Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор
_____И.Л. ДАВЫДКИН
«____» _____2023 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДЕЙСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТА «МАРМЕЛАД НА СТЕВИИ»

(заключительный)

Соруководитель НИР,
директор НОЦ «Фармация» _____ Т.К. Рязанова

Соруководитель НИР,
зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д.фарм.н., профессор _____ В.А. Куркин

Самара
2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Соруководитель НИР,
директор НОЦ «Фармация» _____ Т.К. Рязанова
подпись, дата

Соруководитель НИР,
зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой
и основами фитотерапии, д.фарм.н., профессор_____ В.А. Куркин
подпись, дата

Главный специалист НОЦ «Фармация» _____И.В. Соколова
подпись, дата

Главный специалист НОЦ «Фармация» _____А.Р. Мубинов
подпись, дата

Главный специалист НОЦ «Фармация» _____Д.А. Жданов
подпись, дата

Специалист НОЦ «Фармация» _____О.А. Калашникова
подпись, дата

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ИК - инфракрасный

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

РЕФЕРАТ

Отчет 24 страницы

ХРОМАТОГРАФИЯ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, МАРМЕЛАД, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ, СТОМАТОЛОГИЯ

Цель работы исследования – провести качественный анализ компонентного состава, разработать методики количественного анализа кверцетина, натрия бензоата и хлорофилла.

Объекты исследований – жевательный мармелад «Фитодент».

Результаты. Предложены условия для оценки подлинности мармелада «Фитодент» методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В условиях ВЭЖХ-анализа обнаруживались кверцетин и натрия бензоат (времена удерживания 11,799 ± 0,017 мин и 10,045 ± 0,011 мин соответственно). При проведении тонкослойной хроматографии обнаруживались кверцетин (Rf ≈ 0,60) и натрия бензоат (Rf ≈ 0,50), их наличие подтверждено в присутствии соответствующих стандартных образцов. В условиях ГХ-МС анализа летучих органических соединения мармелада обнаружены мальтол и бензойная кислота (продукт превращения натрия бензоата). Мальтол является подтверждением наличия в продукте компонентов на основе хвои.

Разработаны и валидированы методики количественного определения кверцетина и натрия бензоата методом ВЭЖХ и хлорофилла методом спектрофотометрии. Продемонстрированы удовлетворительные метрологические характеристики методик (по показателям правильности, прецизионности, специфичности).

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения 4
Реферат....5
СОДЕРЖАНИЕ 6
Основная часть 7
Введение 7
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 10
1. Объекты исследования....10
2. Методы исследования....13
2.1. Методы пробоподготовки 13
2.2. Хроматографические методы....14
2.3. Спектральные методы 16
3. Статистическая обработка....16
4. Валидация методик 16
1.РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ....17
Качественный анализ....17
2.РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ....19
Разработка методик количественного определения кверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 19
Разработка методик количественного определения натрия бензоата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 22
Разработка методик количественного определения хлорофилла методом спектрофотометрии 23
Заключение....26
Список литературы 27

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ВВЕДЕНИЕ

Сырье растительного происхождения используется с давних времен в качестве источника биологически активных соединений (БАС) и находит применение в составе лекарственных препаратов, пищевых добавок, средств в косметологической промышленности. В стоматологии распространено применение фитотерапевтических средств, в частности для ухода за деснами, лечения пародонтита; поражения десен и слизистой полости и при ряде других заболеваний [7, 9, 11]. Применение БАС растительного происхождения в стоматологии обусловлено их положительным влиянием на кровоточивость десен, отечность мягких тканей, процессы воспаления, благоприятным воздействием на процессы регенерации, обезболивающим и рядом других эффектов [7, 9, 11].

Примерами недавних и успешных разработок в области стоматологии является линейка отечественных средств из растительного сырья для ухода за дёснами и слизистой полости рта «Fitodent». Основными действующими компонентами этих средств являются производные хлорофилла, флавоноиды, компоненты хвои и другие биологически активные вещества [3, 4].

В ходе ранее проведенных исследований продемонстрирована высокая эффективность применения геля с корой осины и флавоноидами у пациентов с пародонтитом лёгкой и средней степеней тяжести после проведения санации полости рта. Регулярное применение композиции в форме геля с экстрактами коры осины и медным комплексом хлорофилла обеспечивает эффективное воздействие на ткани пародонта при профилактике и лечении воспалительных заболеваний пародонта. Гель показал высокие противовоспалительные, кровоостанавливающие, очищающие, противогалитозные и антимикробные свойства. Кроме того, гелевая основа сама по себе обеспечивает пролонгированное воздействие активных компонентов на ткани [3, 4].

Имеется опыт применения геля с хлорофиллом и 0,12%-раствором хлоргексидина при хирургическом лечении рецессий десны, в том числе превентивно перед проведением ортодонтического лечения [5].

В отношении жевательного мармелада «Фитодент» продемонстрирована высокая противовирусная активность. Перечень БАС мармелада и их потенциальных вклад в биологическую активность продукта представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Потенциальный вклад компонентов в биологическую активность мармелада «Фитодент»

№ п/п	Наименование компонентов	Биологическая активность	Ссылки
	Стевия, подсластитель	Противодиабетическое, противокариозное, антиоксидантное, антигипертензивное, противомикробное, противовоспалительное и противоопухолевое действие	20
	Ксилит	Противокариозное, гипокликемическое, может оказывать слабительное действие	17
	Сорбитол	Противокариозное, гипокликемическое, может оказывать слабительное действие	17
	Сок пихты сибирской	Антиоксидантное, антимикробное, противовоспалительное действие	1, 13, 23
	Экстракт хвойный	Антиоксидантное, антимикробное, противовоспалительное действие	13, 23
	Паста хвойная	Противовоспалительное, бактерицидное действие	21, 23
	Кверцетин	Антиоксидантное, противовоспалительное, противовирусное, противоопухолевое, антиагрегантное, сосудоукрепляющее действие	10, 14, 15, 16, 18
	Имбирь	Антиоксидантное, противовоспалительное, противоопухолевое, нейропротективное, противогрибковое, противовирусное, противорвотное действие	19
	Хлорофиллин (шпинат)	Хемопревентивное, антиоксидантное, оказывает ингибирующее действие на гиалуронидазу, противоопухолевое, иммуномодулирующее действие	14, 22, 23
	Экстракт ламинарии	Антиоксидантное, антибактериальное, противовоспалительное, иммуномодулирующее, противоопухолевое, вирусоцидное действие	9

Входящие в состав мармелада соединения могут вносить вклад в антиоксидантную, противовоспалительную антимикробную активность продукта.

