

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 ГЕЛЯ «ФИТОДЕНТ ПЕРИОГЕЛЬ» И ОЦЕНКА  
КИНЕТИКИ ИХ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ В УСЛОВИЯХ, АНАЛОГИЧНЫХ ПОЛОСТИ РТА  
ЧЕЛОВЕКА  
(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

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## РЕФЕРАТ

Отчет 39 страниц

ХРОМАТОГРАФИЯ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ГЕЛЬ, ЯДЕРНЫЙ МАГНИСТНЫЙ РЕЗОНАНС, МАСС-СПЕКТРОМЕРИЯ, КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

**Цель работы** – провести фитохимические исследования субстанций, разработать методики качественного и количественного определения биологически активных соединений в гелях линейки . «Fitodent Periogel».

**Объекты исследований** - «Fitodent Periogel», гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином и «Fitodent Periogel», гель с хлорофиллом и хлоргексидином.

В результате исследований из коры осины были выделены и очищены два индивидуальных вещества, идентифицированные по данным ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , масс-спектрометрия как салицин и популин. Из хвойного экстракта выделен мальтол.

С использованием методов высокоэффективной жидкостной колоночной хроматографии и газовой хроматографии идентифицированы кверцетин, мальтол, метилсалицилат, эвгенол, ментол, метилпарабен.

Разработаны и валидированы методики количественного определения ментола, эвгенола, метилсалицилата методом газовой хроматографии и кверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Проанализировано высвобождение действующих вещество из гелей. В среднем в течение 6 часов эксперимента высвобождалось около 20-30% ментола, эвгенола и метилсалицилата.

# СОДЕРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| Обозначения и сокращения .....   | 3  |
| Реферат.....   | 4  |
| СОДЕРЖАНИЕ .....   | 5  |
| Основная часть .....   | 6  |
| Введение .....   | 6  |
| МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....   | 10 |
| 1.    Объекты исследования .....   | 10 |
| 2.    Методы исследования.....   | 12 |
| 2.1. Методы пробоподготовки .....  | 12 |
| 2.2. Определение pH вытяжек из гелей.....  | 12 |
| 2.3. Хроматографические методы.....  | 13 |
| 2.4. Спектральные методы (УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) .....  | 21 |
| 2.5. Анализ высвобождения биологически активных соединений из гелей.....   | 21 |
| 3.    Статистическая обработка.....  | 22 |
| 4.    Валидация методик .....  | 22 |
| 1.РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....  | 23 |
| 1.    Качественный анализ.....   | 23 |
| 2.    Результаты хроматографических исследований субстанций.....   | 26 |
| 2.Разработка методик количественного определения эвгенола и ментола в образцах гелей<br>методом хромато-масс-спектрометрии .....                     | 40 |
| 1.    Разработка методик количественного определения эвгенола, ментола и<br>метилсалицилата в образцах гелей методом хромато-масс-спектрометрии..... | 40 |
| 2.    Разработка методик количественного определения кверцетина в образцах гелей<br>методом высокоэффективной жидкостной хроматографии .....         | 45 |
| 3.Оценка высвобождения биологически активных соединений из гелей .....   | 49 |
| Список литературы .....  | 53 |

# 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. Растительное сырье широко применяется в терапии стоматологических заболеваний, в частности для ухода за деснами, лечения пародонтита; поражения десен и слизистой полости и при ряде других заболеваний [6, 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 [6, 9, 11].

Примерами недавних и успешных разработок в области стоматологии является линейка отечественных средств из растительного сырья для ухода за деснами и слизистой полости рта «Fitodent Periogel». Основными действующими компонентами этих средств являются производные хлорофилла, флавоноиды, экстракт осиновой коры и другие биологически активные вещества (витамины А, Д, Е, К, лютеин, аллантоин, пантенол, каротиноиды хвои сосны и ели, эвгенол и натрия альгинат и др.) [2, 3].

В ходе ранее проведенных исследований продемонстрирована высокая эффективность применения геля с корой осины и флавоноидами у пациентов с пародонтитом лёгкой и средней степени 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 [2, 3].

Имеется опыт применения геля с хлорофиллом и 0,12%-раствором хлоргексидина при хирургическом лечении рецессий десны, в том числе превентивно перед проведением ортодонтического лечения [4].

Одними из компонентов, обеспечивающих биологическую активность гелей являются флавоноиды, компоненты эфирных масел (эвгенол и ментол, метилсалицилат),

которые могут вносить вклад в антиоксидантную, противовоспалительную, противогрибковую и антимикробную активность гелей [7, 12, 14, 16, 24].

Эвгенол (рис. 1) продемонстрировал широкий спектр антимикробной активности по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, в том числе бактериям со сложными питательными потребностями и факультативным анаэробам ротовой полости, а также проявлял противогрибковое и противовирусное действие [21]. Эвгенол также был эффективным в отношении патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью.

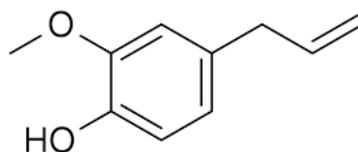


Рисунок 1 – Структурная формула эвгенола

Ментол – циклический монотерпеновый спирт, обладающий хорошо известными охлаждающими свойствами и мятным запахом (рис. 2). В различных исследованиях *in vitro* и *in vivo* подтверждены биологические свойства ментола, в том числе обезболивающее, антибактериальное, противогрибковое, анестезирующее и усиливающее проникновение других активных соединений действие, а также химиофилактическое и иммуномодулирующее действие [18]. Продемонстрировано, что L-ментол (1% или 5%) значительно увеличивает проникновение тетракаина (анестетика) и метилсалицилата в кожу мышей из гелей по сравнению с отрицательным контролем [20, 29].

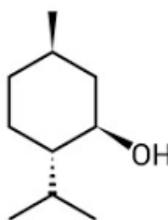


Рисунок 2 – Структурная формула L-ментола

Другим действующим веществом геля, также входящим в состав эфирных масел, является метилсалицилат (рис. 3). Метилсалицилат широко применяется в качестве местного обезболивающего средства, оказывает сосудорасширяющее действие [22, 27].

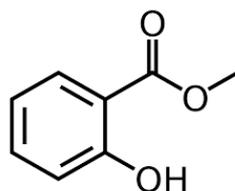


Рисунок 3 – Структурная формула метилсалицилата

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 крови, оказывают противовоспалительное действие, уменьшают ломкость капилляров, улучшают обменные процессы и др.) (рис. 4) [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 [13]. *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 (TLR). Следовательно, применение кверцетина способствовало установлению сбалансированного гомеостаза тканей пародонта посредством ограничения воспаления и создания микросреды в полости рта, благоприятной для симбиотической микробиоты [23]. В исследовании *in vitro* кверцетин способствовал пролиферации кератиноцитов слизистой оболочки 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].

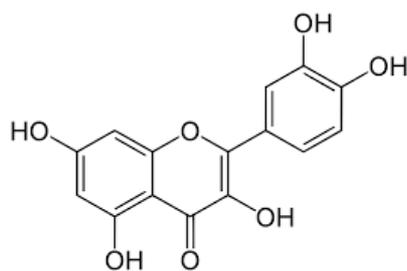


Рисунок 4 – Структурная формула кверцетина

Включение в состав гелей коры осины вносит вклад в антимикробную, противовоспалительную активность гелей [23, 30]. В качестве основных действующих веществ указывают фенологликозиды (салицин, популин), гликозиды кемпферола [16, 41], Доказано, что экстракт коры осины обладает ярко выраженным гастрозащитным (противоязвенным), актопротекторным (влияет на выносливость и физическую работоспособность), анальгезирующим, спазмолитическим, антимикробным, умеренным гиполипидемическим, противоопухолевым и противоописторхозным действием [1, 5, 6, 7, 8, 14, 20]. На основе экстракта коры осины были получены лекарственные препараты: таблетки «Экорсин» и капсулы «Экорсин форте», обладающие противовоспалительной и противоязвенной активностью, причем данный эффект оказался выше у капсулированной формы [4, 7]. Из коры осины было выделено вещество - тремулоидин, которое в ряде опытов показало, что обладает выраженными диуретическими свойствами и предупреждает развитие гентамициновой нефропатии [3, 5, 6]. Популин использовался для лечения сепсиса, вызванного липополисахаридами, у крыс, что может снизить уровни маркеров окислительного стресса и цитокинов у пациентов с сепсисом [33].

Обеспечение высокого качества продукции является гарантией их эффективности и безопасности. В рамках данной работы были разработаны методики качественного и количественного анализа эвгенола и ментола в средствах «Fitodent PerioGel» (гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином и гель с хлорофиллом и хлоргексидином [8].

Актуальность исследования обусловлено тем, что при лечении стоматологических заболеваний наряду с синтетическими препаратами широко применяются средства с активными компонентами растительного происхождения. Растительные компоненты имеют ряд преимуществ в сравнении с синтетическими средствами. В частности, они способны заменить стандартную антисептическую терапию при наличии антибактериальных свойств. Кроме того, они имеют перспективу применения без

ограничения продолжительности, в связи с отсутствием формирования резистентности бактериальной флоры к активным компонентам [5].

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **1. Объекты исследования**

В качестве объектов исследования использовали «Fitodent Periogel», гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином и гель с хлорофиллом и хлоргексидином:

Состав геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином (на 100 г готового продукта):

- экстракт осиновой коры 0,06 (в пересчете на абс. сух. массу)
- натрий медь хлорофиллин 0,02
- экстракт пихты сибирской 0,07
- кверцетин 0,3
- натриевую соль метилпарабена 0,2
- ароматизатор 0,05
- ментол 0,01
- эвгенол 0,05
- сорбит 70%-ый водный раствор 70,0
- эмульгатор 2,75
- метилсалицилат 0,1
- гидроксиэтилцеллюлозу 1,0
- лимонную кислоту 0,04
- аллантоин 0,2
- Д-пантенол 0,3
- альгинат натрия 0,35
- касторовое масло 2,5
- вода – сколько необходимо до получения общей массы 100 г.

Состав геля с хлорофиллом и хлоргексидином (на 100 г):

- Сорбитол 70% 70,3-77,7
- Вода 5,77-6,38
- Гидрогенизированное касторовое масло 2,61-2,88
- Гидроксиэтилцеллюлоза QP-100 1,9-2,1

- Альгинат натрия 2,5%-й раствор (по сухому веществу) 1,42-1,57
- Д-пантенол 0,28-0,31
- Хлоргексидина биглюконат 0,19-0,21
- Аллантоин 0,03-0,04
- Метилпарабен 0,09-0,1
- Метилсалицилат 0,06-0,07
- Ароматизатор Пектраль BLT x21 0090 0,04-0,05
- Ментол 0,04-0,05
- Экстракт пихты 0,04-0,05
- Натрий медь Хлорофиллин 0,01-0,02
- Эвгенол 0,01-0,02
- Пектин 0,57-0,59

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. ЯМР спектрометр JEOL JNM ECX-400
4. Тандемный жидкостный/газовый квадрупольно-тандемный масс-спектрометр высокого разрешения Bruker Maxis;
5. Жидкостный хроматограф ВЭЖХ МАЭСТРО (ООО «Интерлаб»)
6. Газовый хроматограф «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором.
7. pH-метр pH-150МИ («Измерительная техника»)

Используемые расходные материалы включали:

- хроматографические колонки Ultra C18, 5  $\mu$ m, 150  $\times$  3.0 mm (Restek, USA); капиллярная кварцевая колонка HP-5ms 30 м $\times$ 0,25 мм $\times$ 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 количественного определения БАС проводилась следующим образом: около 1 г геля (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 25-50 мл, прибавляли около 10 мл 95% этанола, перемешивали, нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Извлечение фильтровали через бумажный обеззоленный фильтр («Красная лента») в мерную колбу вместимостью 25 мл. Процедуру повторяли еще один раз, пробу фильтровали в ту же колбу, затем объем доводили 95% этанолом до метки. Извлечение разводили 95% этанолом в соотношении 1:1. Для хроматографических исследований раствор дополнительно фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм).

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.

Для изучения состава летучих органических соединений 3,0 г геля (точная навеска) обрабатывали 2 раза хлороформом по 10 мл, каждый раз фильтруя извлечение в мерную колбу вместимостью 25 мл.

### **2.2. Определение рН вытяжек из гелей**

1,0 г геля растворяли в 50 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании, электроды рН-метра были подготовлены согласно инструкции эксплуатации на прибор. Измерения проводили, погружая электрод в раствор так, чтобы

анализируемая проба полностью покрывала шарик стеклянного электрода. Показания прибора считывали через 3 минуты. Проба анализировалась в двух повторах.

### 2.3. Хроматографические методы

#### 2.3.1. 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 °С 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.

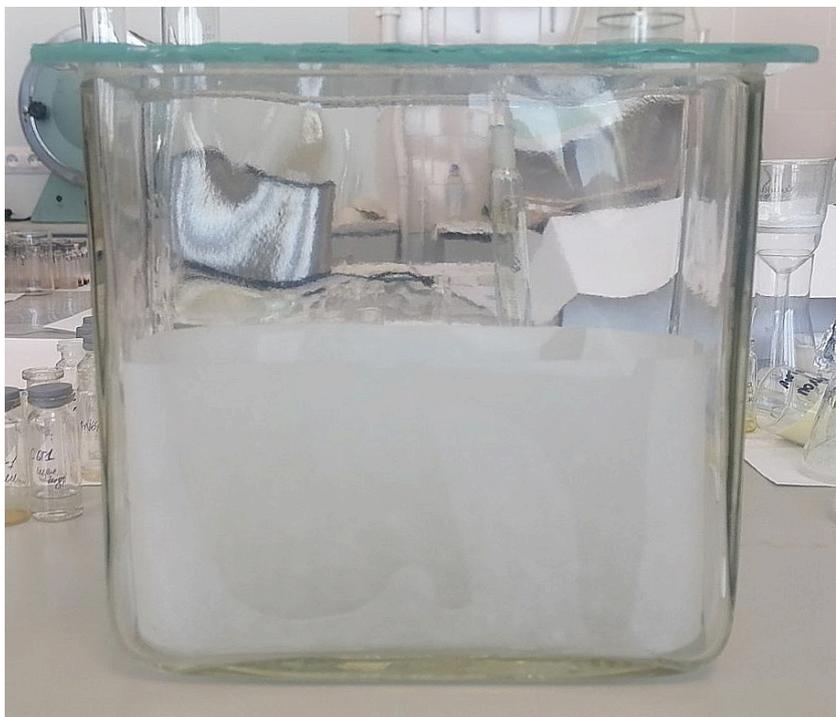


Рисунок 5 — Камера для проведения анализа методом тонкослойной хроматографии

### 2.3.2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография

С целью изучения химического состава субстанций была проведена адсорбционная жидкостная колоночная хроматография. Растворенный экстракт осины и хвойный экстракт упаривали и смешивали с силикагелем для колоночной хроматографии, высушивали до получения сыпучего порошка. Для заполнения колонок использовали суспензионный метод. Хроматографическое разделение проводили на сорбенте силикагеле L40/100 с использованием в качестве элюентов хлороформа, спирто-хлороформных смесей в различных соотношениях, 95% этанола. Схемы элюирования представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Схемы элюирования при проведении исследования компонентного состава экстракта осины и хвойного экстракта методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии

| Элюирующие смеси                   | Экстракт осины<br>Объемы (номера фракций) | Хвойный экстракт<br>Объемы (номера фракций) |
|------------------------------------|---|---|
| Хлороформ                          | 500 мл (1, 2)                             | 500 мл (1, 2)                               |
| 1 % EtOH – 99 % CHCl <sub>3</sub>  | -   | 1500 мл (3-13)                              |
| 3 % EtOH – 97 % CHCl <sub>3</sub>  | 1200 мл (3-9)                             | 1400 мл (14-22)                             |
| 5 % EtOH – 95 % CHCl <sub>3</sub>  | 500 мл (10-12)                            | 1000 мл (23-29)                             |
| 7 % EtOH – 93 % CHCl <sub>3</sub>  | 500 мл (13-15)                            | 700 мл (30-33)                              |
| 10 % EtOH – 90 % CHCl <sub>3</sub> | 1000 мл (16-21)                           | 700 мл (34-37)                              |
| 15 % EtOH – 85 % CHCl <sub>3</sub> | 1300 мл (22-28)                           | 500 мл (38-40)                              |
| 20 % EtOH – 80 % CHCl <sub>3</sub> | 1200 мл (29-35)                           | 1000 мл (41-47)                             |
| 30 % EtOH – 70 % CHCl <sub>3</sub> | 1200 мл (36-42)                           | 500 мл (48-50)                              |
| 40 % EtOH – 60 % CHCl <sub>3</sub> | 1500 мл (43-50)                           | 500 мл (51, 52)                             |
| 60 % EtOH – 40 % CHCl <sub>3</sub> | 1200 мл (51-57)                           | 500 мл (53-55)                              |
| EtOH                               | 500 мл (58-61)                            | 500 мл (56, 57)                             |

Фракции собирали объемам по 100-200 мл; упаривали в роторно-вакуумном испарителе при температуре 50±2 °С до остаточного объема 5-6 мл. Ход хроматографического разделения контролировали методом ТСХ в нескольких системах с

использованием различных способов детекции (визуально в видимой области; в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм).

