова) был разработан оригинальный состав лекарственного препарата «Дентос» (патент РФ на изобретение № 2428171 от 10.09.2011). Предложены пролонгированные лекарственные формы на основе фититокомпозиции «Дентос» – стоматологический гель, стоматологическая нить и паста на основе водного дентина [5-7]. В настоящее время с целью расширения использования данной прописи (которая по наблюдениям стоматологов обладает выраженным общим saniрующим действием на всю ротовую полость) разработан состав новой лекарственной формы – леденцов «Дентос» на основе сахара и мальтозной патоки для применения, в частности, в ЛОР-практике.

Леденцы (синоним: карамель – caramel) относятся к твердым дозированным лекарственным формам с высоким содержанием инвертированного сахара, предназначенным для применения (рассасывания) в ротовой полости при лечении некоторых заболеваний полости рта, горла или пищеварительного тракта. В форме карамели применяются преимущественно антисептические (в т. ч. растительного происхождения), противомикробные, противогрибковые средства. Леденцы наиболее часто используют для лечения воспалительных заболеваний горла в качестве лекарственного средства анестезирующего или антибактериального спектра действия, в то же время они перспективны для лечения стоматологических заболеваний, так как способны обеспечивать длительное местное воздействие на всю ротовую полость [1, 2, 4].

Данные обстоятельства и определили ход наших дальнейших исследований: выбор был сделан в пользу разработки лекарственного препарата – леденцы «Дентос» для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний ротовой полости. Для изучаемого лекарственного препарата необходимо было решить вопросы стандартизации с учетом современных требований гармонизации и унификации методик качественного и количественного определения в ряду «лекарственное растительное сырье (ЛРС) – лекарственный препарат (ЛП) – лекарственная форма (ЛФ)» [3, 5].

**Целью исследований** являлось обоснование подходов к стандартизации и разработка методик качественного и количественного анализа леденцов «Дентос».

