

ВОРОБЬЕВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФИТОПРЕПАРАТА БЕТУЛИНА И
ТИМОЛА НА ОСНОВЕ МАСЛА СЕМЯН ТЫКВЫ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2016

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор **Мельникова Нина Борисовна**

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармации факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, заведующий кафедрой;

Новиков Олег Олегович – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь.

Защита состоится «03» июня 2016 г. в ____ .00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Лекарственные средства (ЛС) наружного применения крайне важны при лечении различных кожных заболеваний, в том числе атопического дерматита, дерматозов различной этиологии, псориаза, а также при лечении ожоговых ран на второй стадии раневого процесса.

Базовая терапия дерматозов представлена группой эффективных глюкокортикостероидных препаратов в виде мазей, кремов, лосьонов [Н.Г.Кочергин, 2012], а при заживлении ожогов традиционно используются мягкие лекарственные формы метаболитов широкого спектра действия с выраженным репаративным эффектом [О.В.Чичков, 2012; И.П. Назаров, 1994].

Наряду с высокой клинической эффективностью глюкокортикостероидные препараты имеют ряд серьезных побочных эффектов, что делает невозможным их длительное применение. В связи с этим актуальным становится вопрос поиска соединений – аналогов глюкокортикостероидов по силе эффекта, но имеющих сниженный риск развития нежелательных реакций.

Ряд кожных заболеваний сопровождается травмированностью кожного покрова (язвочки, ранки), требующей введения компонентов репаративного действия. Одним из механизмов улучшения репаративного эффекта является антиоксидантное действие компонентов наружного средства. В целом можно отметить общность механизма противовоспалительного действия ЛС дерматологического назначения и ЛС для лечения ожогов. На фармацевтическом рынке ощущается недостаток наружных средств лечения ожогов с использованием репаративных с сильными антиоксидантными свойствами. Поиск отечественных ЛС, проявляющих мягкое репаративное действие с минимальными побочными эффектами также является актуальным.

Бетулин – тритерпеновый спирт, содержащийся в коре березы повислой (*Betula pendula*), хорошо зарекомендовал себя как вещество с противоаллергическими, противовоспалительными, репаративными свойствами при наружном применении [А.Н. Кислицын, 1994].

Природное лекарственное сырье, в том числе масла, и биологически активные вещества (БАВ), выделенные из сырья и проявляющие антиоксидантное действие, представляют особый интерес для лечения кожных заболеваний. Природные масла являются важными компонентами в составах наружных ЛС. Так, например, доступное для России масло семян тыквы (МСТ), содержит комплекс каротиноидов, токолов, фитостеролов в высокой концентрации, большое содержание ненасыщенных жирных кислот [G.O. Fruhwirth, 2007], обладает сильным противовоспалительным действием [G.W. Burton, 2014].

Степень разработанности темы.

В последнее время в литературе появились данные об антиоксидантном эффекте бетулина при наружном использовании [Д.В.Сергеев, 2011; S. Alakurtti, 2013]. Учитывая тот факт, что концентрация бетулина в коре достаточно высока и в настоящее время разработаны эффективные технологии его извлечения из природного сырья, бетулин можно отнести к перспективным компонентам новых ЛС [А.Н. Кислицын, 1994].

Количественное определение ингредиентов многокомпонентных масел является крайне трудной аналитической задачей, поскольку наиболее важные БАВ быстро окисляются, их количественное определение сопряжено со значительными сложностями. Для растительных масел, таких как масло семян тыквы (МСТ), основную трудность представляет пробоподготовка, которую обычно осуществляют омылением водными или спиртовыми растворами щелочей. В процессе омыления в жестких условиях (высокая температура смеси в течение продолжительного времени) возможны не только окисление, но и деструкция ценных БАВ, вследствие чего требуется защита компонентов от нежелательных процессов. В международном протоколе анализа Cugent Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001 для жирных масел в качестве такой защиты используется аскорбиновая кислота. Однако, в случае анализа ряда масел, в том числе МСТ, введение аскорбиновой кислоты не позволяет обеспечить стабильность композиции. С другой стороны, количественное определение компонентов (более 20 в МСТ), несмотря на многочисленные публикации также являются нерешенной задачей, и в настоящее время отсутствуют унифицированные методики анализа наиболее ценных компонентов в МСТ [С. Azevedo-Meleiro, 2007; G.O. Fruhwirth, 2007; M. Kreck, 2006; J. Whitaker, 2001].