В 22-24 и 33-36 фракциях коры осины выпадали осадки, которые были очищены перекристаллизацией из спиртовых и водно-спиртовых смесей, образцы переданы для проведения структурных исследований (ЯМР  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$  и масс-спектрометрия). По данным УФ-спектров можно предположить фенольную природу выделенных соединений.

Дополнительную очистку содержащихся во фракциях веществ планируется проводить рехроматографией на полиамиде (Woelm) и силикагеле L40/100 и перекристаллизацией.



Рисунок 6 — Упаривание фракций



Рисунок 7 — Процесс упаривания фракций, полученных из хвойного экстракта



Рисунок 8 — Рабочий процесс хроматографического деления субстанций, используемых для получения гелей

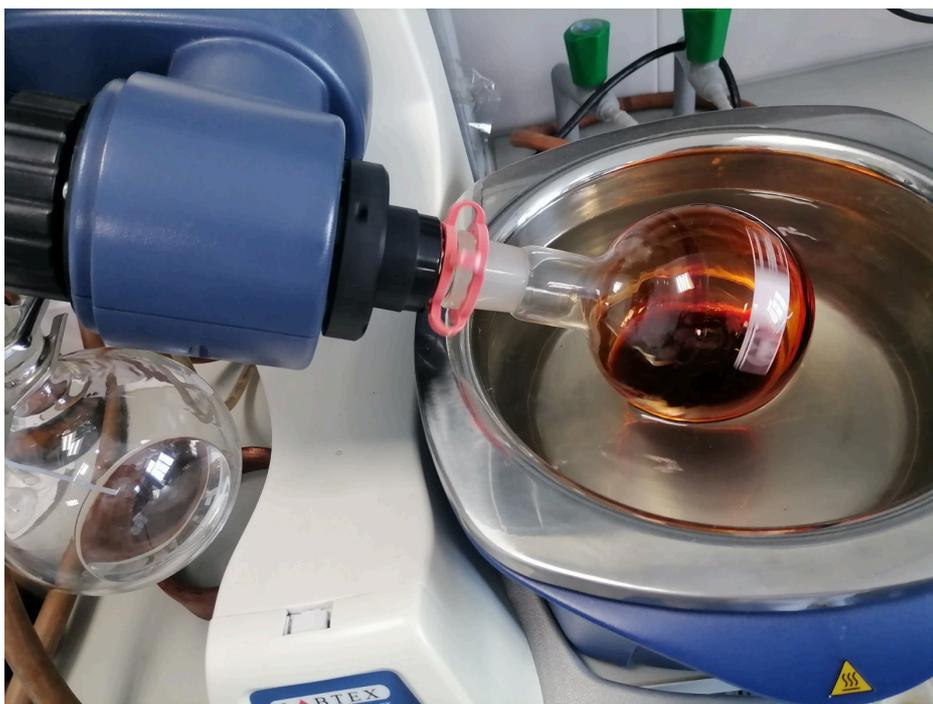


Рисунок 9 — Упаривание фракции, полученной из хвойного экстракта



Рисунок 10 — Процесс хроматографического деления извлечения из хвойного экстракта



Рисунок 11 — Процесс хроматографического деления извлечения из экстракта коры осины

### 2.3.3.Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа ВЭЖХ МАЭСТРО (ООО «Интерлаб») в следующих условиях: метод обращенно-фазовой хроматографии, колонка Ultra C18, 5  $\mu\text{m}$ , 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 вещества проводили при длинах волн 254, 290 и 350 нм. Объемы инжестируемых проб составляли от 1 до 10 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.

#### **2.3.4. 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°C в течение 5 мин – нагрев до 80°C со скоростью 3°C/мин – нагрев до 180°C со скоростью 4°C/мин – нагрев до 280°C со скоростью 8°C/мин - изотерма 280°C в течение 10 мин.;
3. температура испарителя 270°C; температура источника ионов 150°C; температура квадруполя 230°C; температура переходной камеры 280°C;
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.

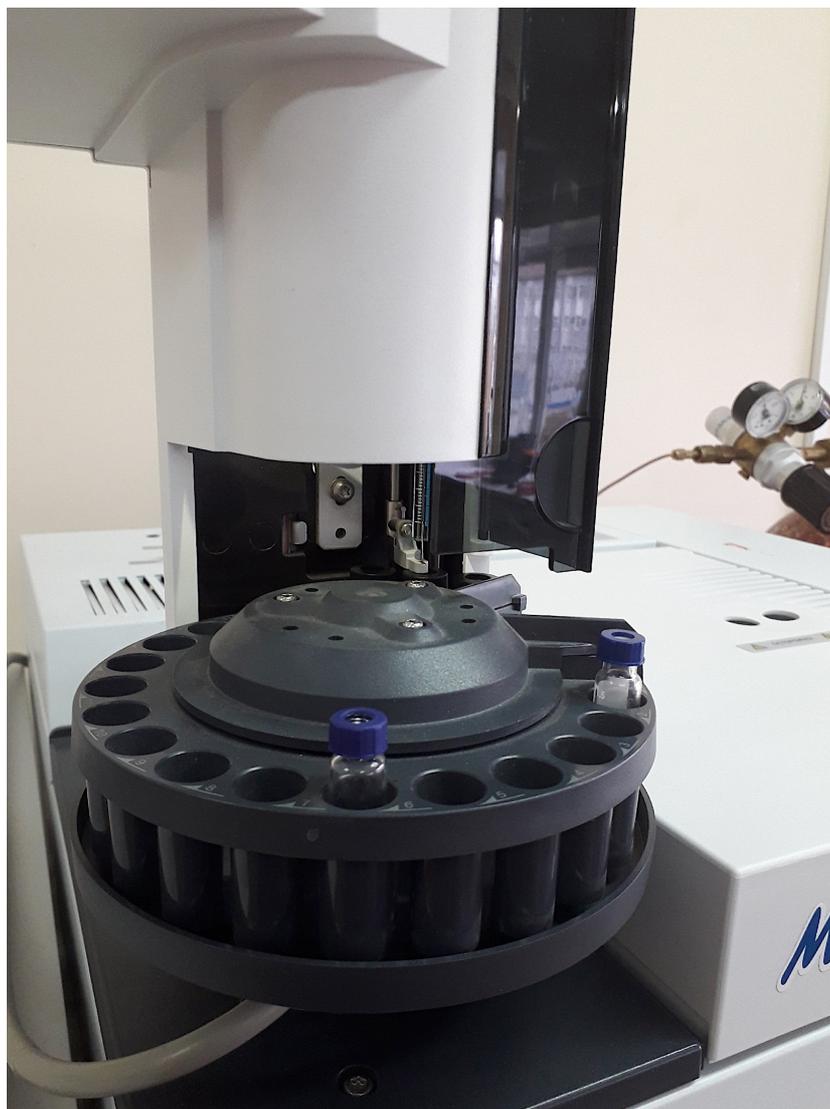


Рисунок 12 — Автоинжектор газовой хроматографии



Рисунок 13 — Газовый хроматограф «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором

#### **2.4. Спектральные методы (УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия)**

При изучении химического состава использовали УФ-, ЯМР-спектроскопию, масс-спектрометрию, а также сочетание экстракционных методов и перекристаллизации.

Спектральные свойства выделенных веществ изучали с использованием следующих методов: ЯМР-спектроскопия с использованием ЯМР-спектрометра JEOL JNM ECX-400 и масс-спектрометрия с использованием тандемного жидкостного/газового квадрупольно-тандемного масс-спектрометр высокого разрешения Bruker Maxis.

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.

#### **2.5. Анализ высвобождения биологически активных соединений из гелей**

О способности действующих веществ к высвобождению судили по результатам изучения диализа через полупроницаемую мембрану в опытах *in vitro*. В качестве полупроницаемой мембраны использовали мешок для диализа (M-Cel диаметр пор 3,5 кДа). В качестве диализной среды использовали фосфатный буферный раствор с кислотностью pH =6,5, соответствующей диапазону pH ротовой жидкости (pH 6,4-7,4).

Мешок для диализа предварительно кипятили в 10 мМ растворе динатриевой соли ЭДТА и 10 мМ растворе соды на деионизированной воде (в двухкомпонентном растворе) в течение 30 минут. Навеску геля наносили равномерным слоем на полупроницаемую мембрану, неподвижно закрепляли на конце полой трубки. Площадь диализной поверхности –  $8,04 \pm 0,10$  см<sup>2</sup>. Трубку с навеской опускали на 2-3 мм в диализную среду. Объем диализной среды – 25 мл. Диализ проводили при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 6 часов, пробы отбирали через 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240 и 360 мин с восполнением диализной среды. Количественное определение проводили хроматографическими методами в условиях, аналогичных тем, которые были подобраны для количественного определения действующих компонентов (высокоэффективная жидкостная или газовая хроматография).

Для определения степени высвобождения летучих органических соединений 1 мл диализата обрабатывали трехкратно хлороформом, каждый раз отделяя нижний слой. Полученное объединенное извлечение фильтровали через слой безводного сульфата натрия и доводили объем до 3 мл.

Для определения степени высвобождения кверцетина 1 мл диализата упаривали досуха, растворяли остаток в 2 мл метанола, фильтровали через фильтр 0,45 мкм и пробу вводили в жидкостный хроматограф. Объем пробы 5 мкл.

Опыты проводили в трехкратном повторении на трех навесках.

### **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

## 1. Качественный анализ

Все исследуемые образцы гелей имели слабокислую реакцию среды. Значение pH для геля «Fitodent Periogel» с хлорофиллом, корой осины и кверцетином –  $5,5 \pm 0,1$  ед., для геля «Fitodent Periogel» с хлорофиллом и хлоргексидином –  $5,4 \pm 0,1$  ед.

На ТСХ-пластинках в извлечениях из геля «Fitodent Periogel» с хлорофиллом, корой осины и кверцетином обнаруживалось пятно на уровне, соответствующем стандартному образцу кверцетина.

В результате исследования были подобраны оптимальные условия для хроматографического разделения компонентов гелей методом ВЭЖХ, описанные в разделе «Материалы и методы».

По соответствию времен удерживания извлечения и присланных стандартов и методом добавок было подтверждено наличие кверцетина, эвгенола, метилсалицилата (рис. 14-16).

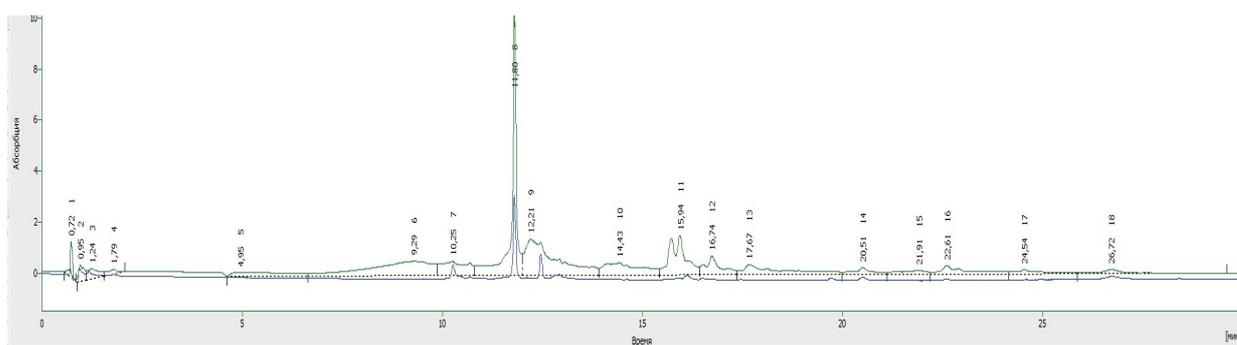
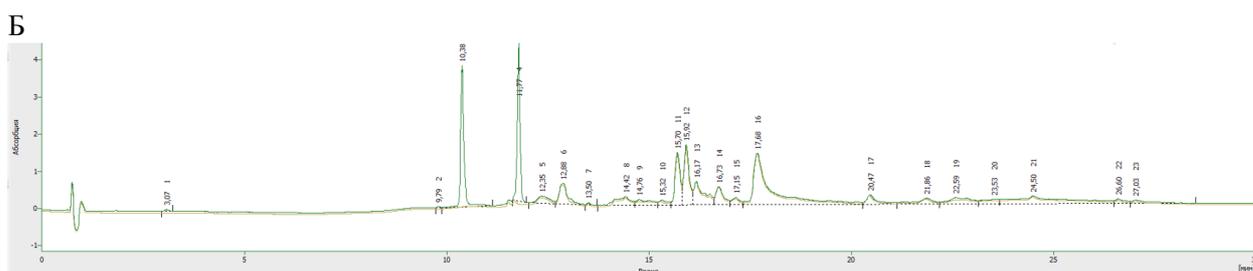
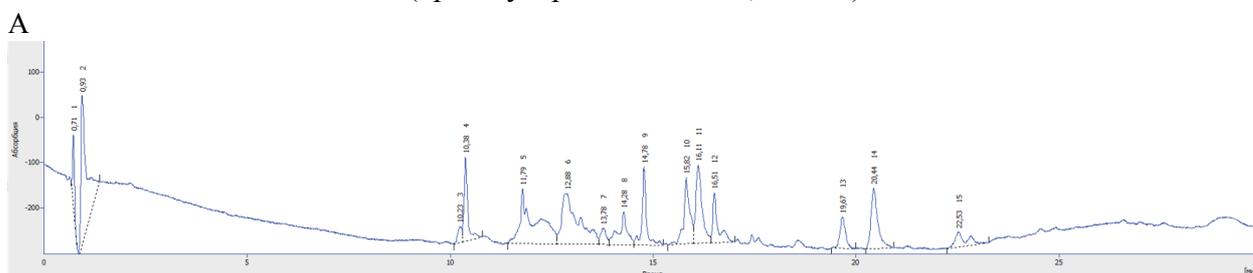