В состав гелей входит кверцетин, - один из наиболее известных представителей широкого класса природных флавоноидов, которые участвуют во многих процессах, протекающих в организме (оказывают выраженное антиоксидантное действие, снижают свертываемость кровь, оказывают противовоспалительное действие, уменьшают ломкость

капилляров, улучшают обменные процессы и др.) (рис. 1) [10]. Установлено, что кверцетин оказывает благотворное влияние на здоровье полости рта благодаря своим широким фармакологическим свойствам в качестве профилактического и лечебного средства при кариесе зубов с противовоспалительным эффектом, а также антиоксидантного и противоракового средства [14]. *In vivo* добавление кверцетина уменьшало экспрессию цитокинов, инфильтрацию воспалительных клеток и деструкцию альвеолярной костной ткани. Анализ микробиома выявил более здоровый микробный состав полости рта в группе, получавшей кверцетин, по сравнению с контрольной группой, который характеризовался уменьшением количества патогенных видов, включая *Enterococcus*, *Neisseria* и *Pseudomonas*, и увеличением количества непатогенных *Streptococcus* sp. и бактериального разнообразия. *In vitro* кверцетин уменьшал выработку воспалительных цитокинов за счет модуляции влияния убиквитин-редактирующего фермента A20 на сигнальный путь NF-κB в макрофагах человека после инфицирования полости рта микроорганизмами и после применения агонистов толл-подобных рецепторов. Следовательно, применение кверцетина способствовало установлению сбалансированного гомеостаза тканей пародонта посредством ограничения воспаления и создания микросреды в полости рта, благоприятной для симбиотической микробиоты [19]. В исследования *in vitro* кверцетин способствовал пролиферации кератиноцитов слизистой оболости полости рта и реэпителизации [16]. Дентин, обработанный кверцетином, характеризовался более низким процентным снижением микротвердости и меньшими значениями эрозивного стирания по сравнению с контрольной группой. Дентин после обработки кверцетином меньше продуцировал С-концевых телопептидов коллагена I типа и имел более толстый слой деминерализованного органического матрикса [18].

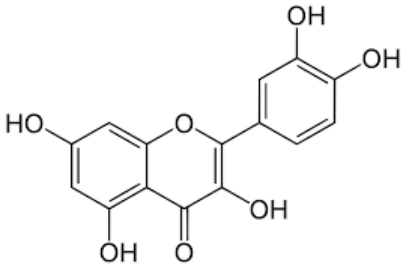


Рисунок 1 – Структурная формула кверцетина

Обеспечение высокого качества продукции является гарантией их эффективности и безопасности. В рамках данной работы были разработаны методики качественного и количественного анализа кверцетина и хлорофилла в жевательном мармеладе «Фитодент».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали жевательный мармелад Фитодент. Состав мармелада (на 100 г готового продукта) представлен в Таблице 2.

Таблица 2 – Состав жевательного мармелада Фитодент

№ п/п	Наименование компонентов	Содержание, % масс.	Нормативная документация
1	Желатин	18,0	ГОСТ 11293-2017
2.	Стевия, подсластитель	2,0	ГОСТ Р 53904-2010
3	Гуммиарабик, загуститель	2,25	ГОСТ 33310-2015
4	Ксилит	0,5	ГОСТ 20710-75
5.	Сорбитол	1,0	ГОСТ Р 53904-2010 По НД изготовителя
6.	Сок пихты сибирской	2,2	По НД изготовителя
7.	Кверцетин	0,075	ГОСТ Р 57990-2017
8.	Имбирь	0,3	ГОСТ ISO 1003-2016
9.	Экстракт хвойный	0,05	По НД изготовителя
10.	Хлорофиллин (шпинат)	0,05	По НД изготовителя
11.	Экстракт ламинарии	0,02	ТУ 10.39.30-025-41669896-2019
12.	Паста хвойная	0,05	ГОСТ 21802-84 По НД изготовителя
13.	Кислота лимонная	0,2	ГОСТ 908-2004
14.	Бензоат натрия	0,1	ГОСТ 32777-2014
15	Ароматизатор ананас	0,02	ГОСТ 32049-2013 По НД изготовителя
16	Ароматизатор клубника	0,02	ГОСТ 32049-2013 По НД изготовителя
17	Глянцеватель смесевой	0,01	ГОСТ 33308-2015 По НД изготовителя
18	Вода дистиллированная или питьевая	до 100	ГОСТ Р 51232-98

Рисунок 2 — Пастилки для жевания, рассасывания, проглатывания в целом виде; или другого способа применения местно в полости рта или внутрь, размером 2*2*1 см; правильной формы, квадратные по б*о*льшим размерам и сглаженные с одной стороны, однородные с включениями, темно-зеленого цвета, не прозрачные

Рисунок 3 — Образец жевательного мармелада

Экспериментальные данные были получены с использованием следующих приборов, оборудования:

1. Аналитические весы «Mettler Toledo XS 204», весы Мора ВА-4М, весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20. Весы электронные САРТО ГОСМ ЛВ 210-А.
2. Спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena).
3. Жидкостный хроматограф ВЭЖХ МАЭСТРО (ООО «Интерлаб»)
4. Газовый хроматограф «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором.