### **Материалы и методы**

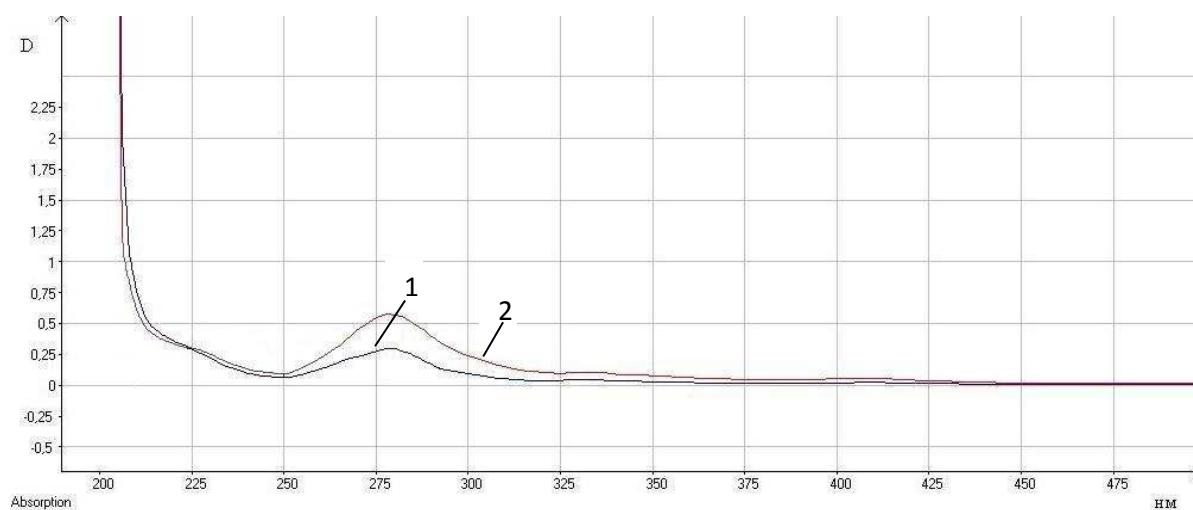
В качестве объектов исследования выступали исходный фитопрепарат «Дентос», представляющий собой по технологическому способу получения сложную настойку (спиртовое извлечение на основе 70 % этанола из нескольких видов ЛРС: листьев эвкалипта (*Eucalyptus viminalis* Labill.), травы эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.), цветков календулы (*Calendula officinalis* L.), коры дуба (*Quercus robur* L.), масла гвоздичного дерева (*Caryophyllus aromaticus* L.); леденцы «Дентос» с 10%-ым содержанием ЛП «Дентос» в форме ложной настойки и их карамельная основа, представляющая собой затвердевшую массу на основе сахара, мальтозной патоки и воды очищенной без добавления ЛП «Дентос». Основными методами исследования являлись тонкослойная хроматография и спектрофотометрия. УФ-спектры регистрировались с помощью спектрофотометра «Specord 40» (фирма «Analytik Jena»). Для контроля присутствия нативной гаммы биологически активных соединений (БАС) и отсутствия появления артефактов (в ходе технологического процесса получения леденцов вследствие термической деструкции) или неполного извлечения анализируемых веществ после проведения пробоподготовки ЛФ использовался метод ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе хлороформ-метанол-вода (26:14:3) с последующей обработкой свежеприготовленным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК) и фосфорно-молибденовой кислоты (ФМК). Для исследований по подбору растворителя для проведения пробоподготовки использовались гексан, ацетон, 70% и 95% спирт этиловый.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Стандартизация многокомпонентных лекарственных препаратов является традиционно сложной задачей. Фитопрепарат «Дентос», являясь сложной фитокомпозицией, сочетает в себе различные группы БАС: фенилпропаноиды, флавоноиды, дубильные вещества, каротиноиды, терпеноидный комплекс и другие компоненты, относящиеся к различным химическим классам веществ, и, соответственно, обладающие различными физико-химическими характеристиками, что затрудняет анализ. И, если в случае анализа ЛП «Дентос» нами предлагался комплексный многоуровневый подход к решению вопросов стандартизации (определение четырех групп БАС), то в случае ЛФ на основе «Дентос» было решено остановиться на определении двух основных групп БАС, обеспечивающих антимикробную и противовоспалительную активность, – фенилпропаноидах и фенолальдегидах терпеноидов.

Прежде всего, необходимо было решить вопрос пробоподготовки твердой ЛФ. Для этого навеску измельченных леденцов сначала растворяли в двукратном объеме 70% спирта этилового, в котором она легко растворилась без применения термического воздействия (предварительные исследования по использованию часто используемого для подобных целей ацетона показали, что истинного раствора получить не удастся, аналогичной была ситуация и по использованию 95% спирта этилового).

В плане качественного анализа леденцов «Дентос» нами предлагается оценка характера УФ-спектра, который для анализируемых групп БАС является характерным. Причем этот метод предлагается как для подтверждения подлинности ЛП, так и для количественного определения (рис. 1). На УФ-спектре раствора исследуемого ЛП, приготовленного для количественного определения фенолпропаноидов (по методике – раствор Б), обнаруживается максимум поглощения при  $278 \text{ нм} \pm 3 \text{ нм}$  и «плечо» при  $327 \text{ нм} \pm 3 \text{ нм}$ , которые связаны в коротковолновой области (278 нм) с вкладом в абсорбцию комплекса фенолальдегидов эвкалипта, флавоноидов календулы, эхинацеи и эвкалипта, дубильных веществ дуба и эвкалипта; «плечо» при 327 нм обусловлено содержанием фенолпропаноидов – гидроксикоричных кислот эхинацеи и календулы.



*Рис. 1. Электронный спектр растворов на 70% спирте этиловом (1:500)*

*Обозначения: 1 - из ЛП «Леденцы «Дентос»; 2 - из ЛП «Дентос» (сложная настойка)*

Таким образом, характер электронного спектра в анализируемой области 200 – 380 нм обусловлен присутствием указанных групп действующих веществ препарата.

Для подтверждения соответствия состава БАС ЛП «Дентос» в форме леденцов исходному составу «Дентос» в форме сложной настойки проведено сравнительное исследование образцов обоих ЛП методом ТСХ-анализа. Обработка реактивами ДСК (фенольные соединения) и ФМК (терпеноидный комплекс) показала соответствие леденцов нативному комплексу БАС.