Рисунок 14 – ВЭЖ-хроматограммы геля «Fitodent Periogel» с хлорофиллом, корой осины и кверцетином (синяя линия) и рабочего стандартного образца кверцетина (зеленая линия) (время удерживания – 11,80 мин)



В

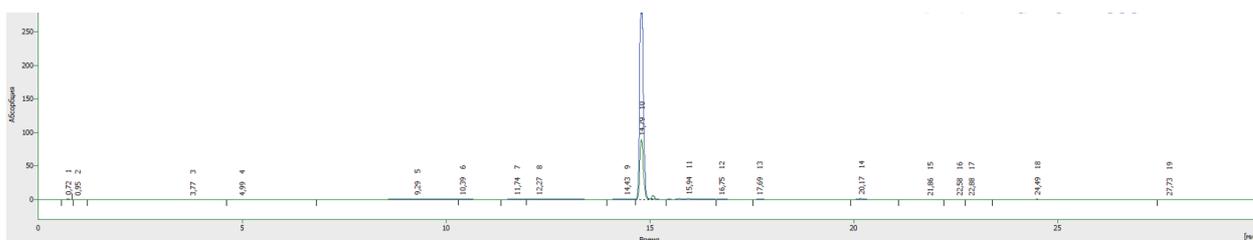


Рисунок 15 – ВЭЖ-хроматограммы геля «Fitodent Periogel» с хлорофиллом, корой осины и кверцетином (синий; А), геля «Fitodent Periogel» с хлорофиллом и хлоргексидином (зеленый, Б) и рабочего стандартного образца метилсалицилата (В) (время удерживания – 14,78 мин)

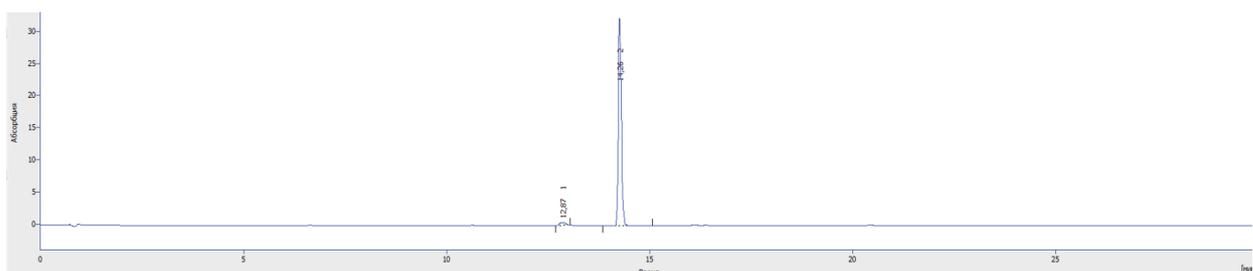


Рисунок 16 – ВЭЖ-хроматограммы рабочего стандартного образца эвгенола (время удерживания – 14,26 мин)

Следует отметить, что на ВЭЖХ-хроматограммах образцов гелей «Fitodent Periogel» с хлорофиллом и хлоргексидином не обнаруживался хлоргексидин, несмотря на наличие пика на хроматограмме субстанции, используемой для получения стоматологического продукта (рис. 17).

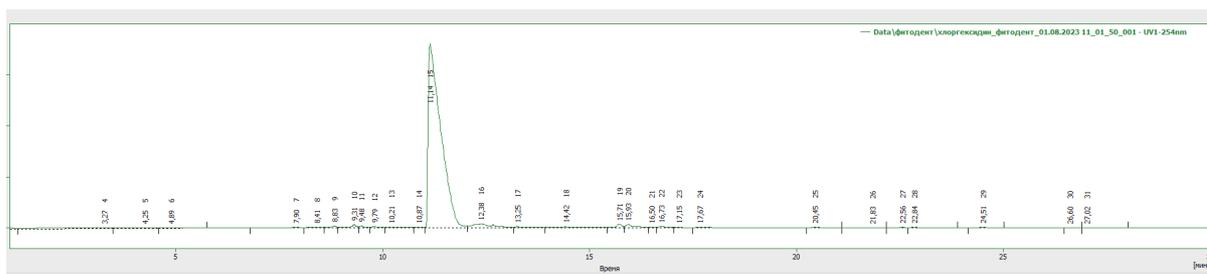


Рисунок 17 – ВЭЖ-хроматограммы рабочего стандартного образца хлоргексидина (время удерживания – 11,14 мин)

Изменение значения рН экстрагента также не приводило к появлению пика, соответствующего пику хлоргексидина на хроматограмме извлечения. Изучение литературных данных и анализ физико-химических свойств хлоргексидина продемонстрировали возможность образования водонерастворимых комплексов между хлоргексидином и вспомогательными веществами гелей, в частности анионными

полимерами (натрия альгинатом, карбоксиметилцеллюлоза) [32, 40, 41]. Исследование высвобождения хлоргексидина биглюконата из гелей, содержащих гидроксипропилцеллюлозу, показало существенное отличие от контрольной группы [27, 45]. В то же время в публикациях отмечается, что при использовании в качестве субстанции стехиометрических комплексов хлоргексидина и натрия альгината или карбоксиметилцеллюлозы возможно сохранение антимикробных свойств (на примере *E.coli*) на фоне улучшения органолептических свойств [32].

На ГХ-МС хроматограмме обнаруживались ментол, эвгенол, мальтол, метилсалицилат и метилпарабен (рис. 9). Определенном методом внутренней нормализации процентное соотношение площадей пиков представлено в Таблице 2.

Таблица 2 – Процентное соотношение распределения площадей на ГХ-МС хроматограмме гелей «Fitodent PerioGel»

| № п/п | Наименование   | Время удерживания, мин | «Fitodent PerioGel» с хлорофиллом, корой осины и кверцетином | «Fitodent PerioGel» с хлорофиллом и хлоргексидином |
|-------|----------------|------------------------|--|--|
|       | Мальтол        | 21,358                 | 0,005±0,002  | 0,004±0,002  |
|       | Ментол         | 24,708                 | 10,05±0,29   | 5,67±0,74  |
|       | Метилсалицилат | 25,408                 | 3,94±0,17  | 2,73±0,12  |
|       | Эвгенол        | 31,347                 | 0,99±0,31  | 0,71±0,31  |
|       | Метилпарабен   | 34,984                 | 49,25±8,34   | 42,14±4,94   |

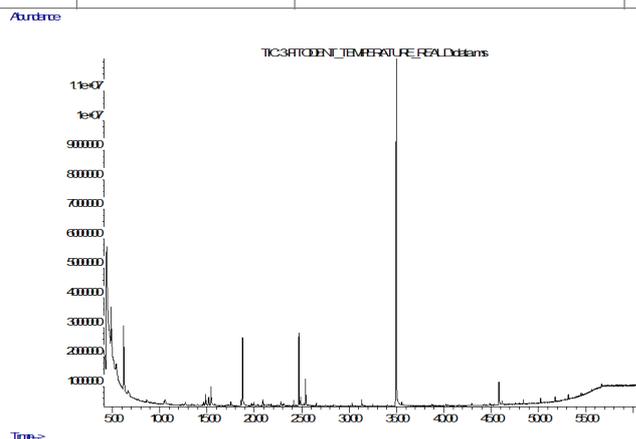


Рисунок 10 – ГХ/МС – хроматограмма хлороформного извлечения из гелей серии «Fitodent PerioGel» на примере геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

В дальнейшем для целей количественного определения метилсалицилата, эвгенола и ментола нами был выбран метод газовой хроматографии с связи с более высокой

чувствительностью методики, для количественного определения кверцетина – метод ВЭЖХ.

## 2. Результаты хроматографических исследований субстанций

С использованием метода газовой хроматографии с масс-селективным детектором проведено исследование компонентного состава хвойного экстракта – субстанции, используемой для получения гелей (рис. 18). Преобладающим компонентом на хроматограмме был мальтол, который также обнаруживался на хроматограмме хлороформного извлечения из геля (табл. 3).

Таблица 3 – Компонентный состав хвойного экстракта по результатам хромато-масс-спектрометрии

| № п/п | Название вещества  | Время удерживания, мин | Доля от суммарной площади идентифицированных компонентов, % |
|-------|--------------------|------------------------|---|
|       | Мальтол            | 22,061                 | 63,90±2,89  |
|       | Борнеол            | 24,474                 | 1,26±0,25   |
|       | Куминовый альдегид | 24,971                 | 2,77±0,32   |
|       | Эстрагол           | 25,6120                | 0,51±0,16   |
|       | Карвон             | 27,506                 | 0,88±0,18   |
|       | Анетол             | 29,067                 | 0,37±0,12   |

Abundance

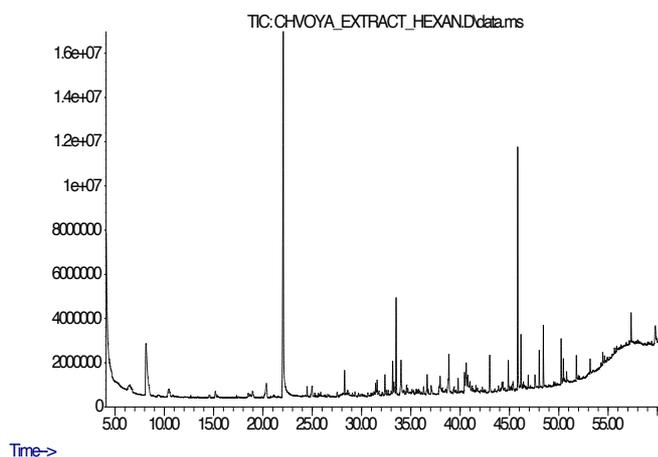


Рисунок 18 – ГХ/МС-хроматограмма хвойного экстракта

В результате хроматографического деления компонентов методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии из экстракта осины и хвойного экстракта выделены несколько индивидуальных соединений.

**Из хвойного экстракта** при элюировании через колонку смесью хлороформ-этанол (v/v 99/1) было выделено белое кристаллическое вещество, с температурой плавления 161-162 °С (перекр. из этанола). В ИК-спектре соединения видны характеристические полосы поглощения 1560 см<sup>-1</sup>, 1627 см<sup>-1</sup>, 1654 см<sup>-1</sup> характерные для валентных -C=C и -C=O колебаний, а также полосы 2924 см<sup>-1</sup>, 3063 см<sup>-1</sup>, 3265 см<sup>-1</sup>, характерные для валентных =CH<sub>2</sub>, -CH, -ОН колебаний (рис. 19).

ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3265, 3375, 3063, 2924, 2852, 1654, 1627, 1560, 1460, 1259, 1198, 1076, 920.

В спектре ЯМР <sup>13</sup>C присутствует сигнал атома углерода карбоксильной группы в области 173,2 м.д., сигналы атомов углерода при двойных связях в области 113,3 м.д., 143,4 м.д., 149,6 м.д. и 154,2 м.д. Также в спектре наблюдается сигнал углерода в сильной области 14,37 м.д., характерный для метильной группы (рис. 20А).

В спектре ЯМР <sup>1</sup>H наблюдаются сигналы протонов метильной группы (-CH<sub>3</sub>) в области 2,32 м.д., виден уширенный синглет в области 7,4 м.д., характерный для протонов -ОН группы, также видны два с дублета в области 6,37-6,39 м.д. и 7,66-7,67 м.д., характерные для протонов при двойной связи C=C (рис. 12В).

ЯМР <sup>13</sup>C (100 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 14,37 (CH<sub>3</sub>), 113,3 (=C-C=O), 143,4 (C-OH), 149,6 (C-CH<sub>3</sub>), 154,2 (=C-O-), 173,2 (C=O).

ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 2,32 (3H, с), 6,37-6,39 (1H, д, J=5,52 Гц), 7,40 (1H, уш.с), 7,66-7,67 (1H, д, J=5,52 Гц).

Предполагаемая структура соединения – мальтол (3-гидрокси-2-метил-4-пирон)

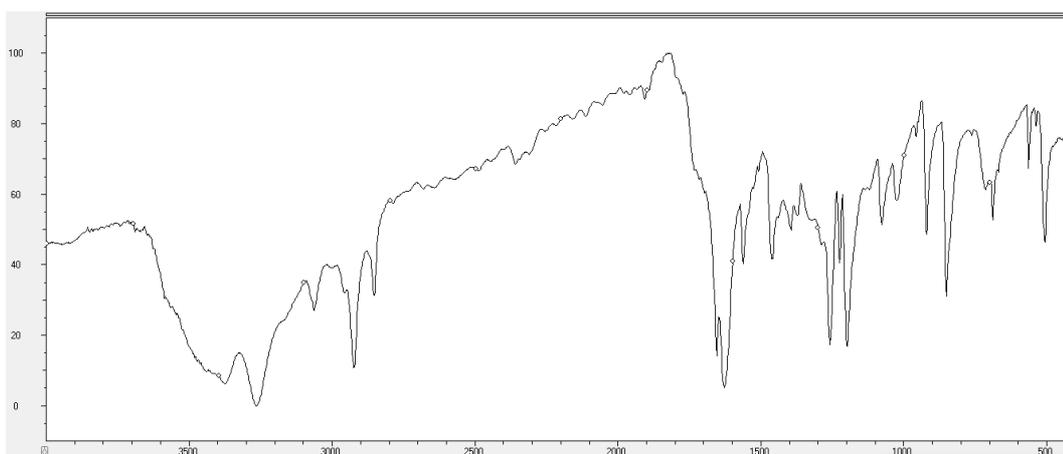


Рисунок 19 – ИК-спектр вещества, выделенного из хвойного экстракта

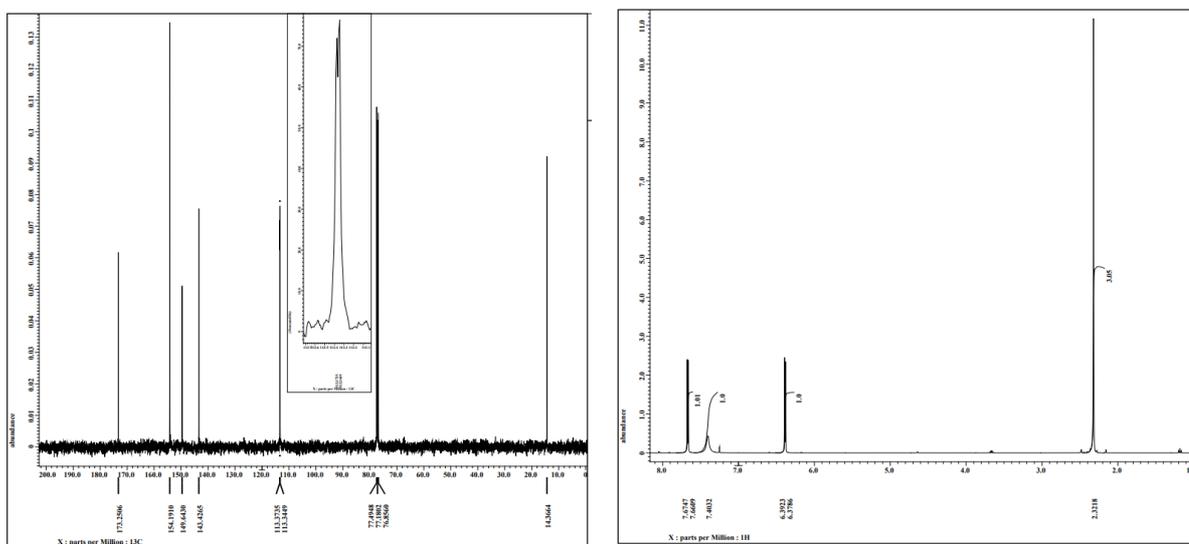


Рисунок 20 – ЯМР  $^{13}\text{C}$  и ЯМР  $^1\text{H}$  вещества, выделенного из хвойного экстракта