Целью настоящей работы является исследование свойств фитокомпозиции бетулина и тимола в масле семян тыквы и создание фитопрепарата наружного действия на ее основе.

В работе решали следующие **задачи**:

- 1) обоснование и разработка состава противовоспалительного фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы (МСТ) наружного действия; прогнозирование взаимодействия бетулина с многослойными липидными структурами кожи;
- 2) разработка методик количественного определения каротиноидов в масле семян тыквы и в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ;
- 3) изучение жирнокислотного состава МСТ для входного контроля качества;
- 4) разработка методик анализа суммы токолов, β -ситостерола, бетулина и тимола в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ;

5) оценка валидационных показателей методик количественного определения бетулина, каротиноидов, токолов и ситостерола в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ;

6) разработка методов контроля качества фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы и проекта фармакопейной статьи;

7) изучение противовоспалительного и ранозаживляющего действия фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы.

Научная новизна.

- Впервые экспериментально обосновано совместное действие комплекса бетулина и тимола в среде масла семян тыквы *Cucurbita Pepo*, обуславливающее повышение биодоступности, стабильности и противовоспалительного действия компонентов фитопрепарата.

- Впервые разработан состав фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ, эффективность которого доказана на модели острого воспаления ксилол-индуцированного отека у мышей.

- Усовершенствованы методики количественного определения основных компонентов МСТ и бетулина.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования.

Обоснован состав противовоспалительного фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы (МСТ). Проведен анализ жирнокислотного состава масла семян тыквы *Cucurbita Pepo*. Изучено противовоспалительное действие фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ и ранозаживляющее действие крема на основе суспензии бетулина в масле семян тыквы. Проведена валидационная оценка методик количественного определения бетулина, каротиноидов, токолов и β -ситостерола в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ. Разработан проект фармакопейной статьи на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы. Разработанные методики анализа компонентов противовоспалительного фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, государственном бюджетном образовательном учреждении среднего профессионального образования Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж», в системе контроля качества препаратов государственным автономным учреждением здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств».

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по фармакологической эффективности отечественных растительных субстанций –

бетулина, тимола, масла семян тыквы, методикам их анализа, а также получению комплексных дерматологических препаратов на их основе, оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; выбраны объекты исследования и подобран комплекс современных методов исследования.

Объектами исследования стали бетулин, тимол, масло семян тыквы. В процессе исследования использованы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, электронной и инфракрасной спектроскопии, атомно-силовой микроскопии, биохемилюминесценции. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе природных и синтетических веществ».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия по нескольким областям исследований.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты по обоснованию состава противовоспалительного фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы (МСТ) и по прогнозированию взаимодействия бетулина с многослойными липидными структурами кожи на биомиметической модели лецитиновой мембраны.
2. Методика количественного определения каротиноидов в масле семян тыквы *Cucurbita Pepo* и в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ.
3. Методики количественного определения методом ОФ-ВЭЖ-хроматографии: 1) суммы токолов (токоферолов и токотриенолов); 2) β -ситостерола; 3) бетулина в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ.
4. Результаты анализа жирнокислотного состава масла семян тыквы *Cucurbita Pepo*.
5. Результаты валидационной оценки методик количественного определения бетулина, каротиноидов, токолов и β -ситостерола в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ.
6. Проект фармакопейной статьи на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы.

7. Результаты исследований противовоспалительного действия фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ и ранозаживляющего действия крема на основе суспензии бетулина в масле семян тыквы.

Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на XI научной сессии молодых учёных и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (г. Нижний Новгород, 2012); I Всероссийской XII ежегодной научной сессии молодых учёных и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (г. Нижний Новгород, 2013); II Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (г. Белгород, 2014); II Всероссийской с международным участием XIII научной сессии молодых учёных и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (г. Нижний Новгород, 2015); VIII Международной научно-практической конференции «Приоритетные направления развития науки и образования». (г. Чебоксары, 2016); XXIV Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (г. Новосибирск, 2016); III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины в современных условиях» (г. Санкт-Петербург, 2016).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 9 научных работах; из них 4 статьи в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Личный вклад автора. Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ, а также крема на ее основе. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на предложенный состав фитопрепарата.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, трех глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 144 наименования отечественных и зарубежных авторов и приложений. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц, 32 рисунка, 2 схемы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика объектов и методов исследования