В случае количественного определения фенилпропаноидов в пересчете на кофейную кислоту методом прямой спектрофотометрии (как и было предусмотрено для ЛП «Дентос» в форме сложной настойки) раствор леденцов для спектрофотометрического определения (по методике – раствор Б) получали путем разведения 1:500 в 70% спирте этиловом. При этом раствором сравнения служил 70% спирт этиловый. Определение проводили при 327 нм ± 3 нм в пересчете на кофейную кислоту (удельный показатель  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 700$ ).

*Методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в пересчете на кофейную кислоту в ЛП леденцы «Дентос».* Около 5,0 г измельченных леденцов «Дентос» (точная навеска) растворяют в 10 мл 70% спирта этилового, количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят 70% этанолом до метки (раствор А), содержимое колбы тщательно перемешивают. Затем 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят 70% спиртом этиловым до метки и перемешивают (раствор Б). В качестве раствора сравнения используют 70% спирт этиловый. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 327 нм.

Расчетная формула имеет следующий вид:

$$X = \frac{D \cdot V_k}{A_{1\text{лн}}^{1\%} \cdot V_i} = \frac{D \cdot 25 \cdot 50}{E_{1\text{лн}}^{1\%} \cdot 5 \cdot 5} = \frac{D \cdot 50}{E_{1\text{лн}}^{1\%}}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

V<sub>к</sub> – объем колбы;

V<sub>п</sub> – объем препарата;

$A_{1\text{лн}}^{1\%}$  – удельный показатель светопоглощения кофейной кислоты при  $\lambda=327$  нм (700).

Значения анализируемого показателя колебались в пределах от 0,11% до 0,17%, среднее значение содержания суммы фенилпропаноидов составило  $0,14 \pm 3,21\%$  (на 11 анализируемых образцах). На основании проведенных экспериментов предложен нижний предел содержания суммы фенилпропаноидов в ЛП леденцы «Дентос»: не менее 0,1%.

Для определения фенолальдегидов терпеноидов в леденцах «Дентос» после предварительной пробоподготовки ЛП (растворении в двукратно превышающем объеме 70% спирте этиловом) поступали аналогичным для исходного ЛП «Дентос» (в форме сложной настойки) образом: получали гексановые извлечения из растворенной в 70% этаноле навески леденцов путем многократной обработки гексаном, в который переходит анализируемая группа, и проводили разведение тем же растворителем (1:125) для последующего прямого спектрофотометрического определения фенолальдегидов терпеноидов в пересчете на эвкалимин (с использованием его удельного показателя поглощения при аналитической длине волны 278 нм).

Методика количественного определения суммы фенолальдегидов терпеноидов в пересчете на эвкалимин в ЛП леденцы «Дентос». Около 5,0 г измельченных леденцов «Дентос» (точная навеска) растворяют в 10 мл 70% спирта этилового, количественно переносят в делительную воронку и последовательно производят экстракцию пятью порциями гексана объемом по 5 мл каждая. Полученные гексановые извлечения объединяют в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят гексаном до метки, тщательно перемешивают (раствор А). Затем отбирают 10 мл раствора, помещают в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят гексаном до метки и перемешивают.

В качестве раствора сравнения используют гексан. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 278 нм.

Расчетная формула имеет следующий вид:

$$X = \frac{D \cdot V_e}{\overset{\circ}{A}_{1\%}^{1\text{cm}} \cdot V_i} = \frac{D \cdot 25 \cdot 25}{\overset{\circ}{A}_{1\%}^{1\text{cm}} \cdot 5 \cdot 10} = \frac{Dx \cdot 12,5}{\overset{\circ}{A}_{1\%}^{1\text{cm}}}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

V<sub>к</sub> – объем колбы;

V<sub>п</sub> – объем препарата;

$\overset{\circ}{A}_{1\%}^{1\text{cm}}$  – удельный показатель светопоглощения эвкалимина при  $\lambda=278$  нм (417).