Рисунок 21 — хроматографического деления извлечения из хвойного экстракта

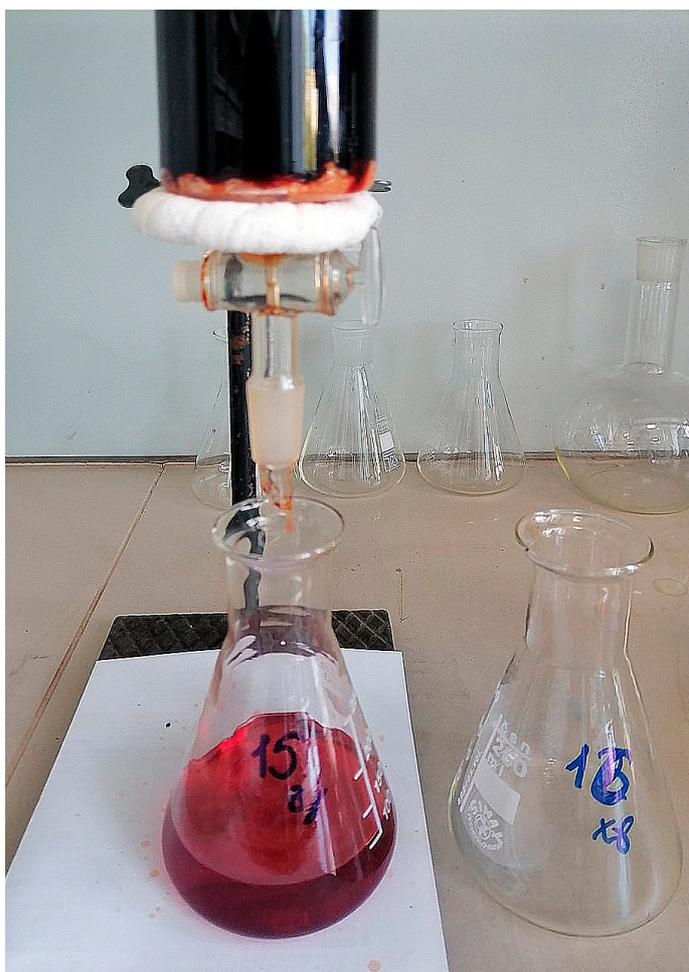


Рисунок 22 — Хроматографическое деление и сбор фракций, полученных из хвойного экстракта

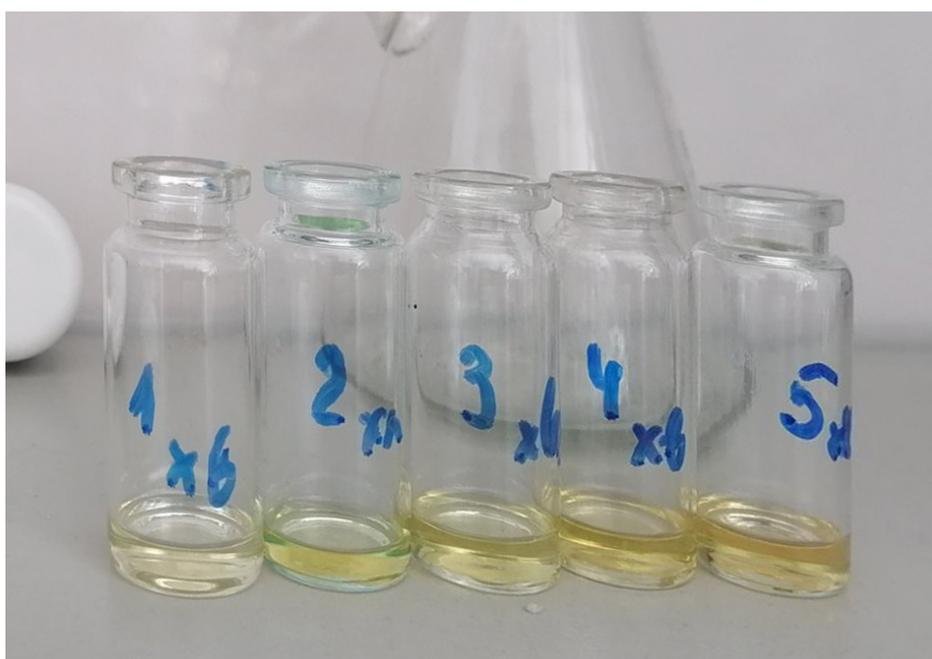


Рисунок 23 — Фракции, полученные из хвойного экстракта (элюент – хлороформ)



Рисунок 24 — Фракции, полученные из хвойного экстракта



Рисунок 25 — Фракции, полученные из хвойного экстракта

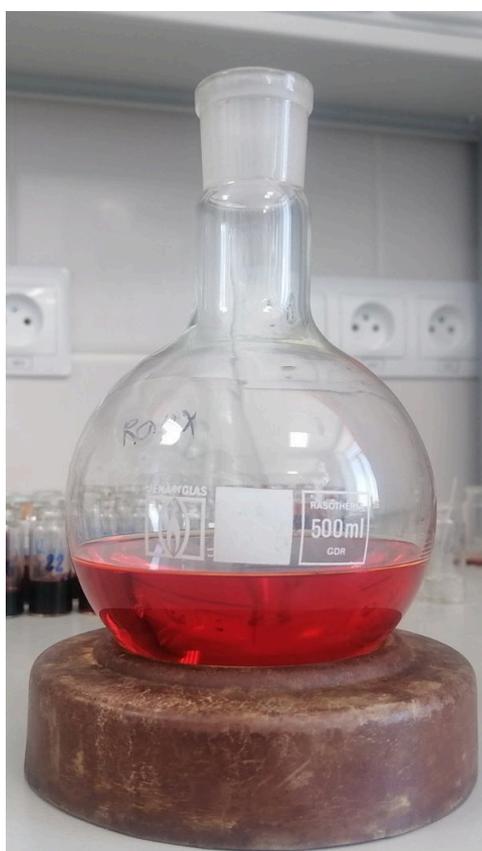


Рисунок 26 — Фракция, полученная из хвойного экстракта, в колбе для последующего упаривания

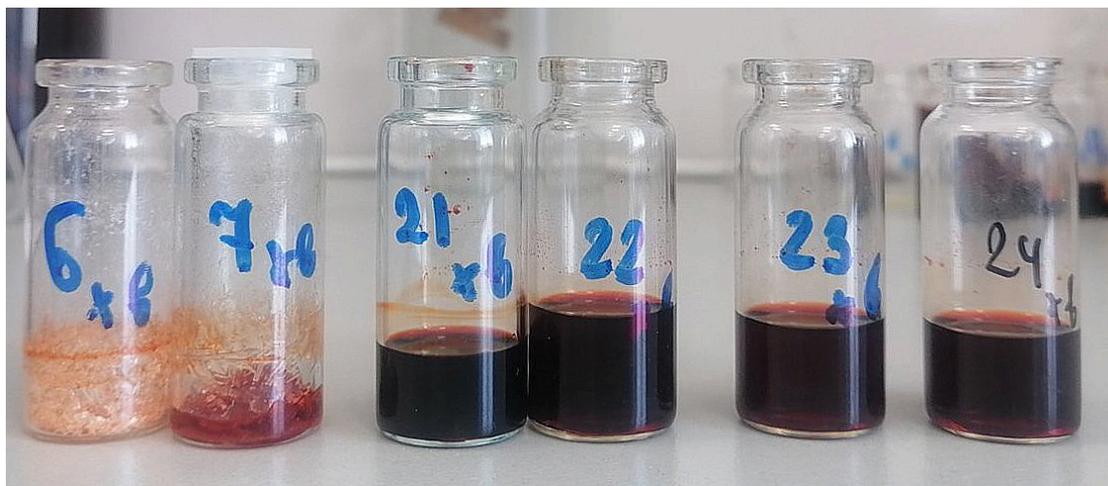


Рисунок 27 — Фракция, полученная из хвойного экстракта

Из экстракта коры осины при элюировании через колонку смеси хлороформ-этанол (v/v 80/20) было выделено белое кристаллическое вещество (1), с температурой плавления 205-206 °С (перекр. из этанола). В ИК-спектре соединения видна широкая полосы поглощения 3346 см<sup>-1</sup> характерные для –ОН группы, полосы поглощения в области 2933 см<sup>-1</sup>, 2894 см<sup>-1</sup> характерные для валентных –СН колебаний, а так же полосы 1604 см<sup>-1</sup>, 1589 см<sup>-1</sup> соотносимые с С-С колебаниями ароматических атомов углерода.

ИК-спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3346, 2933, 2894, 2870, 1604, 1589, 1494, 1454, 1415, 1242, 1190, 1116, 1084, 1042, 1014, 756 (рис. 28).

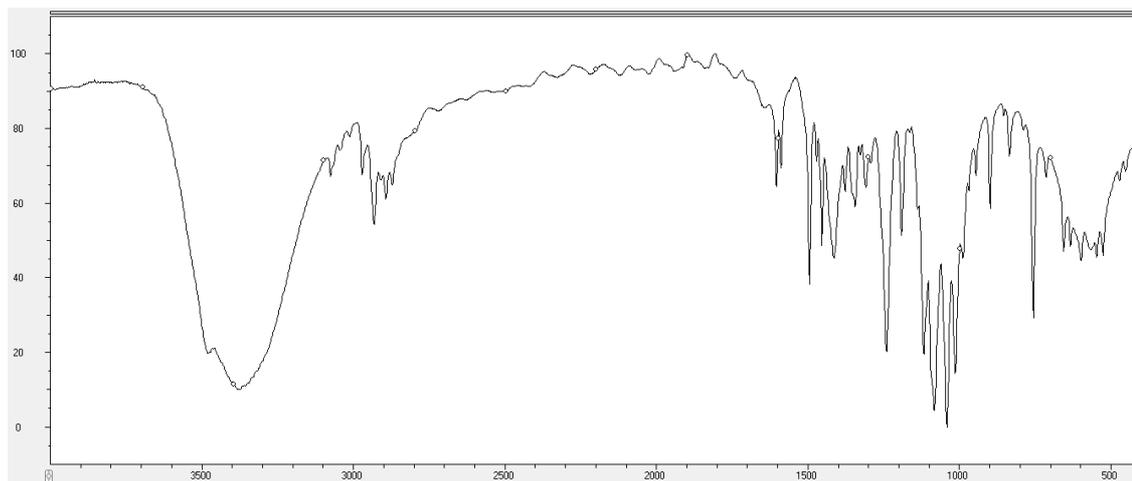


Рисунок 28 – ИК-спектр вещества, выделенного из коры осины (1)

В спектре ЯМР <sup>13</sup>С присутствуют сигналы атомов углерода ароматического кольца в области 115,3 – 132,0 м.д, сигнал ароматического атома углерода, смещенный в слабое поле, связанный с атомом кислорода в области 155,3 м.д., наблюдаются сигналы алифатических атомов углерода, связанных с атомами кислорода 58,78 м.д. и 61,30 м.д., а

так же сигналы атомов углерода фрагмента глюкозы в области 70,29 м.д.– 101,9 м.д. (рис. 14А).

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  наблюдаются сигналы протонов ароматического кольца в области 6,96 – 7,33 м.д., а так же протоны при углеродных атомах глюкозы и протоны гидроксильных групп в области 3,10 – 5,30 м.д. (рис. 29В).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100 МГц, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 58,78 (-Car $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$ ), 61,30 (-C $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$ ), 70,29 (CH), 73,95 (CH), 77,04 (CH), 77,61 (CH), 101,9 (O $\underline{\text{C}}\text{HO}$ ), 115,3 (Car), 122,3 (Car), 127,7 (Car), 128,2 (Car), 132,0 (Car), 155,2 (O $\underline{\text{C}}\text{Car}$ ).

ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 3,10-3,16 (1H, м), 3,19-3,29 (3H, м), 3,41-3,47 (1H, м), 3,65-3,69 (1H, м), 4,40-4,45 (1H, м), 4,53-4,56 (1H, м), 4,58-4,63 (1H, м), 4,72-4,74 (1H, м), 4,93-4,95 (1H, м), 4,96-4,99 (1H, м), 5,03-5,04 (1H, м), 5,30-5,31 (1H, м), 6,96-6,98 (1H, м), 7,04-7,06 (1H, м), 7,15-7,16 (1H, м), 7,32-7,33 (1H, м).

Предполагаемая структура соединения – салицин (2-(гидроксиметил)-6-[2-(гидроксиметил)фенокси]оксан-3,4,5-триол).

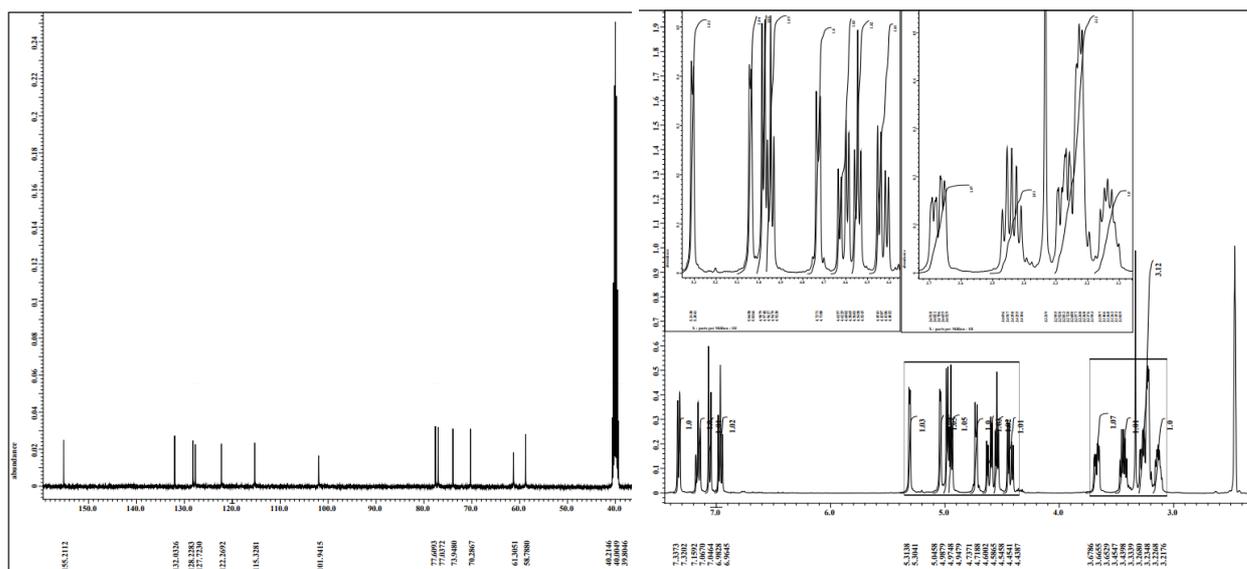


Рисунок 29 - ЯМР  $^{13}\text{C}$  и ЯМР  $^1\text{H}$  вещества, выделенного из коры осины (1)

В УФ-спектре вещества наблюдаемый максимум поглощения соответствовал  $270 \pm 2$  нм.