Материалы и реактивы: (\pm) α -Токоферол (Supelco, 47783); рац- β -Токоферол (50 мг/мл в гексане, Supelco, 46401-U); γ -Токоферол (Supelco, 47785); δ -Токоферол (Supelco, 47784); β -Каротин (Sigma, 22040); β -Ситостерол 95%; Масло семян тыквы (ФСП 42-8110-06); Бетулин 98% (Sigma, 473-98-3); Бетулин субстанция; Тимол марки х.ч. (ТУ 6-09-3736-79); ацетонитрил для хроматографии сорт 0 (ТУ 2636-040-44493179-00); гидроксид калия марки х.ч. (ГОСТ 24363-80); азот; оксид магния марки х.ч. (ГОСТ 4526-75); аскорбиновая кислота марки х.ч. (ГОСТ 4815-76); этанол марки о.с.ч.; гексан марки х.ч.; метанол марки о.с.ч.; дихлорметан марки о.с.ч.; вода очищенная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды «Elix 3» с картриджем Progard («Millipore», France), удельное сопротивление менее 0,2 μ См.

Методы исследования и приборы: Электронные спектры поглощения были получены на приборе «Bioline Specord S-100» (Analytik Jena, Germany); ИК-спектры были сняты на ИК-спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan) (табл. КВг); ВЭЖ-хроматограммы были получены на ВЭЖ-хроматографе «LC-20Avr» (Shimadzu, Japan) в обращенно-фазовом режиме с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки и диодно-матричным детектором, колонка Discovery C18 (25 см x 4.6 mm, 5 μ m, Supelco); микрометр цифровой МКЦ 50-75 кл.1 Калиброн; весы аналитические MS104S Analytical Balance; биохемиллюминометр марки БХЛ-06 (Н.Новгород); аппаратно – программный комплекс «ЛАКК-М-2» (НПП «Лазма», Москва), Хроматограф GCMS Shimadzu QP-2010 Plus с колонкой Restek Rt®-2560, гомогенизатор HG-15D-Set-B цифровой, ротор 25 мм; сублимационная установка FD-100; коллоидная мельница шарового типа МВМ-100, термошкаф лабораторный ТЛ-120.

Анализ каротиноидов. Измеряли оптическую плотность (А) стандартных растворов МСТ или фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ и испытуемого раствора трижды (гексан – раствор сравнения).

Суммарное содержание каротиноидов (в мг) на 100 г фитопрепарата (мг%) рассчитывали по формуле:

$$m, \text{ мг}\% = \frac{(A_{\text{набл.}} - b) \cdot V(\text{мл})}{E_{1\text{см}}^{1\%}} \cdot C^o (\text{мг} / \text{мл}) \quad (1),$$

где $A_{\text{набл.}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора фитопрепарата в гексане; b – поправка оптической плотности по отношению к базовой линии; V – анализируемый объем раствора, мл; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный коэффициент экстинкции; C_o – концентрация 1% раствора, равная 10 мг/мл.

ВЭЖХ-анализ бетулина, токоферолов и β -ситостерола. *Условия хроматографирования бетулина:* подвижная фаза ацетонитрил—вода 90:10 (v/v) в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 40°C, объем инъекции 20 μ L, детектирование при длинах волн 206 и 210 нм, время анализа 20 мин. *Условия хроматографирования токоферолов:* подвижная фаза метанол-ацетонитрил-дихлорметан 50:44:6 (v/v) в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 30°C, объем инъекции 20 μ L, детектирование при длине волны 284 нм, время анализа 30 мин. *Условия хроматографирования β -ситостерола:* подвижная фаза спирт этиловый 96%-ацетонитрил 15:85 (v/v) в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 40°C, объем инъекции 20 μ L, детектирование при длине волны 210 нм, время анализа 30 мин.

Приготовление стандартных растворов из стандартов

Стандарт исходный	C ₀ , %	C, стандартных растворов
МСТ	100	0.01; 0.02; 0.03 г\мл
α -токоферол	100	1.02; 4.08; 10.20; 51.00 мг\л
γ -токоферол	0.005	1.0; 4.0; 10.0; 50.0 мг\л
β -ситостерол	95	0.052; 0.078; 0.260 мг\мл
бетулин	98	0.063; 0.125; 0.250; 0.500; 1.000 мг\мл

Приготовление модельных смесей 1,2,3: 0.1г (точная навеска) бетулина помещали в ступку, растирали с добавлением 1 мл спирта этилового 96%, добавляли 0.5г тимола, 0.2 г аскорбиновой кислоты, при перемешивании вводили 0.5; 1.0 и 2.0 г МСТ.