На рисунке 2 представлены спектры гексановых извлечений ЛП леденцы «Дентос» и ЛП «Дентос» (в форме сложной настойки).

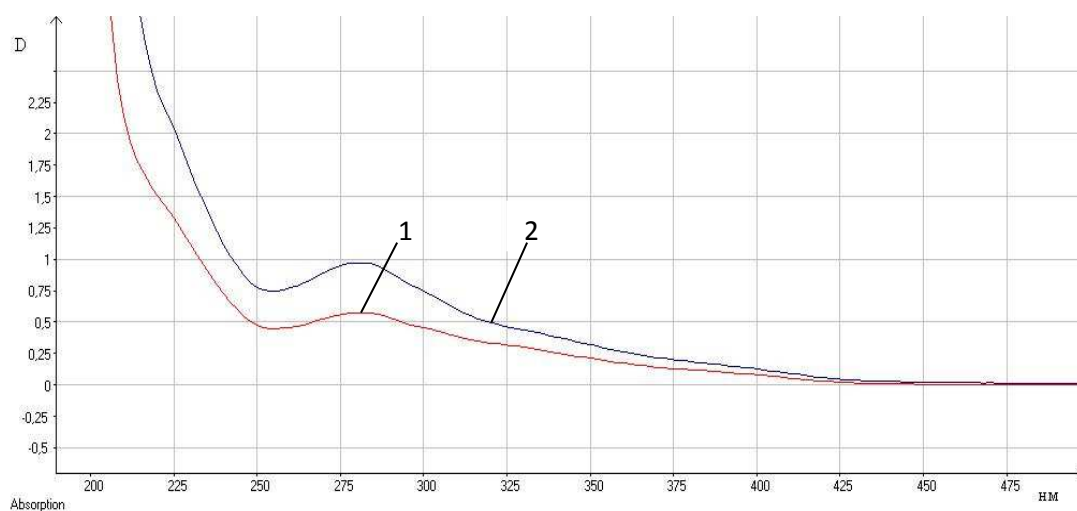


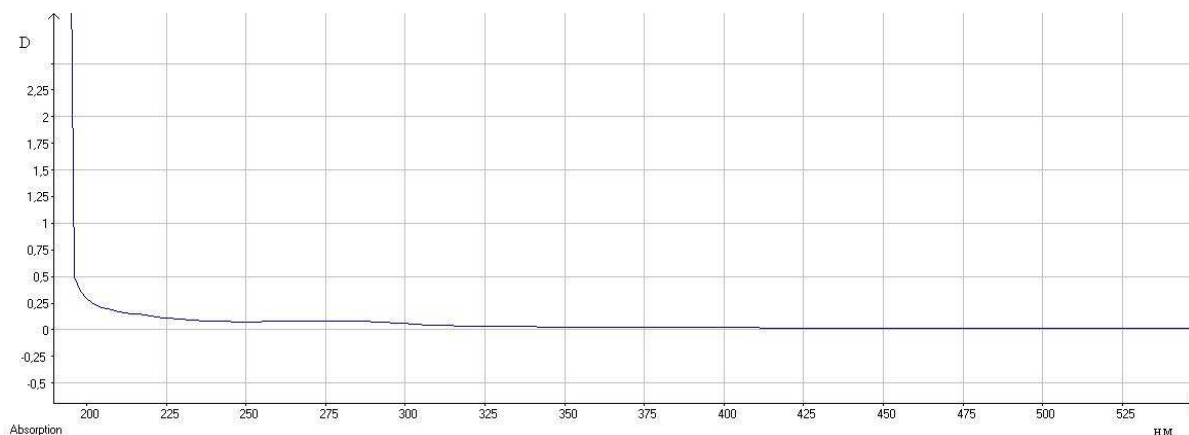
Рис. 2. Электронный спектр гексановых извлечений из растворов препаратов на 70% спирте этиловом (разведение 1:125)

Обозначения: 1 – из ЛП «Леденцы «Дентос»; 2 – из ЛП «Дентос» (сложная настойка)

Значения анализируемого показателя – суммы фенолальдегидов терпеноидов для ЛП леденцы «Дентос» колебались в диапазоне от 0,053% до 0,061%; среднее содержание суммы фенолальдегидов терпеноидов по результатам анализа 11 образцов составило  $0,058 \pm 4,54\%$ .