Из экстракта коры осины при элюировании через колонку смеси хлороформ-этанол (v/v 90/10) было выделено белое кристаллическое вещество (2), с температурой плавления  $180-182^\circ\text{C}$  (перекр. из этанола). В ИК-спектре соединения видна широкая полосы поглощения  $3417\text{ см}^{-1}$  характерные для  $-\text{OH}$  группы, полосы поглощения в области  $2978\text{ см}^{-1}$ ,  $2964\text{ см}^{-1}$  характерные для валентных  $-\text{C-H}$  колебаний, видна сильная полоса

поглощения  $1720\text{ см}^{-1}$  характерная для  $\text{C}=\text{O}$  колебаний, а так же полосы  $1605\text{ см}^{-1}$ ,  $1589\text{ см}^{-1}$  соотносимые с  $\text{C}-\text{C}$  колебаниями ароматических атомов углерода (рис. 30).

ИК-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 3417, 2978, 2964, 1720, 1605, 1593, 1497, 1456, 1400, 1287, 1278, 1068, 968, 756.

В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  присутствуют сигналы атомов углерода ароматических колец в области  $115,1 - 133,9$  м.д, сигнал ароматического атома углерода, смещенный в слабое поле, связанный с атомом кислорода в области  $155,3$  м.д. виден сигнал углерода карбоксильной группы в области  $166,0$  м.д. Наблюдаются сигналы алифатических углеродов, связанных с атомами кислорода в области  $58,65$  м.д. и  $64,83$  м.д., а так же сигналы атомов углерода замещенной глюкозы в области  $70,71$  м.д.–  $101,5$  м.д. (рис. 31А).

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  наблюдаются сигналы ароматических протонов в области  $6,91 - 7,96$  м.д., а так же протоны при углеродных атомах глюкозы и протоны гидроксильных групп в области  $3,30 - 5,42$  м.д. (рис. 31В).

ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 58,65 ( $-\text{Car}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$ ), 64,83 ( $-\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCO}$ ), 70,71 (CH), 73,86 (CH), 74,29 (CH), 76,84 (CH), 101,5 ( $\text{O}\underline{\text{C}}\text{HO}$ ), 115,1 (Car), 122,3 (Car), 127,9 (Car), 129,3 (2 Car), 129,7 (2 Car), 130,2 (Car), 132,1 (Car), 133,9 (Car), 154,8 ( $\text{OC}\underline{\text{C}}\text{ar}$ ), 166,0 ( $\text{OC}=\text{O}$ ).

ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 3,30-3,34 (3H, м), 3,73-3,77 (1H, м), 4,28-4,30 (1H, м), 4,43-4,45 (1H, м), 4,59-4,60 (2H, м), 4,83-4,84 (1H, м), 4,92-4,94 (1H, м), 5,20-5,21 (1H, м), 5,36-5,37 (1H, м), 5,41-5,42 (1H, м), 6,91-6,98 (2H, м), 7,03-7,05 (1H, м), 7,31-7,33 (1H, м), 7,50-7,54 (2H, м), 7,63-7,66 (1H, м), 7,94-7,96 (2H, м).

Предполагаемая структура соединения – популин (2-(гидроксиметил)фенил  $\beta$ -D-глюкопиранозид 6-бензоат).

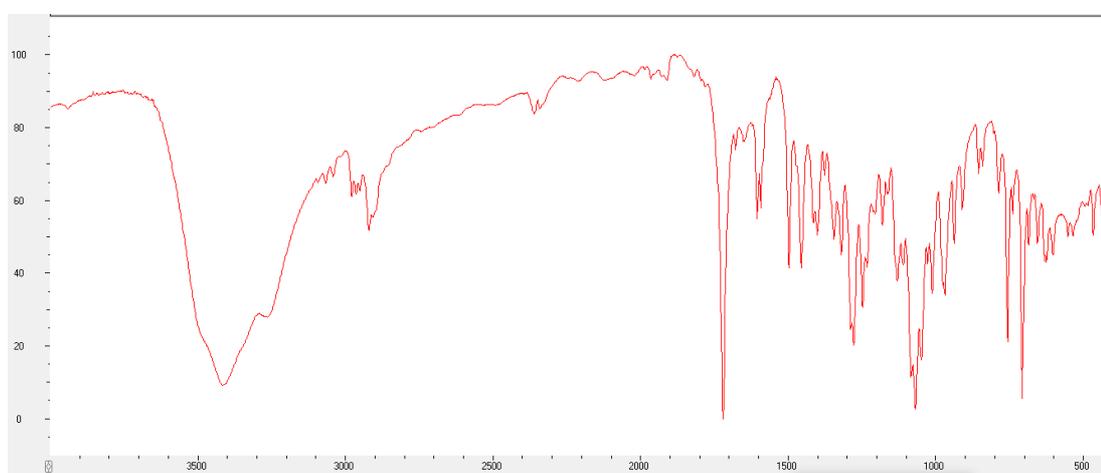


Рисунок 30 - ИК-спектр вещества, выделенного из коры осины (2)

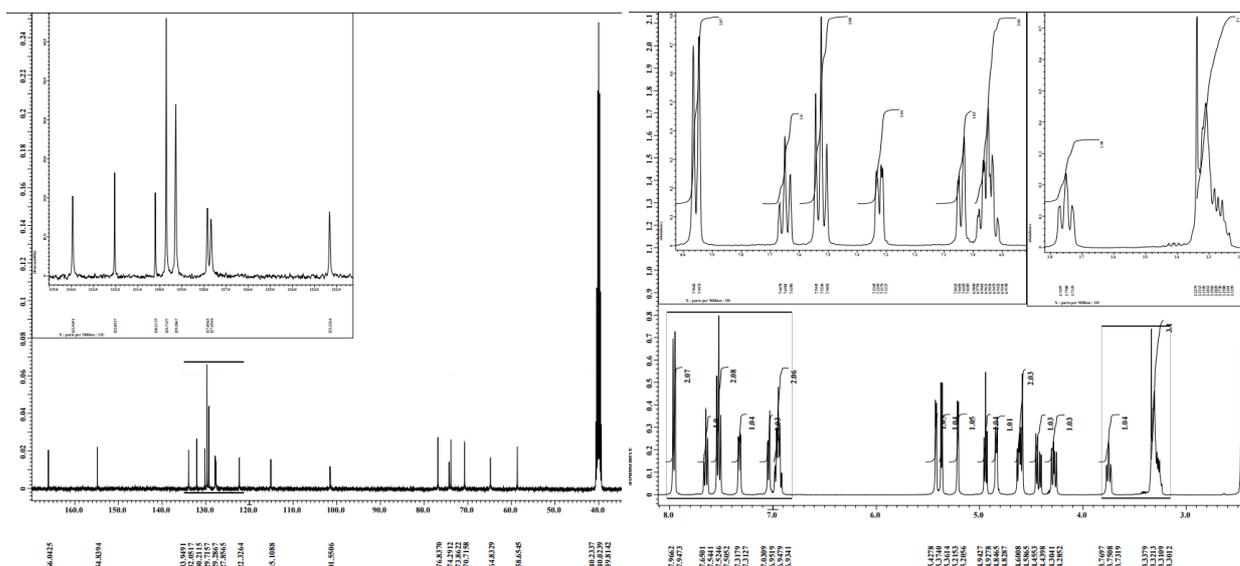
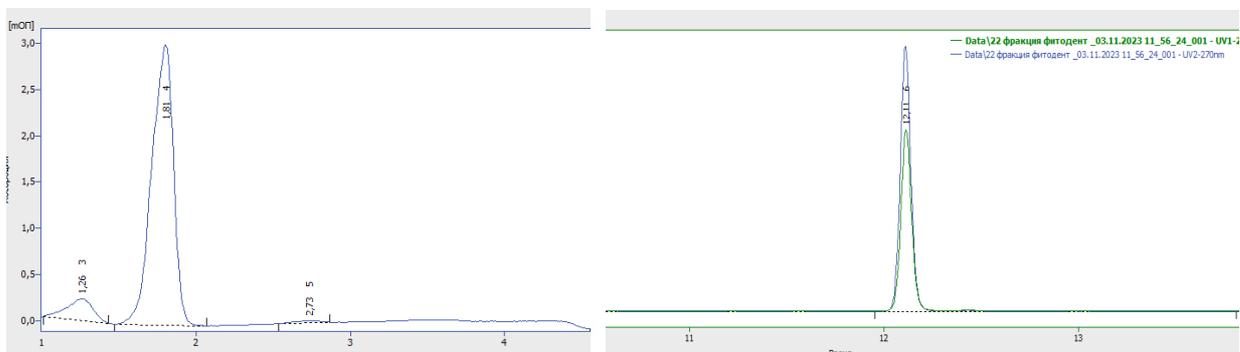


Рисунок 31 - ЯМР  $^{13}\text{C}$  и ЯМР  $^1\text{H}$  вещества, выделенного из коры осины (2)

В УФ-спектре вещества максимум поглощения приходился на  $274 \pm 2$  нм.

Выделенный салицин и популин были проанализированы методом жидкостной хроматографии в условиях подобранных для компонентного анализа гелей. Время удерживание салицина составляет 1,81 мин, популина – 12,1 мин (детекция при длине волны 254 нм) (рис. 32).



А

Б

Рисунок 32 – ВЭЖ-хроматограммы салицина (А) и популина (Б)

На хроматограмме геля с хлорофиллом и корой осины, присутствует пики, совпадающие по времени удерживания пику выделенных индивидуальных веществ. Увеличенные фрагменты хроматограмм спиртового извлечения из геля с хлорофиллом и корой осины представлены ниже (рис. 33).

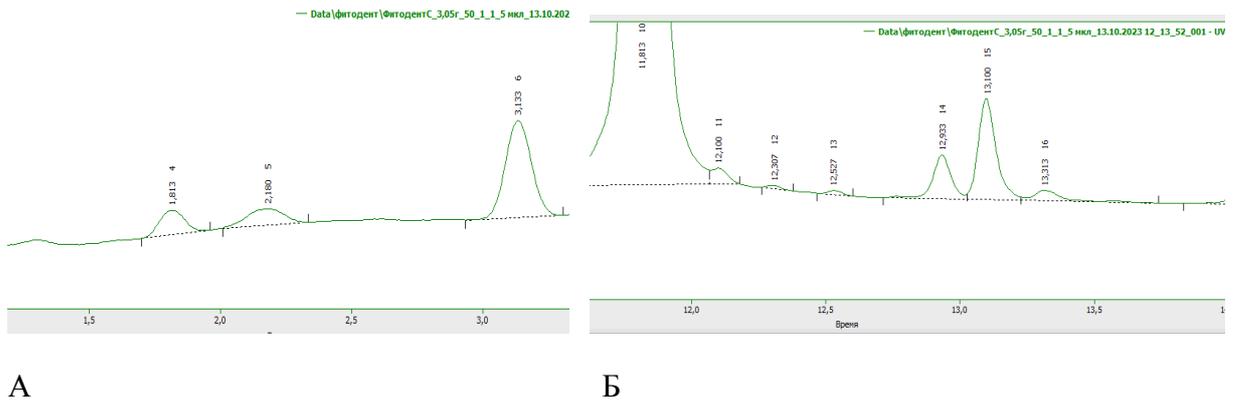


Рисунок 33 – ВЭЖ-хроматограммы салицина (А) и популина (Б)



Рисунок 34 – Процесс хроматографического деления извлечения из экстракта коры осины

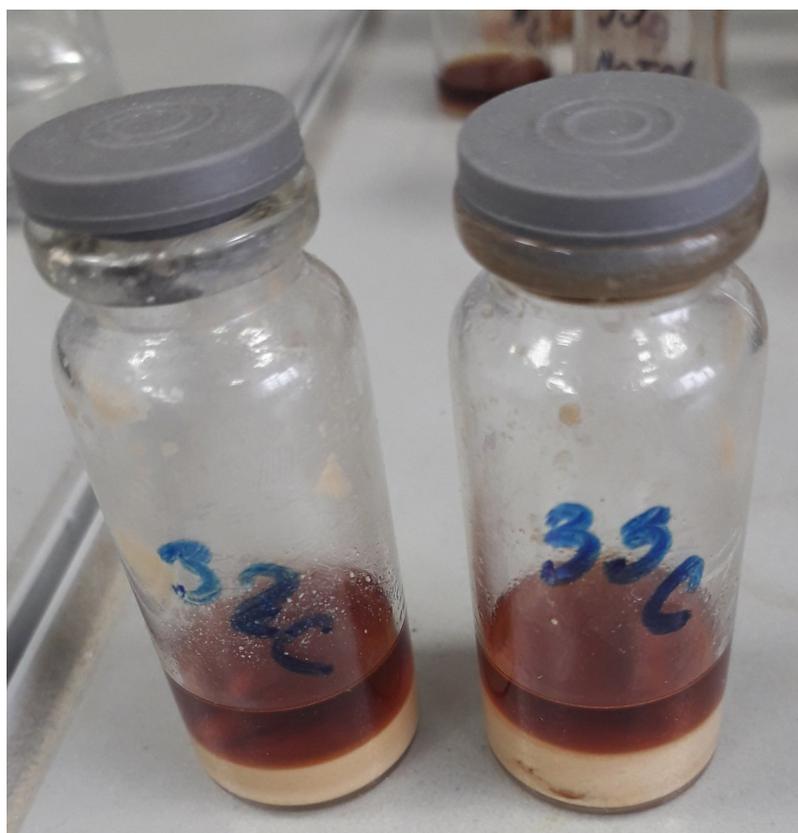


Рисунок 35 — Фракции с салицином (экстракт из коры осины)



Рисунок 36 — Образцы популина (22 фракция) и салицина (35 фракция), выделенные в результате адсорбционной колоночной хроматографии



Рисунок 37 — Образцы популина (20, 22, 23 фракции) и салицина (35 фракция), выделенные в результате адсорбционной колоночной хроматографии