Используемые расходные материалы включали:

- хроматографические колонки Ultra C18, 5 um, 150 × 3.0 mm (Restek, USA); капиллярная кварцевая колонка HP-5ms 30 м×0,25 мм×0,25 мкм (неподвижная фаза: 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан)
- хроматографические пластинки «Силуфол УФ-254», «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ», системы элюирования (хлороформ-этанол-вода и хлороформ-метанол-вода в различных соотношениях);
- элюенты для ВЭЖХ: ацетонитрил (ООО «Компонент-реактив», «Для высокоэффективной жидкостной хроматографии»); вода, полученная с использованием системы для получения воды очищенной с многоступенчатой системой очистки (адсорбция, обратный осмос, мембранное фильтрование) и проверенная на чистоту в условиях хроматографического анализа.

Реактивы и остальные растворители (этанол, хлороформ, гексан, ацетон и др.) имели степень чистоты ч.д.а. или х.ч.

2. Методы исследования

2.1. Методы пробоподготовки

В общем случае подготовка для целей качественного определения БАС методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором проводилась следующим образом: около 5 г мармелада растирали, переносили в коническую колбу, экстрагировали гексаном или хлороформом по 10 мл два раза при нагревании до 40 °С по 3 мин, фильтрат сливали через фильтр «Красная лента», заполненный безводным сульфатом натрия, в мерную колбы вместимостью 25 мл. Фильтрат доводили до метки растворителем. Для хроматографических исследований раствор дополнительно фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм).

В целях количественного определения БАС методом ВЭЖХ подготовка осуществлялась следующим образом: около 5 г мармелада (точная навеска) измельчали, переносили в коническую колбу, экстрагировали этиловым спиртом по 10 мл два раза при нагревании до 40 °С по 5 мин, фильтровали через фильтр «Красная лента» в мерную колбу вместимостью 25 мл. Фильтрат доводили до метки растворителем. Пробу дополнительно фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм). Объем вводимой пробы – 3 мкл.

Для определения хлорофилла около 5 г мармелада (точная навеска) растирали, переносили в коническую колбу, экстрагировали 20% этанолом по 10 мл два раза при нагревании до 40 °С по 3 мин, раствор фильтровали через фильтр «Красная лента» в мерную колбу вместимостью 25 мл. Фильтрат доводили до метки растворителем. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 622 ± 2 нм.

Приготовление растворов стандартных образцов заключалось в растворении 0,025-0,030 г (точная навеска) веществ в подходящем растворителе в мерной колбе вместимостью 50 мл, доведении объема раствора до метки тем же растворителем. При определении содержания хлорофилла около 200 мг субстанции (хлорофилл питьевой) (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили 20% этанолом до метки.

2.2. Хроматографические методы

2.2.1.Тонкослойная хроматография

В исследовании ТСХ-разделение проводили на хроматографических пластинках “Силуфол УФ-254”, “Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ” или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Пластинки предварительно выдерживали для активации в сушильном шкафу при температуре 100-105 ºС в течение 1 часа. Пробы наносили микропипеткой на линию старта, проведенную на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки вдоль линии накатки, так чтобы пятна отстояли друг от друга на расстоянии около 1 см. После нанесения проб пластинку высушивали на воздухе в течение 5 мин, затем помещали в предварительно насыщенную парами растворителей камеру и хроматографировали восходящим способом в различных системах (хлороформ-этанол-вода 25:18:2). Когда фронт растворителей проходил около 8-9 см, пластинку вынимали и сушили на воздухе в течение 5-10 минут до удаления запаха растворителей. Детекцию проводили в видимой области спектра и в УФ-свете (254 и 366 нм), а также после обработки раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе натрия карбоната.

2.2.2.Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа ВЭЖХ МАЭСТРО (ООО «Интерлаб») в следующих условиях: метод обращенно-фазовой хроматографии, колонка Ultra C18, 5 um, 150 x 3.0 mm (Restek, USA); в качестве подвижных фаз использовали ацетонитрил (подвижная фаза А) и 1% водный раствор уксусной кислоты (подвижная фаза В).

Режим элюирования: 0-5 мин А/В 10/90 (изократический); 5-15 мин до А/В 60/40 (градиентный); 15-20 мин А/В 60/40 (изократический); 20-25 мин до А/В 80/20 (градиентный); 25-35 мин А/В 80/20 (изократический).

Детекцию вещество проводили при длинах волн 230, 254 и 350 нм. Объемы инжектируемых проб составляли 3 мкл.

Пригодность хроматографической системы оценивали в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография». Показатели пригодности хроматографической системы (эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии) рассчитывали по результатам 5-кратного анализа 2-5 мкл испытуемых растворов.

2.2.3.Газовая хроматография

Компонентный состав летучих соединений стоматологических композиций определяли с помощью газового хроматографа «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором. Анализ проводили с использованием капиллярной кварцевой колонки HP-5ms 30 м×0,25 мм×0,25 мкм (неподвижная фаза: 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан).

В общем случае условия хроматографирования:

1. газ-носитель: гелий, скорость потока 1 мл/мин;
2. программирование температуры термостата колонок: изотерма 40°С в течение 5 мин – нагрев до 80°С со скоростью 3°С/мин – нагрев до 180°С со скоростью 4°С/мин – нагрев до 280°С со скоростью 8°С/мин - изотерма 280°С в течение 10 мин.;
3. температура испарителя 270°С; температура источника ионов 150°С; температура квадруполя 230°С; температура переходной камеры 280°С;
4. объем вводимой жидкой пробы 1 мкл.

Для идентификации компонентов определяли линейные индексы удерживания, сопоставляли полученные результаты и полные масс-спектры с библиотечными (библиотеки масс-спектров «NIST 2.0») и литературными данными. Рассматривались

только компоненты, определяемые по библиотеке с вероятностью более 90%. Долю каждого компонента эфирного масла от суммы всех компонентов рассчитывали методом внутренней нормализации по площадям соответствующих пиков на хроматограмме, построенной по полному ионному току.

2.3. Спектральные методы

Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190-700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Результаты измерений обрабатывались с помощью программ WinASPECT и Microsoft Excel.

3. Статистическая обработка

Статистическая обработка результатов количественного определения проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

4. Валидация методик

Валидационная оценка методик количественного определения проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность (открываемость), прецизионность. Специфичность методики определялась по соответствию времен удерживания стандартных образцов и пиков, соответствующих этим стандартам на ГХ-хроматограмме испытуемого раствора.

Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов стандартных образцов. На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» или «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (r^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013.

Правильность методики тестировали путем введения в навеску геля добавки стандартного образца в количестве от 80 % до 120 % от исходного содержания в пробе.

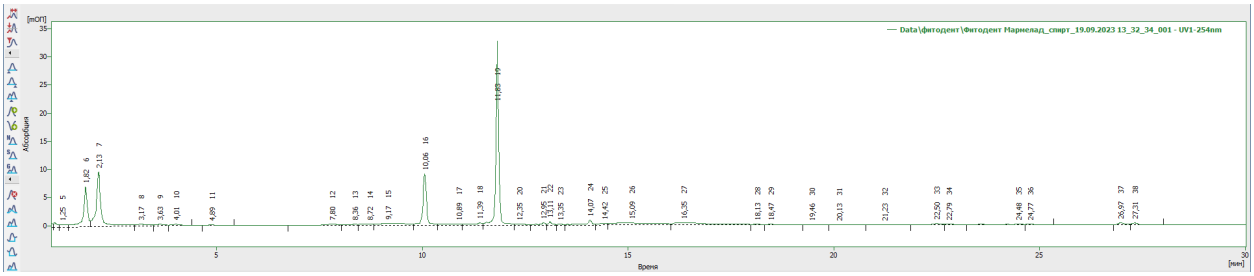
1. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Качественный анализ

В результате исследования были подобраны оптимальные условия для хроматографического разделения компонентов мармелада, описанных в разделе «Материалы и методы».

По соответствию Rf (ТСХ) и времен удерживания (ВЭЖХ) на хроматограммах извлечения из мармелада и стандартных образцов было подтверждено наличие кверцетина, натрия бензоата (рис. 4-5).

А



Б

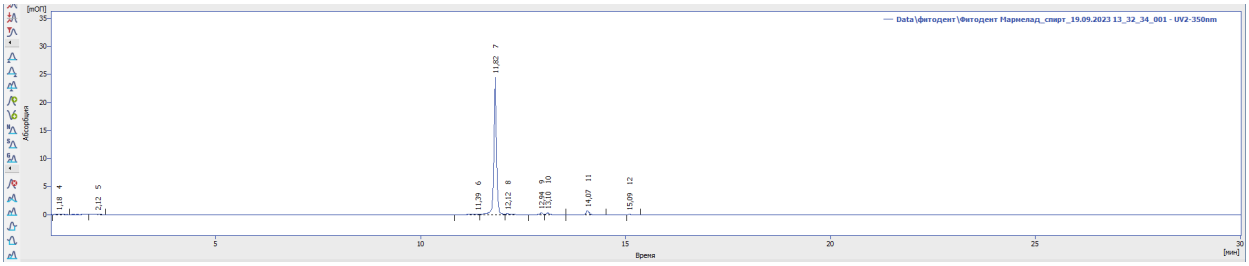


Рисунок 4 – ВЭЖ-хроматограммы мармелала «Фитодент»: детекция при 254 нм (А) и 350 нм (Б)

А

Б

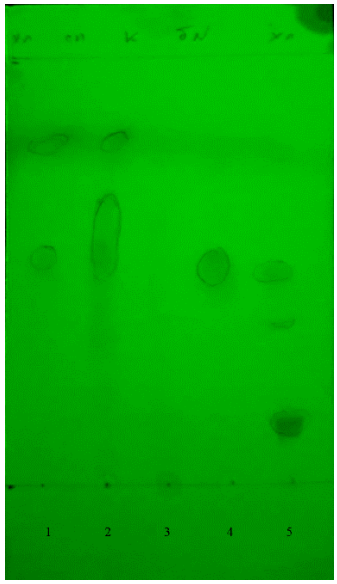


Рисунок 5 – ТСХ-хроматограммы исследуемых образцов с детекцией при видимом свете (А) и при облучении в УФ-лампе с длиной волны 254 нм (Б)

Обозначения: 1 – извлечение из мармелада (экстрагент – хлороформ), 2- извлечение из мармелада (экстрагент – этанол 95%), 3- кверцетин, 4- бензоат натрия, 5 - хлорофилл

На ГХ-МС хроматограмме обнаруживались ментол, мальтол, бензойная кислота.

Выводы по главе:

1.Предложены условия для оценки подлинности мармелада «Фитодент» методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2.В условиях ВЭЖХ-анализа обнаруживались кверцетин и натрия бензоат (времена удерживания 11,799 ± 0,017 мин и 10,045 ± 0,011 мин соответственно).

3.На ТСХ-пластинках обнаруживались кверцетин (Rf ≈ 0,60) и натрия бензоат (Rf ≈ 0,50), их наличие подтверждено в присутствии соответствующих стандартных образцов.

4.При проведении ГХ-МС анализа летучих органических соединения мармелада обнаружены мальтол и бензойная кислота (продукт превращения натрия бензоата). Мальтол является подтверждением наличия в продукте компонентов на основе хвои.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка методик количественного определения кверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Результаты оценки пригодности системы подтверждают пригодность хроматографической системы для количественного определения кверцетина в исследуемых образцах мармелада с детекцией при длине волны 254 и 350 нм (табл. 3).

Таблица 3 – Оценка пригодности хроматографической системы (по кверцетину)

Параметр хроматографической колонки	Значение (детекция при 254 нм)	Значение (детекция при 350 нм)	Нормативный показатель
Эффективность колонки	144089	143927	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	3,60	5,76	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	0,93	0,97	Не более 1,5

В дальнейшем для количественного определения и для оценки высвобождения кверцетина нами была выбрана методика с детекцией при длине волны 254 нм.

В условиях анализа время удерживания пика кверцетина на хроматограмме стандартного образца и этанольного извлечения из геля составило 11,799 ± 0,017 мин .

Показано, что растворитель и подвижная фаза не влияют на результаты анализа. Полученные результаты подтверждают специфичность методики.

Зависимость площади хроматографического пика от концентрации кверцетина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,024 до 0,24 мг/мл (рис. 6). Этот диапазон можно рассматривать как аналитическую область методики. Коэффициент корреляции составил 0,9958.