Приготовление модельных смесей 4,5,6 выполняли аналогично процедуре приготовления модельных смесей 1,2,3, используя 0.05 г; 0.1 г; 0.15 г (точной навески) бетулина. Состав смеси: 0.5 г тимола; 0.2 г аскорбиновой кислоты; 2.0 г МСТ.

Методика пробоподготовки образцов для анализа токоферолов и фитостеролов:

Модельную смесь растворяли в 50 мл спирта этилового 96%, добавляли 30 мл 60 масс.% водного раствора КОН и выдерживали образец в течение 30 мин на водяной бане при 70°C. Затем к смеси после охлаждения добавляли 100 мл воды и экстрагировали двумя порциями гексана по 100 мл. Полученное извлечение обрабатывали 100 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты, а затем дважды водой порциями по 100 мл, после чего сушили Na₂SO₄. Гексан удаляли в токе азота до остаточного объема 15 мл и полученный раствор пропускали через колонку с MgO диаметром 1.5 см, высотой 5 см для очистки от каротиноидов. Колонку промывали двумя порциями гексана по 25 мл и полученный раствор отгоняли в токе азота досуха. Остаток растворяли в 1 мл элюента.

Биомиметические исследования взаимодействия бетулина с липидными структурами кожи на модели монослоев лецитина на межфазной границе «вода-воздух»

изучали на установке KSV Nima, Sweden. Молекулярная площадь A_0 лецитина в монослое определяли графическим путем экстраполяцией линейного участка изотермы сжатия $\pi - A$ на ось абсцисс ($\pi=0$).

Антиоксидантные свойства изучали на цельной крови, полученной путём декапитации головы крысы с предварительной перерезкой сонной артерии, в соответствии с нормативными документами (А.Н. Миронов, 2012). **Хемилюминесцентный анализ** проб проводили по реакции Фентона индуцированием перекисью водорода и ионами двухвалентного железа на БХЛ-06. Оценивались: S (mV) – светосумма хемилюминесценции за 30 сек., отражающая перекисное окисление липидов (ПОЛ); tg 2α , показывающий скорость спада процессов ПОЛ в плазме; ОАО - общая антиоксидантная активность; ПРЭ – перекисная резистентность эритроцитов, отражающая S (mV) за 30 сек. и характеризующая степень выраженности ПОЛ в эритроцитах. **Эффективность крема** исследовали в соответствии с руководством по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ (А.Н. Миронов, 2012) на 10 самцах крыс линии Вистар массой ($M \pm s$) $200 \pm 2,6$ г, при его наружном применении в течение 10 дней в сравнении с препаратом Левомеколь®, содержащего метилурацил (4,0%) и левомицетин (0,75%). Животным под комбинированным наркозом («Золетил» и «Ксила») наносили термическую травму III степени на площади 20% поверхности тела путем нанесения ожога кипятком (температура - 100°C , экспозиция - 4 сек.) на предварительно эпилированный участок кожи.

Состояние микроциркуляторного русла в интактной коже и ожоговой ране изучали на приборе «ЛАКК-М-2». Микроциркуляцию (4 минуты) оценивали по показателю микроциркуляции (ПМ), или параметру М, в перфузионных единицах; ПМ отражает средний уровень перфузии (средний поток эритроцитов) в единице объема ткани за единицу времени.

Исследование противовоспалительных свойств на модели острого отека уха, вызванного ксилолом. Использованы самки белых беспородных мышей весом 25-30 г, содержащиеся в стандартных условиях (А.Н. Миронов, 2012). После индуцирования отека уха у мышей ($n = 9$ / группу) на внутренней и наружной поверхностях правого уха ксилолом (20 мкл/ухо), правые уши местно обрабатывали по 20 мкл/ухо - 100% МСТ, 6,4% раствором тимола в минеральном масле, фитопрепаратом, минеральным маслом (положительный контроль) - и гидрокортизоном 0.5% (0.05 мг / ухо). Левое ухо считалось противоположным контролем и обрабатывалось только минеральным маслом или раствором NaCl 0,9% (отрицательный контроль, 20 мкл / ухо). Отек уха оценивали через 1ч после применения ксилола. Толщину уха измеряли в мкм. Оценка веса уха выполнена после умерщвления мышей и удаления ушей. Ингибирование отека (%)

оценивали по изменению толщины уха и как разность веса между правым и левым ушами. *Статистическую обработку* проводили по программе Statistica 7,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Обоснование и разработка состава фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

1.1 Физико-химические свойства фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ

Масло семян тыквы (МСТ) содержит комплекс легкоокисляющихся БАВ (каротиноиды, токолы, ненасыщенные жирные кислоты). Для предотвращения окисления масла предложено вводить тимол, способный стабилизировать форму токолов и каротиноидов (Таблица 1).