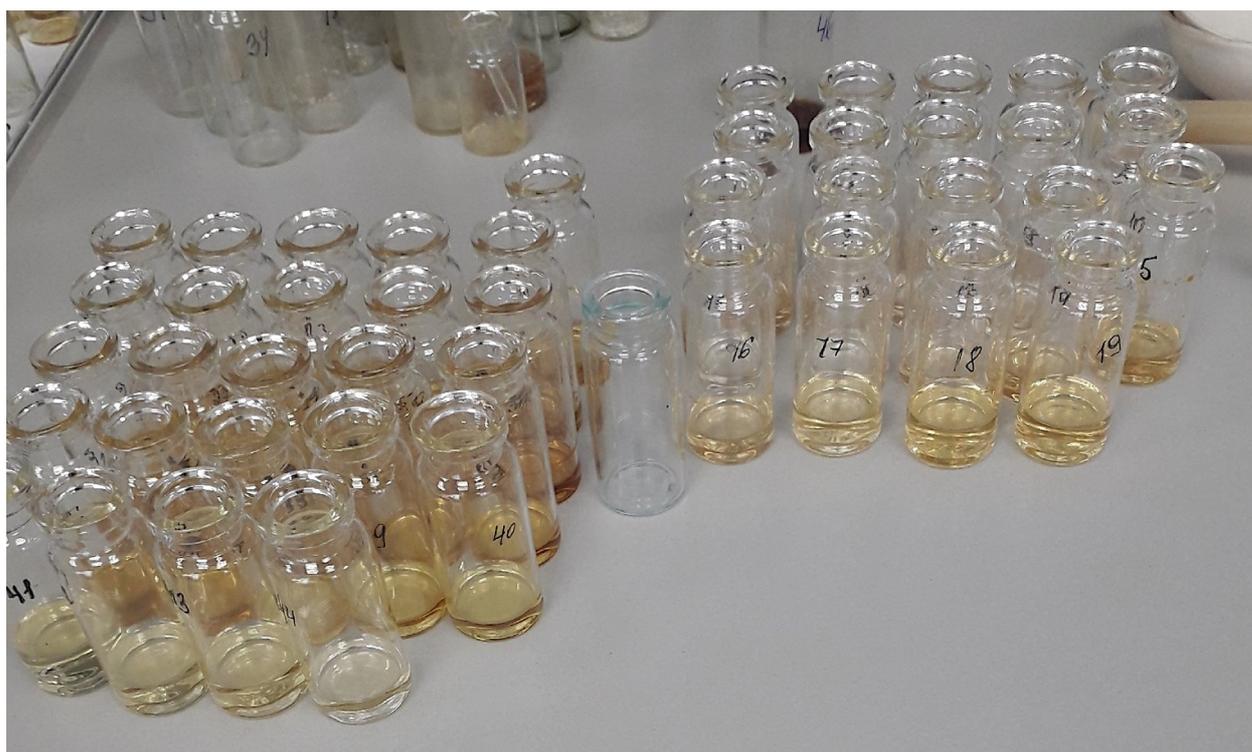


Рисунок 38 — Фракции, полученные в результате хроматографического деления извлечения из экстракта коры осины



Рисунок 39 — Фракции, полученные из экстракта коры осины (элюент – хлороформ)



Рисунок 40 — Фракции, полученные из экстракта коры осины



Рисунок 41 — Фракции, содержащие салицин

**Выводы по главе:**

1. В результате исследований из коры осины были выделены и очищены два индивидуальных вещества, идентифицированные по данным ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , масс-спектрометрия как салицин и популин. Из хвойного экстракта выделен мальтол.
2. С использованием методов высокоэффективной жидкостной колоночной хроматографии и газовой хроматографии идентифицированы кверцетин, мальтол, метилсалицилат, эвгенол, ментол, метилпарабен.
3. В дальнейшем для целей количественного определения метилсалицилата, эвгенола и ментола нами был выбран метод газовой хроматографии с связи с более высокой чувствительностью методики, для количественного определения кверцетина – метод ВЭЖХ.

## 2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭВГЕНОЛА И МЕНТОЛА В ОБРАЗЦАХ ГЕЛЕЙ МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

### 1. Разработка методик количественного определения эвгенола, ментола и метилсалицилата в образцах гелей методом хромато-масс-спектрометрии.

С использованием метода хромато-масс-спектрометрии были разработаны методики количественного определения ментола и эвгенола в исследуемых образцах гелей.

Зависимость площади хроматографического пика от концентрации эвгенола описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,25 до 2,06 мкг/мл (рис. 42), для ментола – в диапазоне от 0,10 до 2,00 мкг/мл (рис. 43), для метилсалицилата – в диапазоне от 0,23 до 2,34 мкг/мл (рис. 44). Для зависимости площади пика от концентрации исследуемых веществ коэффициенты корреляции составили 0,9912, 0,9981 и 0,9963 соответственно. Указанные диапазоны концентраций можно рассматривать как аналитические области методик.

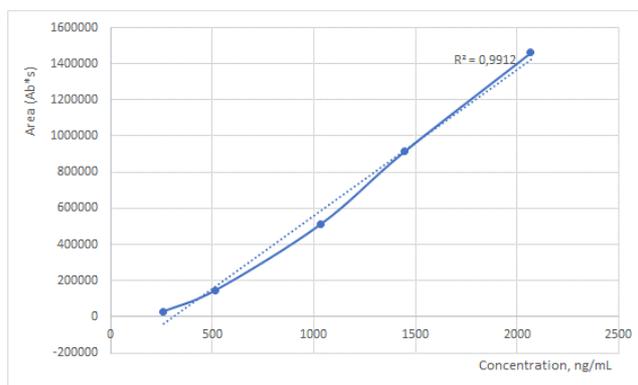


Рисунок 42 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации эвгенола в пробе

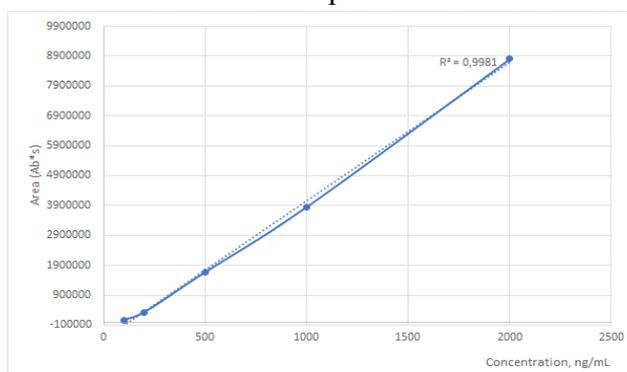


Рисунок 43 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации ментола в пробе

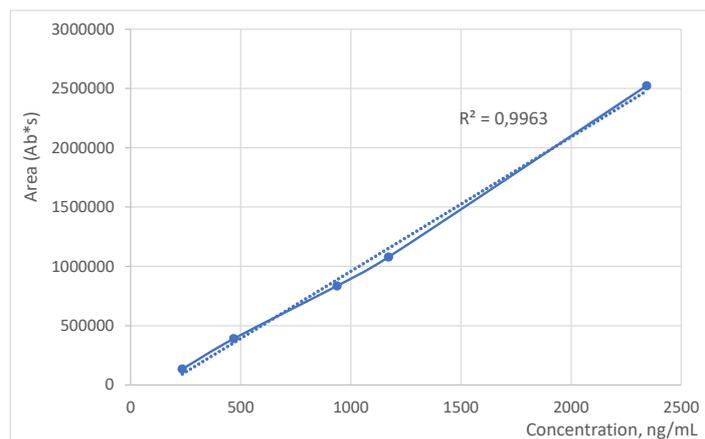


Рисунок 44 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации метилсалицилата в пробе

Метрологические характеристики предлагаемых методик свидетельствуют о том, что ошибка определения среднего результата содержания эвгенола, ментола и метилсалицилата в исследуемых образцах гелей с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 7,02\%$ ,  $\pm 6,74\%$  и  $\pm 7,32\%$  для геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином и  $\pm 7,17\%$ ,  $\pm 7,11\%$  и  $\pm 7,77\%$  для геля с хлорофиллом и хлоргексидином (табл. 4 и 5). Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов эвгенола, ментола и метилсалицилата с известной концентрацией (80 %, 100 % и 120 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления эвгенола и ментола составил соответственно 95,4 %, 96,6 % и 97,3 % для геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином и 94,5 %, 94,7 % и 97,6 % для геля с хлорофиллом и хлоргексидином (табл. 6 и 7). Ошибки определения эвгенола и ментола в пробах с добавками стандартных образцов находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

При оценке внутрिलाбораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения эвгенола и ментола в первый и второй дни анализа находится в диапазоне от 0,91 до 1,1.

Таблица 4 – Метрологические характеристики методики количественного определения эвгенола и ментола в геле «Fitodent PerioGel», гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

| Анализируемое вещество | $f$ | $\bar{X}$ , мг/г | $S$     | $P$ , % | $t(P,f)$ | $\Delta\bar{X}$ | $\bar{\epsilon}$ , % |
|------------------------|-----|------------------|---------|---------|----------|-----------------|----------------------|
| Эвгенол                | 5   | 0,093            | 0,00619 | 95      | 2,57     | $\pm 0,007$     | $\pm 7,02$           |
| Ментол                 | 5   | 0,035            | 0,00225 | 95      | 2,57     | $\pm 0,002$     | $\pm 6,74$           |
| Метилсалицилат         | 5   | 0,108            | 0,00755 | 95      | 2,57     | $\pm 0,008$     | $\pm 7,32$           |

Таблица 5 – Метрологические характеристики методики количественного определения эвгенола и ментола в геле «Fitodent PerioGel», гель с хлорофиллом и хлоргексидином

| Анализируемое вещество | $f$ | $\bar{X}$ , мг/г | $S$     | $P$ , % | $t(P,f)$ | $\Delta\bar{X}$ | $\bar{\epsilon}$ , % |
|------------------------|-----|------------------|---------|---------|----------|-----------------|----------------------|
| Эвгенол                | 5   | 0,085            | 0,00595 | 95      | 2,57     | $\pm 0,006$     | $\pm 7,38$           |
| Ментол                 | 5   | 0,043            | 0,00293 | 95      | 2,57     | $\pm 0,003$     | $\pm 7,11$           |
| Метилсалицилат         | 5   | 0,055            | 0,00404 | 95      | 2,57     | $\pm 0,004$     | $\pm 7,77$           |

Таблица 6 – Результаты определения правильности методики определения эвгенола и ментола в геле «Fitodent PerioGel», гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

| И с х о д н о е содержание, мг/г геля | Добавлено, мг/г геля | Содержание эвгенола, мг/г |           | Ошибка           |                  |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------|-----------|------------------|------------------|
|                                       |                      | Расчетное                 | Найденное | Абсолютная, мг/г | Относительная, % |
| <i>Эвгенол</i>                        |                      |                           |           |                  |                  |
| 0,093                                 | 0,074                | 0,164                     | 0,154     | -0,010           | -6,10            |
| 0,093                                 | 0,093                | 0,186                     | 0,176     | -0,010           | -5,38            |
| 0,093                                 | 0,112                | 0,205                     | 0,200     | -0,005           | -2,44            |
| <i>Ментол</i>                         |                      |                           |           |                  |                  |
| 0,035                                 | 0,028                | 0,063                     | 0,060     | -0,003           | -4,76            |
| 0,035                                 | 0,035                | 0,070                     | 0,069     | -0,001           | -1,43            |
| 0,035                                 | 0,042                | 0,077                     | 0,074     | -0,003           | -3,90            |
| <i>Метилсалицилат</i>                 |                      |                           |           |                  |                  |
| 0,108                                 | 0,086                | 0,194                     | 0,185     | -0,009           | -4,85            |
| 0,108                                 | 0,108                | 0,216                     | 0,219     | +0,003           | +1,20            |
| 0,108                                 | 0,130                | 0,238                     | 0,227     | -0,011           | -4,50            |

Таблица 7 – Результаты определения правильности методики определения эвгенола и ментола в геле «Fitodent PerioGel», гель с хлорофиллом и хлоргексидином

| И с х о д н о е<br>содержание,<br>мг/г геля | Добавлено,<br>мг/г геля | Содержание эвгенола,<br>мг/г |           | Ошибка              |                     |
|---|-------------------------|------------------------------|-----------|---------------------|---------------------|
|   |                         | Расчетное                    | Найденное | Абсолютная,<br>мг/г | Относительная,<br>% |
| <i>Эвгенол</i>                              |                         |                              |           |                     |                     |
| 0,085                                       | 0,068                   | 0,153                        | 0,142     | -0,011              | -7,25               |
| 0,085                                       | 0,085                   | 0,170                        | 0,161     | -0,009              | -5,10               |
| 0,085                                       | 0,102                   | 0,187                        | 0,179     | -0,008              | -4,10               |
| <i>Ментол</i>                               |                         |                              |           |                     |                     |
| 0,043                                       | 0,034                   | 0,077                        | 0,073     | -0,004              | -5,49               |
| 0,043                                       | 0,043                   | 0,086                        | 0,081     | -0,005              | -6,13               |
| 0,043                                       | 0,052                   | 0,095                        | 0,091     | -0,004              | -4,41               |
| <i>Метилсалицилат</i>                       |                         |                              |           |                     |                     |
| 0,055                                       | 0,044                   | 0,099                        | 0,095     | -0,004              | -3,85%              |
| 0,055                                       | 0,055                   | 0,110                        | 0,105     | -0,005              | -4,95%              |
| 0,055                                       | 0,066                   | 0,121                        | 0,123     | +0,002              | +1,50%              |

Содержание эвгенола в образце «Fitodent PerioGel», гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином, составило  $93,0 \pm 6,5$  мкг/г, «Fitodent PerioGel», гель с хлорофиллом и хлоргексидином –  $100,0 \pm 7,0$  мкг/г; ментола –  $35,3 \pm 2,4$  и  $43,0 \pm 3,1$  мкг/г, метилсалицилата –  $0,33 \pm 0,02$  и  $0,23 \pm 0,01$  мг/г соответственно. В качестве норматива можно ввести показатели «Содержание эвгенола должно быть не менее 80,0 мкг/г (0,008%), ментола – не менее 30,0 мкг/г (0,003%), метилсалицилатат – не менее 0,2 мг/г (0,02 %) (при использовании разработанных методик).



Рисунок 45 — Регистрация ГХ-МС хроматограммы хлороформных извлечений из гелей

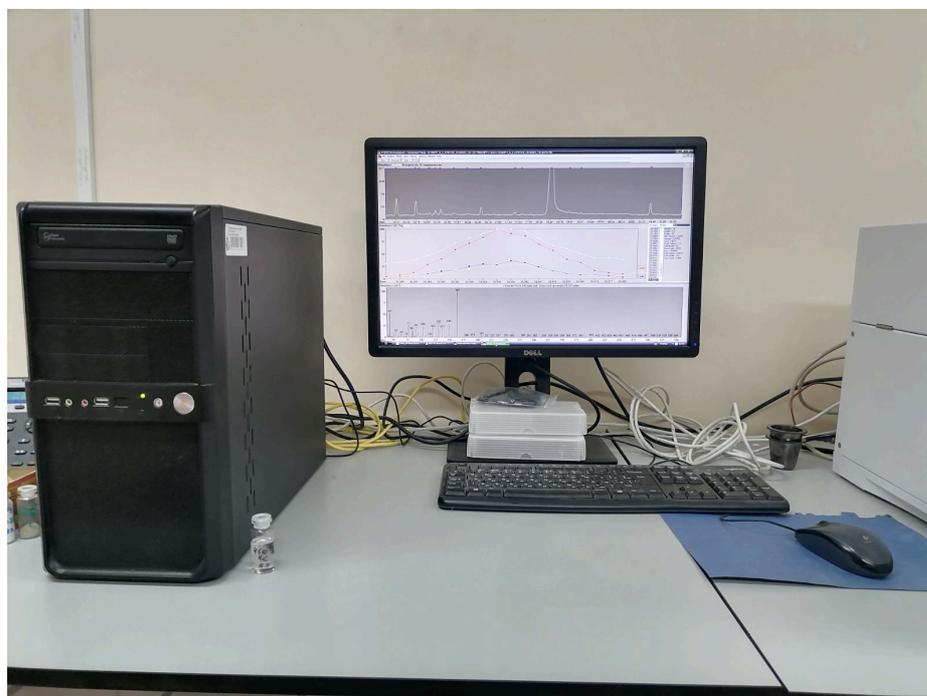


Рисунок 46 — Анализ данных, полученных в результате ГХ-МС анализа

## 2. Разработка методик количественного определения кверцетина в образцах гелей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

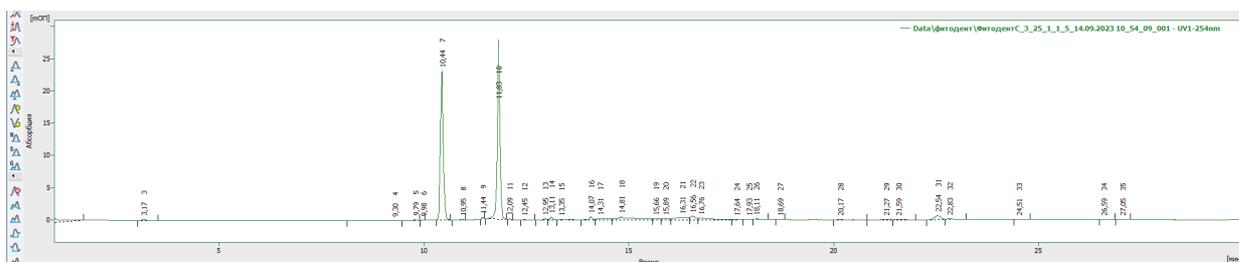
Результаты оценки пригодности системы подтверждают пригодность хроматографической системы для количественного определения кверцетина в исследуемых образцах гелей с детекцией при длине волны 254 и 350 нм (табл. 8).