Рисунок 6 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации кверцетина в пробе

Открываемость кверцетина составила в среднем 95,2 %, что подтверждает правильность методики (табл. 4). В опытах с добавками определено, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки методики.

Исследование повторяемости методики указывает на сходимость полученных концентраций кверцетина: относительная ошибка среднего результата определения содержания флавоноида с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 3,32% (табл. 5). При оценке внутрилабораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения кверцетина в первый и второй дни анализа и при анализе разными аналитиками находится в диапазоне от 0,95 до 1,1.

Таблица 4 – Результаты определения правильности методики кверцетина в геле с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

Исходное содержание, мг/г	Добавлено, мг/г	Содержание, мг/г		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг	Относительная, %
0,079	0,063	0,141	0,134	-0,007	-5,25
0,079	0,079	0,157	0,149	-0,008	-5,10
0,079	0,094	0,173	0,166	-0,007	-4,10

Таблица 5 – Метрологические характеристики методики количественного определения кверцетина в геле с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

f	$\bar{X}$,	*S*	*P, %*	*t (P,f)*	$\Delta\bar{X}$	$\bar{\varepsilon}$, %
10	0,785	0,04010	95	2,23	±0,027	±3,32

Обозначения: f – число степеней свободы; $\bar{X}$ – среднее значение; S – стандартное отклонение; P – доверительная вероятность, t - t-критерий Стьюдента, $\Delta\bar{X}$ – полуширина доверительного интервала среднего результата; $\bar{\varepsilon}$ – относительная ошибка среднего результата.

С использованием этой методики было проанализировано содержание кверцетина в образце жевательного мармелада «Фитодент», которое составило 0,79 ± 0,03 мг/г

мармелада. Соответственно, можно рекомендовать нижний предел содержания не менее 0,7 мг/г (0,07%).

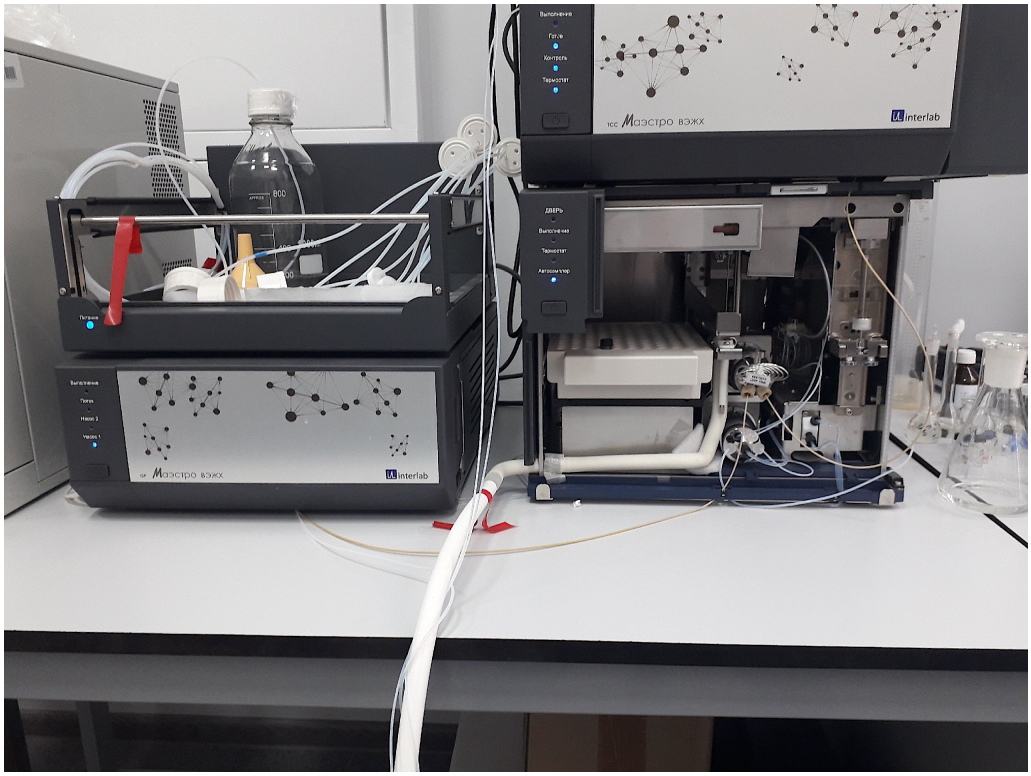


Рисунок 7 – Жидкостный хроматограф ВЭЖХ «МАЭСТРО» (насос и автосемплер)