Проведенные эксперименты позволили рекомендовать в качестве нижнего предела содержания анализируемой группы БАС: не менее 0,05%.

Что касается вклада основы в значение оптической плотности ЛФ, то, как видно из рис. 3, он минимален, поэтому им можно пренебречь в расчетах анализируемых групп БАС.



*Рис. 3. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из карамельной основы для ЛП леденцы «Дентос»*

Следует отметить, что минимальная терапевтическая доза фенолальдегидов терпеноидов, оказывающая бактериостатическое действие, рассчитанная ранее для ЛП «Дентос» (сложная настойка), составила 500 мкг. Принимая во внимание, что в ЛП леденцы «Дентос» в качестве нижнего предела содержания заявлено значение 0,05%, а средняя масса 1 леденца составляет 1,25 г, то в 1 леденце содержится 625 мкг, т.е. немного больше требуемой минимальной концентрации. Отсюда следует наша предварительная рекомендация по режиму приема леденцов: рассасывать по 1 леденцу 3-4 раза в день, после каждого приема пищи.

#### **Выводы:**

1. Разработанные ранее для ЛП «Дентос» (в форме сложной настойки) подходы к стандартизации с учетом современных требований гармонизации и унификации аналитических методик адаптированы к ЛП леденцы «Дентос».
2. В качестве основного метода качественного определения содержания двух основных групп БАС, отвечающих за антимикробный и противовоспалительный эффекты, - фенолпропаноидов и фенолальдегидов терпеноидов – выбрана спектрофотометрия (оценка характера УФ-спектра). При этом обнаруживается максимум поглощения при  $278 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  (фенолальдегиды терпеноидов) и «плечо» при  $327 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  (фенилпропаноиды).
3. Количественное определение фенолпропаноидов в пересчете на кофейную кислоту в ЛП леденцы «Дентос» осуществляется методом прямой спектрофотометрии спирто-водных извлечений (70% этанол) при 327 нм. В качестве нижнего предела содержание суммы фенолпропаноидов в ЛП леденцы «Дентос» рекомендовано значение: не менее 0,1%.

4. Количественное определение фенолальдегидов терпеноидов в пересчете на эвкалимин в леденцах «Дентос» предложено проводить методом прямой спектрофотометрии раствора гексанового извлечения после предварительной пробоподготовки ЛФ. В качестве раствора сравнения используют гексан. Аналитическая длина волны 278 нм. В качестве нижнего предела содержания суммы фенолальдегидов терпеноидов в ЛП леденцы «Дентос» рекомендовано значение: не менее 0,05%.

### Список литературы

1. Аллен Лойд В. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов: Учебн. Пособие / Лойд В. Аллен, А.С. Гаврилов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 512 с.
2. Волошина А.А. Значение микробного фактора в развитии и течении воспалительных заболеваний пародонта / А.А. Волошина // Молодой ученый. — 2011. — №1. — С. 248-251.
3. Гончарова Е.И. Растительные средства в профилактике и лечении заболеваний пародонта / Е.И. Гончарова // Российский стоматологический журнал. – 2012. – №3. – С. 48-52.
4. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.
5. Куркин В.А. Фармакогнозия. Учебник для студентов фармацевтических ВУЗов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. – 1239 с.
6. Шагалиева Н.Р. Актуальные аспекты разработки и стандартизации стоматологического фитопрепарата «Дентос» / Н.Р. Шагалиева, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, И.М. Байриков, А.Е. Щербовских // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – С. 1490-1494.
7. Шагалиева Н.Р. Исследования по разработке и стандартизации комбинированного антимикробного и регенерирующего препарата на основе лекарственного растительного сырья: автореф. дис. ...канд. фармац. наук: 14.04.02 / Шагалиева Наталья Рашидовна. – Самара, 2012. – 24 с.

### Рецензенты:

Шаталаев И.Ф., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Правдивцева О.Е., д.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.