Таблица 8 – Оценка пригодности хроматографической системы (по кверцетину)

| Параметр хроматографической колонки       | Значение (детекция при 254 нм) | Значение (детекция при 350 нм) | Н о р м а т и в н ы й 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  $11,83 \pm 0,05$  мин (рис. 47).



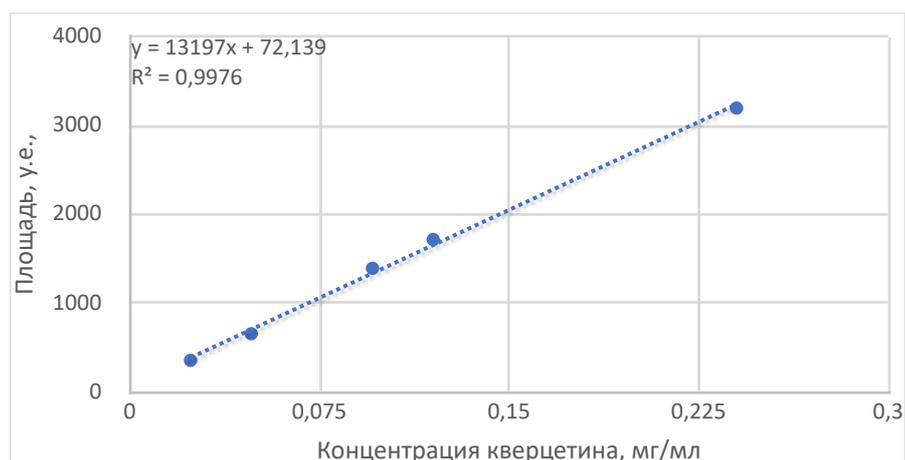


Рисунок 48 – Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации кверцетина в пробе

Открываемость кверцетина составила в среднем 98,0 %, 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 кверцетина: относительная ошибка среднего результата определения содержания флавоноида с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 2,44\%$  (табл. 10). 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 9 – 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, % |
| 2,793                     | 2,234           | 5,027            | 5,102     | +0,075         | +1,49%           |
| 2,793                     | 2,793           | 5,586            | 5,608     | +0,022         | +0,39%           |
| 2,793                     | 3,352           | 6,145            | 6,024     | -0,121         | -1,97%           |

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определения кверцетина в геле с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

| $f$ | $\bar{X}$ , | $S$    | $P, \%$ | $t(P,f)$ | $\Delta\bar{X}$ | $\bar{\epsilon}, \%$ |
|-----|-------------|--------|---------|----------|-----------------|----------------------|
| 10  | 2,7945      | 0,1016 | 95      | 2,23     | $\pm 0,0683$    | $\pm 2,44$           |

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;  $\bar{\epsilon}$  – относительная ошибка среднего результата.

С использованием этой методики было проанализировано содержание кверцетина в образце геля «Fitodent PerioGel», которое составило  $2,79 \pm 0,07$  мг/г геля. Соответственно, можно рекомендовать нижний предел содержания не менее 2,5 мг/г.

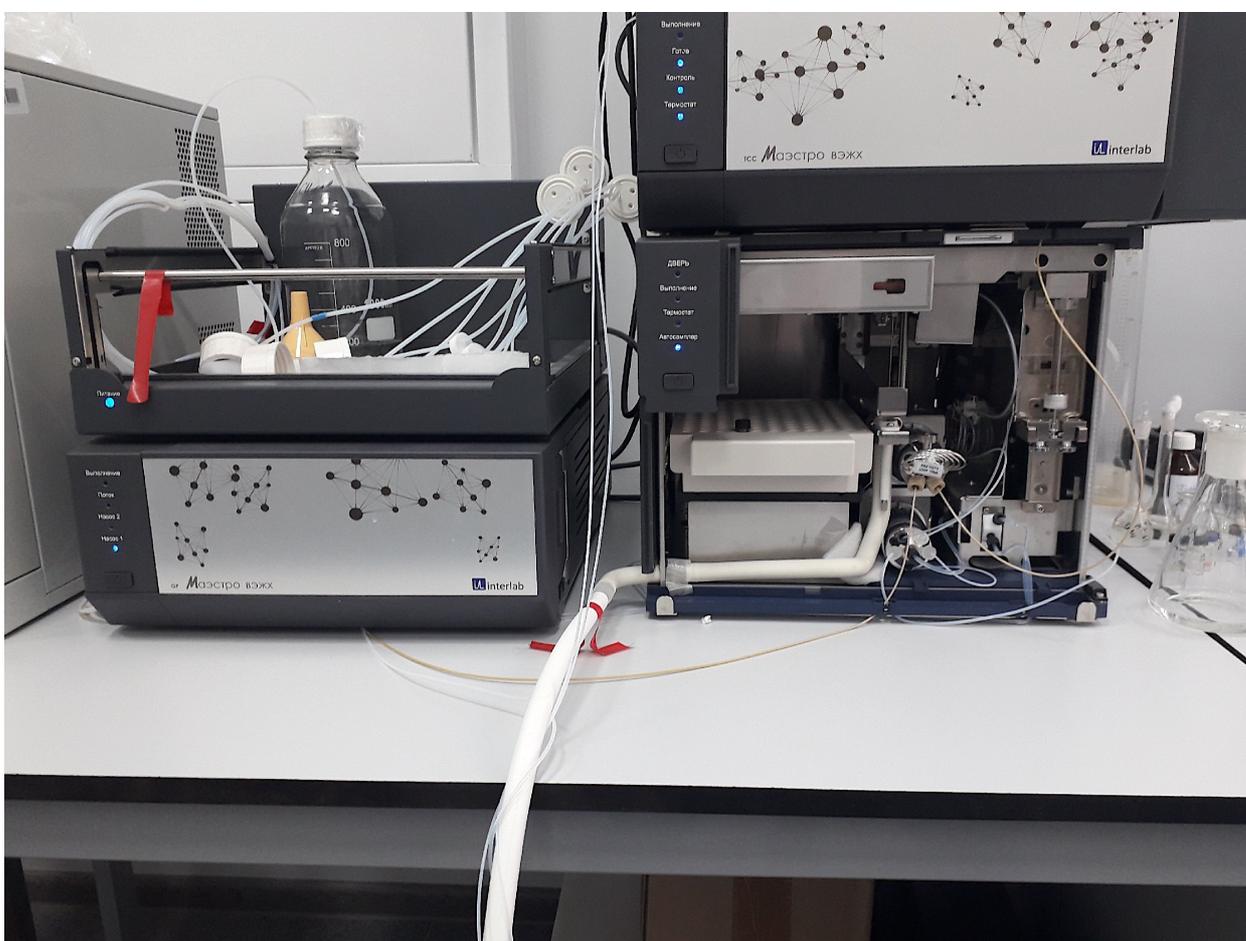


Рисунок 49 – Жидкостный хроматограф ВЭЖХ «МАЭСТРО» (насос и автосемплер)

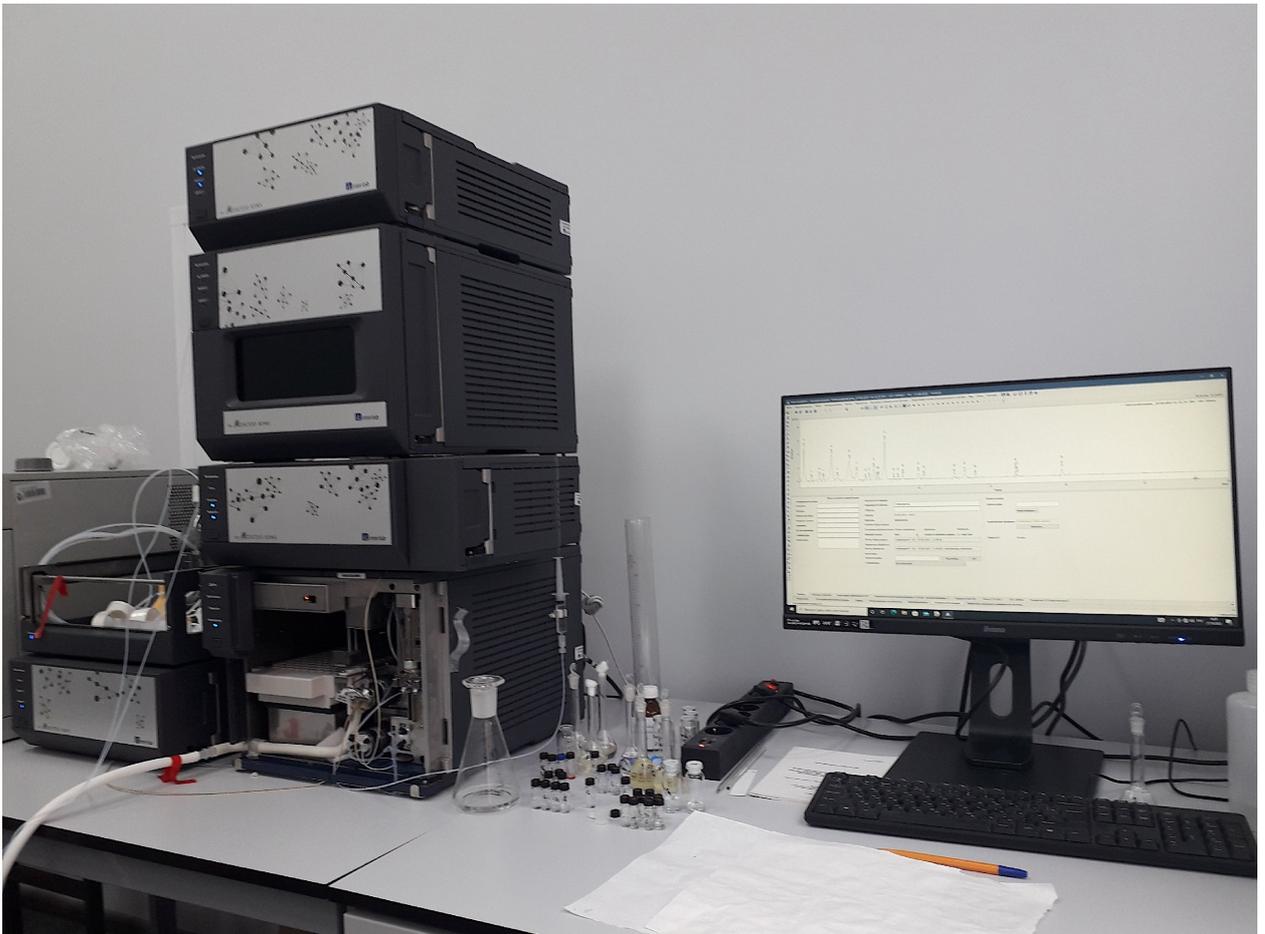


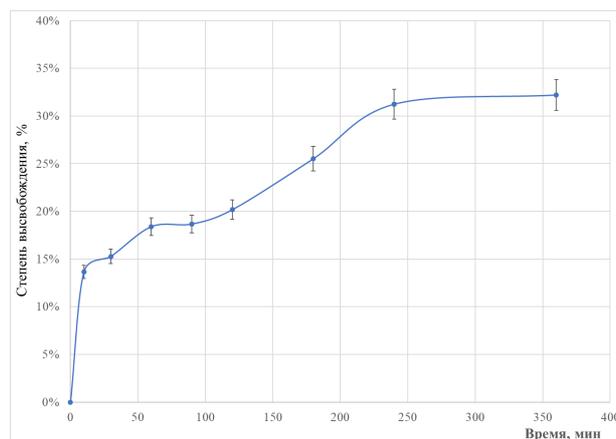
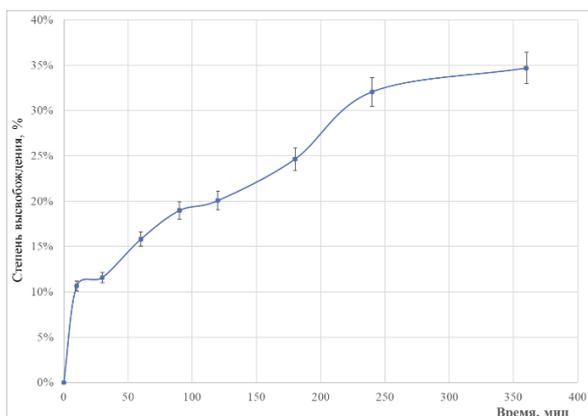
Рисунок 50 – Процедура проведения анализа методом ВЭЖХ извлечений из гелей

### **Выводы по главе**

1. Разработаны и валидированы методики количественного определения ментола, эвгенола, метилсалицилата методом газовой хроматографии и кверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
2. Продемонстрированы удовлетворительные метрологические характеристики методик (по показателям правильности, прецизионности, специфичности).
3. Рекомендованы нижние пределы содержания для проанализированных действующих веществ.

### 3. ОЦЕНКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ГЕЛЕЙ

Оценка степени высвобождения действующих компонентов геля показало, что в среднем для эвгенола в течение 6 часов значение составило  $34,7 \pm 4,5$  % для геля с хлорофиллом и хлоргексидином и  $32,2 \pm 4,3$  % для геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином (рис. 51). Для эвгенола достижения равновесного состояния наблюдалось с 240 мин (4 ч).