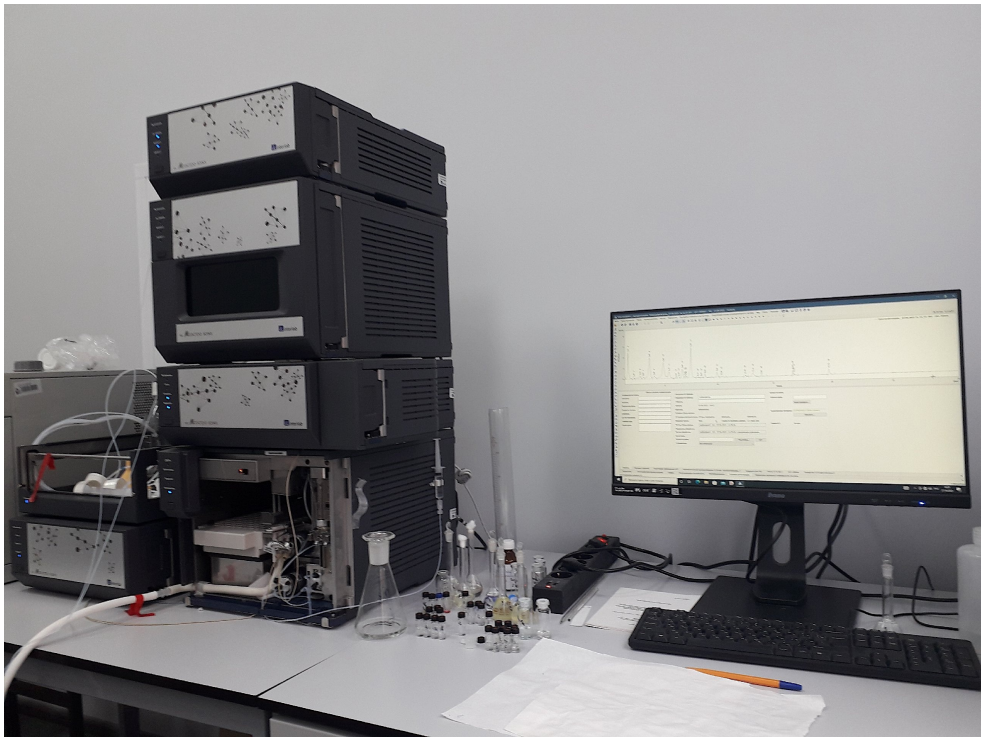


Рисунок 8 – Процедура проведения анализа методом ВЭЖХ извлечений из гелей

Разработка методик количественного определения натрия бензоата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Результаты оценки пригодности системы подтверждают пригодность хроматографической системы для количественного определения натрия бензоата в исследуемых образцах мармелада с детекцией при длине волны 230 нм (табл. 8).

Таблица 6 – Оценка пригодности хроматографической системы (по бензоату натрия)

Параметр хроматографической	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	74447	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	1,77	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	1,11	Не более 1,5

В условиях анализа время удерживания пика натрия бензоата на хроматограмме стандартного образца и этанольного извлечения из геля составило 10,045 ± 0,011 мин.

Показано, что растворитель и подвижная фаза не влияют на результаты анализа. Полученные результаты подтверждают специфичность методики.

Зависимость площади хроматографического пика от концентрации натрия бензоата описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,0044 до 1,32 мг/мл (рис. 9). Этот диапазон можно рассматривать как аналитическую область методики. Коэффициент корреляции составил 0,9984.

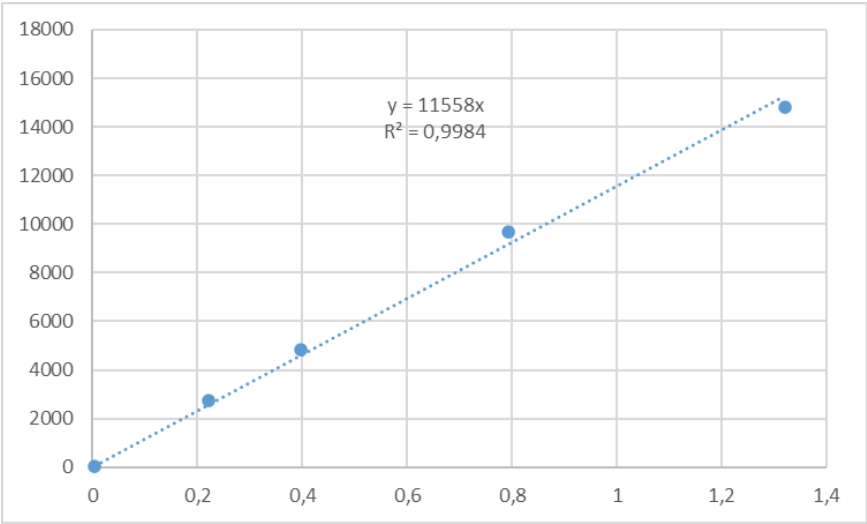


Рисунок 9 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации натрия бензоата в пробе (детекция при длине волны 230 нм)

Открываемость натрия бензоата составила в среднем 98,1 %, что подтверждает правильность методики (табл. 7). В опытах с добавками определено, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки методики.

Исследование повторяемости методики указывает на сходимость полученных концентраций натрия бензоата: относительная ошибка среднего результата определения содержания с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 3,56% (табл. 8). При оценке внутрилабораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения натрия бензоата в первый и второй дни анализа и при анализе разными аналитиками находится в диапазоне от 0,95 до 1,1.

Таблица 7 – Результаты определения правильности методики определения натрия бензоата в жевательном мармеладе «Фитодент»

Исходное содержание, мг/г	Добавлено, мг/г	Содержание, мг/г		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг	Относительная, %
2,790	2,232	5,022	4,879	-0,143	-2,84
2,790	2,790	5,580	5,647	0,067	+1,20
2,790	3,348	6,138	5,880	-0,258	-4,20

Таблица 8 – Метрологические характеристики методики количественного определения натрия бензоата в жевательном мармеладе «Фитодент»

f	$\bar{X}$,	*S*	*P, %*	*t (P,f)*	$\Delta\bar{X}$	$\bar{\varepsilon}$, %
10	2,79	0,1475	95	2,23	±0,099	±3,56

Обозначения: как в табл. 6

С использованием этой методики было проанализировано содержание натрия бензоата в образце жевательного мармелада «Фитодент», которое составило 2,79 ± 0,10 мг/г мармелада.

Разработка методик количественного определения хлорофилла методом спектрофотометрии

Для количественного определения хлорофилла в мармеладе была разработана спектрофотометрическая методика при аналитической длине волны 622 нм.

Зависимость оптической плотности от концентрации хлорофилла описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,022 до 5,0 мг/мл (рис. 10). Этот диапазон можно рассматривать как аналитическую область методики. Коэффициент корреляции составил 0,9999.