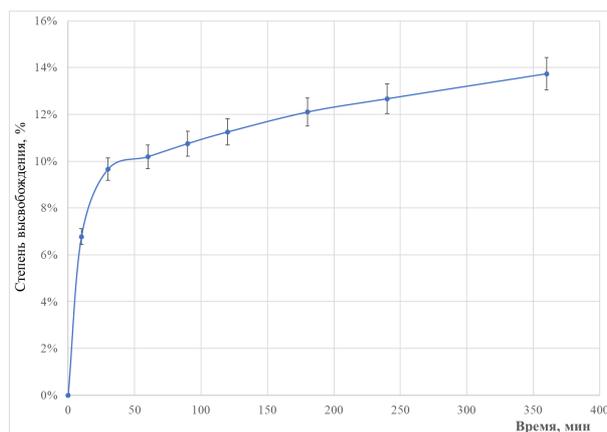
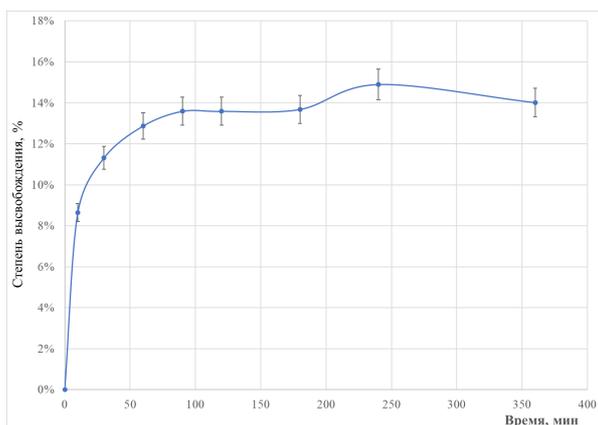


А. Гель с хлорофиллом и хлоргексидином

В. Гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

Рисунок 51 - Степень высвобождения эвгенола.

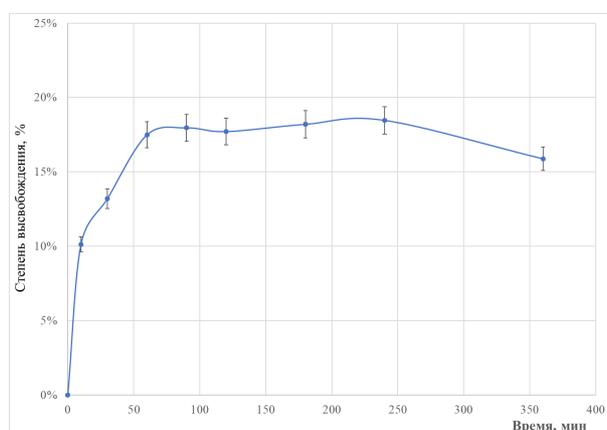
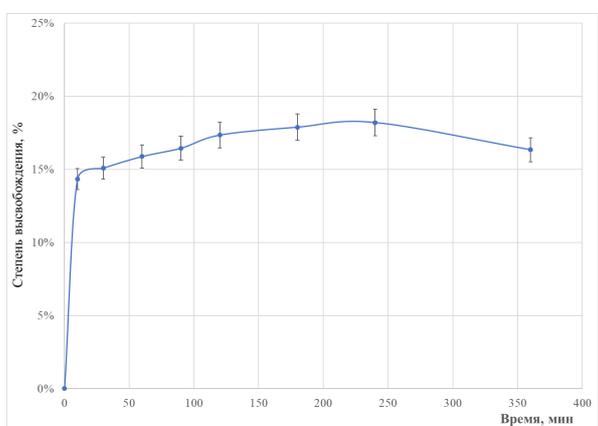
Степень высвобождения ментола за 6 ч составила  $14,0 \pm 0,5$  % для геля с хлорофиллом и хлоргексидином и  $13,7 \pm 1,3$  % для геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином (рис. 52). Для метилсалицилата соответствующие значения составили  $16,4 \pm 3,0$  % и  $15,9 \pm 2,3$  % (рис. 53). Высвобождение ментола достигало равновесного состояния к 180 мин (3 часа), метилсалицилата – к 30 мин (для геля с хлорофиллом и хлоргексидином) и к 60 мин (для геля с хлорофиллом, корой осины и кверцетином).



А. Гель с хлорофиллом и хлоргексидином

В. Гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

Рисунок 52 - Степень высвобождения ментола



А. Гель с хлорофиллом и хлоргексидином

В. Гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином

Рисунок 53 - Степень высвобождения метилсалицилата

Степень высвобождения кверцетина из геля была незначительной и составляла 0,01-0,03% в течение 6 часов проведения диализа через полупроницаемую мембрану (рис. 54). Низкое значение, по-видимому, обусловлено введением кверцетина в состав геля в сухом виде или в виде суспензии (не истинного раствора). Ранее уже отмечалась низкая степень высвобождения веществ из мягких лекарственных форм при подобном введении (порошок или суспензия) [2, 11].

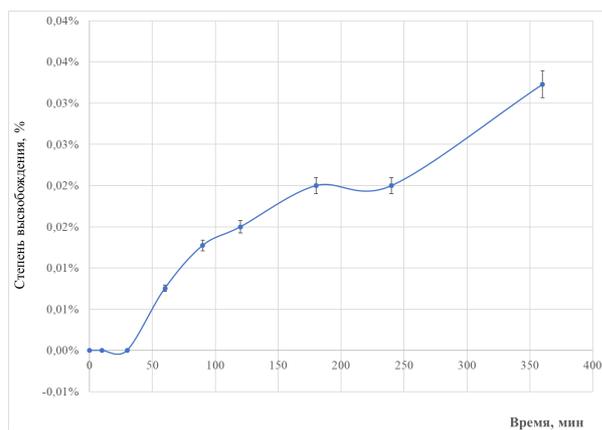


Рисунок 54 - Степень высвобождения кверцетина

### Выводы по главе

1. Проанализировано высвобождение ментола, метилсалицилата, эвгенола и кверцетина из исследуемых образцов гелей.

2. Степень высвобождения ментола, метилсалицилата и эвгенола составляла от 14 до 37%; для кверцетина соответствующее значение составило 0,03%, что, возможно, обусловлено введением флавоноида в состав геля в виде суспензии и его низкой растворимостью в воде.

## **Заключение**

Таким образом, инициировано исследование компонентного состава субстанций, используемых для получения «Fitodent Periogel», гель с хлорофиллом, корой осины и кверцетином, «Fitodent Periogel», гель с хлорофиллом и хлоргексидином. Из экстракта осины выделены салицин и популин, из хвойного экстракта – мальтол, которые были идентифицированы по данным ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , ИК-спектроскопии.

Предложены методики качественного анализа исследуемых гелей методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии.

Разработаны и валидированы методики количественного определения ментола, метилсалицилата и эвгенола методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором и кверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Продемонстрированы удовлетворительные метрологические характеристики разработанных методик.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бычкова, Н.К. Противоописторхозные свойства экстракта коры осины: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Томск, 1990. - 27 с.
2. Голяк, Н.С. Высвобождение пропранолола *in vitro* из мягких лекарственных форм / Н.С. Голяк, Н.Н. Шантар // Биохимические исследования в медицине, Минск, 6 октября 2023 г. – С. 60-64.
3. Дубищев, А.В. Механизм защитного действия тремулоидина при остром поражении нефрона гентамицином/А.В. Дубищев, М.Н. Кодакова// Казанский медицинский журнал. - Казань, 2009. - Т.90, № 6. - С. 862-865.
4. Зуева, Е.П., Турецкова, В.Ф., Крулова, С.Г. Экорсин – новое противоязвенное средство растительного происхождения // Экспериментальная и клиническая фармакотерапия язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Создание новых гемостимуляторов. Томск, 1996. - С. 25 - 26.
5. Кодакова, М.Н. Сравнительная оценка фармакологического эффекта растительных препаратов семейства ивовых / М.Н. Кодакова, А.В. Дубищев // Медицинский вестник Башкортостана, 2009. - С.193-196.
6. Кодакова, М.Н. Фармакологический эффект различных лекарственных форм осины / М.Н. Кодакова, А.В. Дубищев // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Материалы IV международной конференции 7-8 апреля 2006 г. Часть 2 - Фармакологический фундамент современной медицины, проблемы фармации и пути их решения. - Минск, 2006. - С.110-112.
7. Крылова, С.Г., Турецкова, В.Ф., Макарова, О.Г., Ефимова, Л.А., Зуева, Е.П., Рыбалкина, О.Ю. Сравнительное исследование противоязвенной активности экстракта коры осины сухого в различных лекарственных формах // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2015. - № 2. - С. 18 - 21.
8. 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.
9. 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.

10. Лобанова, И.Ю., Турецкова, В.Ф. Выделение и изучение состава флавоноидов листьев осины обыкновенной // Химия растительного сырья. - 2011. - №2. - С. 117-122.

11. Ляпунов, А.Н. Исследование высвобождения мелоксикама из мягких лекарственных средств в опытах *in vitro* методом диализа через полупроницаемую мембрану / А.Н. Ляпунов, Е.П. Безуглая, Н.А. Ляпунов // Фармаком. – 2016. - № 2. – С. 33-42.

12. 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.

13. 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

14. 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.

15. Рассыпнова, С.С., Турецкова, В.Ф., Зверев, Я.Ф. Изучение противовоспалительного действия экстракта из коры *Populus tremula* (Salicaceae) и входящих в его состав фенольных соединений // Растительные ресурсы. - 2010. - Т. 46, вып. 3. - С. 103 - 108.

16. 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

17.Руда, О.Р. Эффективность применения эвгенола в стоматологии / О.Р. Руда // От растения до лекарственного препарата, ФГБНУ ВИЛАР. – Москва, 2020. – С. 404-410. DOI: 10.52101/9785870191027\_2021\_485.

18.Степанова, А.А., Белянин, М.Л. Сравнение химического состава листьев и коры тополя черного и осины обыкновенной методом ГХ-МС // В сборнике: Химия и химическая технология в XXI веке Материалы XIX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых. Томский политехнический университет. - 2018. - С. 235-236.

19.Стоматологический гель : заявление на патент на изобретение 2022117571/04(036967) Рос. Федерация : МПК А61К 31/155, А61К 31/16, А61К 31/555, А61К 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.

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

21.Турецкова, В.Ф., Лобанова, И.Ю., Рассыпнова, С.С., Талыкова, Н.М. Осина обыкновенная как перспективный источник получения препаратов противоязвенного и противовоспалительного действия // Бюллетень сибирской медицины. - 2011. - №5. - С. 106 - 111.

22.Фаустова Н.М. Химический состав коры и древесины осины *Populus tremula* L. : дисс. ... канд. хим. наук. Санкт-Петербург, 2005.

23. 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.

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

25. 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.

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

27. Didehdar, M. Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida* species infection / M. Didehdar, Z. Chegini, A. Shariati // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – Article No. 872127. DOI: 10.3389/fphar.2022.872127.
28. Gurram S, Shah D, Jha DK, Amin P. Determination of Microstructural Impact on the Release of Drug from Hydroxypropyl Cellulose Gel by Validated In Vitro Release Test Method. *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2021 Nov 10;19.
29. 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.
30. Hoang, D. Looking Back to Move Forward: The Current State of Research on the Clinical Applications of Camphor- and Menthol-Containing Agents / D. Hoang, A. Wong, R.P. Olympia // *Cureus.* – 2023. – Vol. 15, No. 7. – Article No. e41426. DOI 10.7759/cureus.41426.
31. 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.
32. Kamatou, G. P.P. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties / G.P.P. Kamatou , I. Vermaak, A. M. Viljoen, B. M. Lawrence // *Phytochemistry.* – 2013. – Vol. 96. – P. 15-25.
33. Keith AD. Chlorhexidine complex [Internet]. US4980150A, 1990 [cited 2023 Nov 9]. Available from: <https://patents.google.com/patent/US4980150A/en>.
34. Koc, F. The effects of chrysin on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats / F. Kos, M. Y. Tekeli, M. Kanbur, M. Ö Karayigit, B. C. Liman // *Journal of Food Biochemistry.* – 2020. - Vol. 44, No. 9. – Article ID e13359.
35. Liu, Y. Menthol facilitates the skin analgesic effect of tetracaine gel / Y. Liu, X. Ye, X. Feng, G.Zhou , Z. Rong, , C. Fang, , H. Chen // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2005. – Vol. 305, Issue 1-2. – P. 31-36.
36. Mak, K.K. A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry / K.K. Mak, M.B. Kamal, S.B. Ayuba, R. Sakirolla, Y.B. Kang, K. Mohandas et al. // *Phcog Rev.* – 2019. – Vol. 13. – P. 1-9.

37. Mahdi, J. Pharmacological Importance of Simple Phenolic Compounds on Inflammation, Cell Proliferation and Apoptosis with a Special Reference to  $\beta$ -D-Salicin and Hydroxybenzoic Acid / J. Mahdi, N. Al-Musayeib, E. Mahdi, C. Pepper // *European Journal of Inflammation*. – 2013. – Vol. 11, No. 2. – P. 327-336. doi:10.1177/1721727X1301100202
38. Methyl salicylate [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09543>
39. 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
40. Nisar, M. F. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review / M.F. Nisar, M. Khadim, M. Rafiq, J. Chen, Y. Yang, C.C. Wan // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2021. – Vol. 2021. – Article No. 2497354. DOI:10.1155/2021/2497354.
41. Onnainty, R. Complex formation of chlorhexidine gluconate with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ((<sup>1</sup>H NMR) / R. Onnainty, M.R. Longhi, G.E. Granero // *Carbohydr Res.* – 2011. – Vol. 346, N. 8. – P. 1037-1046. doi:10.1016/j.carres.2011.03.028
42. Pattananandecha, T, Pharmaceutical Incompatibility of Lubricating Gel Formulation Reduces Antibacterial Activity of Chlorhexidine Gluconate: In Vitro Study in Northern Thailand / T. Pattananandecha, S. Sirilun, S. Apichai, T. Ouirungroj, P. Uirungroj, F. Ogata, N. Kawasaki, C. Saenjum // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19, N. 19. – P. 12285. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912285>
43. Pearl I. Communications. Studies on the Barks of the Family Salicaceae. II. Salireposide from the Bark of *Populus tremuloides* / I. Pearl, S. Darling // *J. Org. Chem.* – 1959. – Vol. 24, No. 10. – P. 1616. <https://doi.org/10.1021/jo01092a045>
44. SALONPAS® Pain Relief Patch (Arthritis Pain Patch) (10% methyl salicylate and 3% Lmenthol) – Efficacy Supplement for PREA PMR. NDA 22-029/ S-012. Clinical Review. Available from: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/N22-029S012-Methyl-salicylate-Clinical-2-PREA.pdf>
45. St-Pierre, A. Phytochemical Screening of Quaking Aspen (*Populus tremuloides*) Extracts by UPLC-QTOF-MS and Evaluation of their Antimicrobial Activity / A. St-Pierre,

Dorian B., A. Lajeunesse, J. Bley, N. Bourdeau, I. Desgagné-Penix // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, No. 7. – P. 1739.

46. Vitková Z. Influence of the kind of polymer on chlorhexidine liberation from hydrogel / Z. Vitková, M. Žabka, P. Herdová // *Čes. slov. Farm.* – 2010. – Vol. 59. – P. 123-126.

47. Yano, T. Effects of 1-Menthol and dl-Camphor on the Penetration and Hydrolysis of Methyl Salicylate in Hairless Mouse Skin(Article) / T. Yano, T. Kanetake, M. Saita, K. Noda, T. Kanetade, K. Noda // *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. – 1991. – Vol. 14, Issue 12. – P. 663-669.