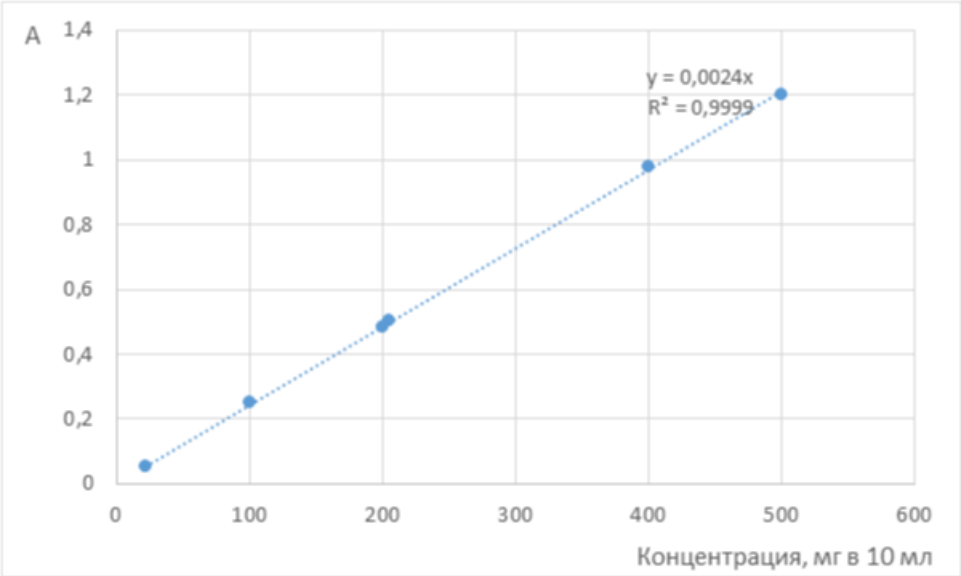


Рисунок 10 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации хлорофилла в пробе

Открываемость хлорофилла составила в среднем 98,7 %, что подтверждает правильность методики (табл. 9). В опытах с добавками определено, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки методики.

Исследование повторяемости методики указывает на сходимость полученных концентраций хлорофилла: относительная ошибка среднего результата определения содержания с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 5,79% (табл. 10). При оценке внутрилабораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения хлорофилла в первый и второй дни анализа и при анализе разными аналитиками находится в диапазоне от 0,95 до 1,1.

Таблица 9 – Результаты определения правильности методики определения хлорофилла в жевательном мармеладе «Фитодент»

Исходное содержание, мг/г	Добавлено, мг/г	Содержание, мг/г		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг	Относительная, %
12,900	10,320	23,220	22,862	-0,358	-1,54
12,900	12,900	25,800	26,061	0,261	+1,01
12,900	15,480	28,380	27,384	-0,996	-3,51

Таблица 8 – Метрологические характеристики методики количественного определения хлорофилла в жевательном мармеладе «Фитодент»

f	$\bar{X}$, %	*S*	*P*, %	*t (P,f)*	$\Delta\bar{X}$	$\bar{\varepsilon}$, %
10	1,29	0,1110	95	2,23	±0,075	±5,79

Обозначения: как в табл. 6

С использованием этой методики было проанализировано содержание хлорофилла в образце жевательного мармелада «Фитодент», которое составило 1,29 ± 0,08 %. Соответственно, можно рекомендовать нижний предел содержания не менее 1,2 %.

Выводы по главе

1. Разработаны и валидированы методики количественного определения кверцетина и натрия бензоата методом ВЭЖХ и хлорофилла методом спектрофотометрии.
2. Продемонстрированы удовлетворительные метрологические характеристики методик (по показателям правильности, прецизионности, специфичности).
3. Рекомендованы нижние пределы содержания для проанализированных действующих веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложены условия для оценки подлинности мармелада «Фитодент» методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В условиях ВЭЖХ-анализа обнаруживались кверцетин и натрия бензоат (времена удерживания 11,799 ± 0,017 мин и 10,045 ± 0,011 мин соответственно). При проведении тонкослойной хроматографии обнаруживались кверцетин (Rf ≈ 0,60) и натрия бензоат (Rf ≈ 0,50), их наличие подтверждено в присутствии соответствующих стандартных образцов. В условиях ГХ-МС анализа летучих органических соединения мармелада обнаружены мальтол и бензойная кислота (продукт превращения натрия бензоата). Мальтол является подтверждением наличия в продукте компонентов на основе хвои.

Разработаны и валидированы методики количественного определения кверцетина и натрия бензоата методом ВЭЖХ и хлорофилла методом спектрофотометрии. Продемонстрированы удовлетворительные метрологические характеристики методик (по показателям правильности, прецизионности, специфичности). Рекомендованы нижние пределы содержания для проанализированных действующих веществ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клеточный сок пихты сибирской // Биоэффектив. URL: https://clck.ru/36YN5T (дата доступа: 11.11.2023 г.)

2. Куркин, В.А. Влияние фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды, на физическую работоспособность животных / В.А. Куркин, А.В. Дубищев, Г.Г. Запесочная, И.Н. Титова, В.Б. Браславский, О.Е. Правдивцева, В.Н. Ежков, Е.В. Авдеева, Е.С. Петрова, И.Ю. Климова // Химико-фармацевтический журнал. - 2006. - Т. 40, №3. - С. 30 - 31.

3. Латиф, И.И. Оценка эффективности гелевой композиции для ухода за тканями полости рта / И.И. Латиф, А.М. Ковалевский, М.А. Носова, А.Н. Шаров, Л.А. Краева // Материалы международной научно-практической конференции «Стоматологическая весна в Белгороде – 2022». – С. 142–145.

4. Никитенко, В.В. Эффективность применения композиции в форме геля с экстрактом коры осины и хлорофиллом для лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта / В. В. Никитенко, А.М. Ковалевский, И.И. Латиф // Теоретические и практические вопросы клинической стоматологии: материалы конференции. – Санкт-Петербург, 2021. – С. 126-131.

5. Носова, М. А. Оценка эффективности однократной экспозиции геля с хлорофиллом и хлоргексидином 0,12% при установке формирователя десневой манжеты в зубной имплантат. Клиническое обоснование / М.А. Носова, А.Н. Шаров, В.Г. Панцулая, С.М. Ризаева, Е.С. Михайлова, Д.Д. Березина // Актуальные вопросы ортопедической стоматологии и ортодонтии: материалы конференции. – Ташкент, 2022. – С. 65–66. DOI: 10.13140/RG.2.2.16727.55201

6. Носова, М. А. Эффективность применения аллогенной dura mater для превентивного хирургического лечения образования одиночных и множественных рецессий десны перед ортодонтическим лечением несъемной ортодонтической техникой: клиническое исследование / М.А. Носова, Д.Д. Березина, Л.Т. Волова, А.Н. Шаров, Д.А. Трунин, М.А. Постников // Пародонтология. – 2022. – Т. 26, №. 4. – С. 317-326. DOI: 10.33925/1683-3759-2021-26-4-317-326.

7. Руда, О.Р. Применение лекарственных растительных средств для профилактики стоматологической патологии / О.Р. Руда // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения, ФГБНУ ВИЛАР. – Москва, 2021. – С. 485-490. DOI: 10.52101/9785870191027_2021_485

8. Стоматологический гель : заявление на патент на изобретение 2022117571/04(036967) Рос. Федерация : МПК A61K 31/155, A61K 31/16, A61K 31/555, A61K 31/718 / Шаров А.Н., Носова М.А., Ковалевский А.М., Латиф И.И., Ковалевский И.И., Некрасова В.Б. ; заявитель: ООО «Стоматологический магазин «Ромашка». - № 2022117571/04 ; заявл. 28.06.2022.

9. Струсовская, О.Г. Возможности использования ламинарина в медицине. Обзор литературы / О.Г. Струковская, О.В. Буюклинская // Экология человека. – 2009. - № 11. – С. 33-36.

10.Субанова, А.А. Фитотерапия в стоматологии (обзор литературы) / А.А. Субанова // Вестник КРСУ. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 190-194.

11. Червяковский, Е.М. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов / Е.М. Червяковский, В.П. Курченко, В.А. Костюк // Труды Белорусского государственного университета. – 2009. – Т. 4, часть 1.

12.Чуйкин, С.В. Фитотерапия в стоматологии / С.В. Чуйков, Е.Г. Егорова, Г.М. Акмалова. – Уфа: Lap Lambert, 2015. – С. 691.

13. Al-Bayati, F.A. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq / F.A. Al-Bayati // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2009. – Vol. 8. – P. 20. DOI: 10.1186/1476-0711-8-20.

14. Ahn, H., Maltol, a Natural Flavor Enhancer, Inhibits NLRP3 and Non-Canonical Inflammasome Activation / H. Ahn, G. Lee, B.C. Han, S.H. Lee, G.S. Lee // Antioxidants (Basel). – 2022. – Vol. 11, No. 10. – P. 1923. doi:10.3390/antiox11101923

15. Chaturvedi D, Singh K, Singh V. Therapeutic and pharmacological aspects of photodynamic product chlorophyllin. European Journal of Biological Research // European Journal of Biological Research. – 2019. – Vol. 9. – P. 64-76.

16. Corega, C. The benefits of Quercitin for dentistry and maxillofacial surgery: a systematic review / C. Corega, L. Vaida, D.G. Festila, G. Rigoni et al.// Minerva Stomatologica. 2014.

17. Di, P. A. Quercetin and its derivates as antiviral potentials: A comprehensive review / P.A. Di, G. Orrù, A Fais, M.C. Fantini // Phytother Res. – 2022. – Vol. 36, No. 1. – P. 266-278. doi:10.1002/ptr.7309

18. Hujiahemaiti, M. Effects of quercetin on human oral keratinocytes during re-epithelialization: An in vitro study / M. Hujiahemaiti, X. Sun, J. Zhou, H. Lv, X. Li, M. Qi,

M. Chi, C. Li, Y. Zhou // Archives of Oral Biology. – 2018. – Vol. 95, November 2018. – P. 187-194. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.08.004.

19. Janket, S.J. Oral and Systemic Effects of Xylitol Consumption / S.J. Janket, J. Benwait, P. Isaac, L.K. Ackerson, J.H. Meurman // Caries Research. 2019 May 6;53(5):491–501.

20. Jiang, N-w. Quercetin reduces erosive dentin wear: Evidence from laboratory and clinical studies / N.-w Jiang, D.-w. Hong, T. Attin, H. Cheng, H. Yu // Dental Materials. – 2020. – Vol. 36, N. 11. – P. 1430-1436.

21. Mao, Q.Q. Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) / Q.Q. Mao, X.Y. Xu, S. Y. Cao et al. // Foods. – 2019. – Vol. 8, No. 6. – P. 185. doi:10.3390/foods8060185

22. Mooney, E.C. Quercetin Preserves Oral Cavity Health by Mitigating Inflammation and Microbial Dysbiosis / E.C. Mooney, S.E. Holden, X-J Xia, Y. Li, M. Jiang, C.N. Banson, B. Zhu and S.E. Sahingur // Front. Immunol. 12:774273. doi: 10.3389/ fimmu.2021.774273

23. NCATS Inxight Drugs — SODIUM COPPER CHLOROPHYLLIN [Internet]. [cited 2023 Nov 11]. Available from: https://drugs.ncats.io/drug/1D276TYV9O

24. Ong T.M. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures / T.M. Ong, W.Z. Whong, J. Stewart, H.E. Brockman // Mutat Res. – 1986. – Vol 173, No. 2. – P. 111-115. doi:10.1016/0165-7992(86)90086-2

25. Ruiz-Ruiz J.C., Moguel-Ordoñez Y.B., Segura-Campos M.R. Biological activity of Stevia rebaudiana Bertoni and their relationship to health. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017;57:2680–2690. doi: 10.1080/10408398.2015.1072083.

26. Song CS, Moon CU. Composition comprising an extract of pine needle for preventing and treating human disease caused by viruses and the use thereof [Internet]. WO2007046642A1, 2007 [cited 2023 Nov 11]. Available from: https://patents.google.com/patent/WO2007046642A1/en

27. Zeng W.-C. Antimicrobial Activities of Pine Needle Extracts / W.-C. Zeng, Li-rong Jia // Food Science. – 2009. – Vol. 30, No. 7. – P. 87-90.

28. Ziklo, N. The Antimicrobial Mode of Action of Maltol and Its Synergistic Efficacy with Selected Cationic Surfactants / N. Ziklo, M. Bibi, P. Salama // Cosmetics. – 2021. – Vol. 8, No. 3. – P. 86. https://doi.org/10.3390/cosmetics8030086