Таблица 1.

Изменение состава МСТ при хранении на воздухе при 25°C

Компонент	Концентрация, мг%				
	На момент поступления МСТ	Через 3 часа после приготовления фитопрепарата		Через 3 месяца хранения при 25°C	
		Без тимола	С тимолом (6400 мг%)	Без тимола	С тимолом (6400 мг%)
Каротиноиды	0,4-1,0	0,3-0,5	0,4 – 1,0	0,3	0,4-1,0
α-токоферол	6,0	5,0	6,0	3,0	6,0
γ-токоферол и γ-токоτριенол	50,0	38-45	50,0	25,0	50,0
Фитостеролы	105-150	85-90	105-150	52,5-75,0	105-150

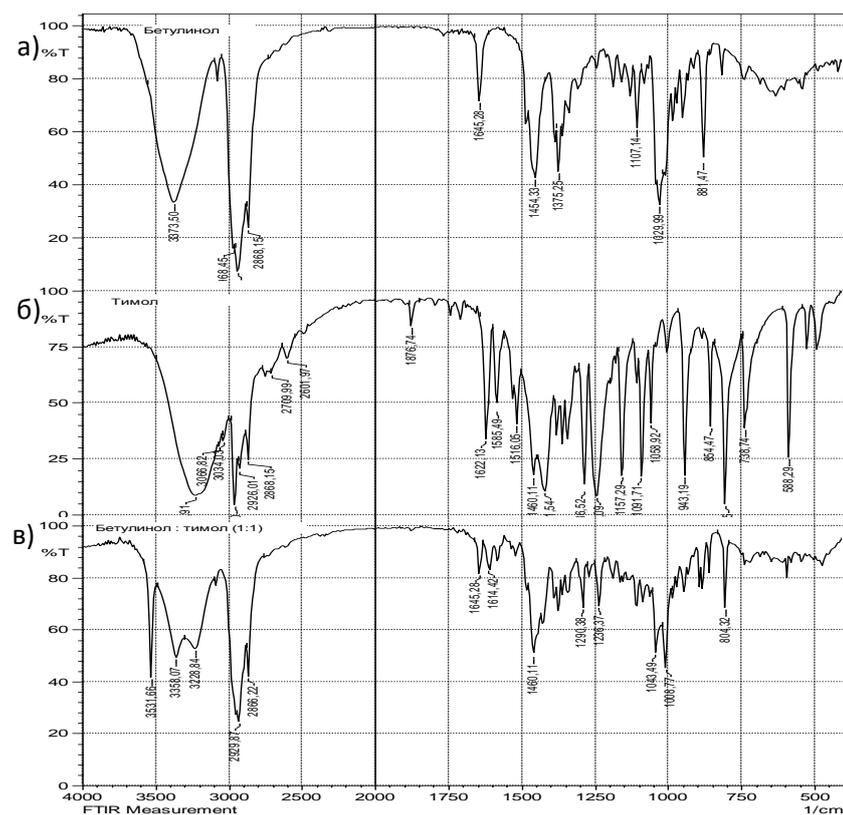
В таблице 2 представлены данные о повышении растворимости бетулина в присутствии тимола как в водных, так и в липофильных средах.

Таблица 2.

Растворимость бетулина в воде и масле семян тыквы

	Растворимость, мг/мл	
	Вода	МСТ
Бетулин	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
Бетулин-тимол (1:1)	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$

Возможной причиной улучшения растворимости бетулина в МСТ в присутствии тимола является образование комплексов тимола и бетулина при механо-химическом воздействии на их смесь. В ИК-спектре сухого остатка после перетирания бетулина и тимола при молярном соотношении 1:1 появилась интенсивная узкая полоса 3550 см^{-1} и полоса средней интенсивности 1044 см^{-1} , что, вероятно, обусловлено образованием комплекса включения тимола в димер бетулина состава 1:1 (Рисунок 1).

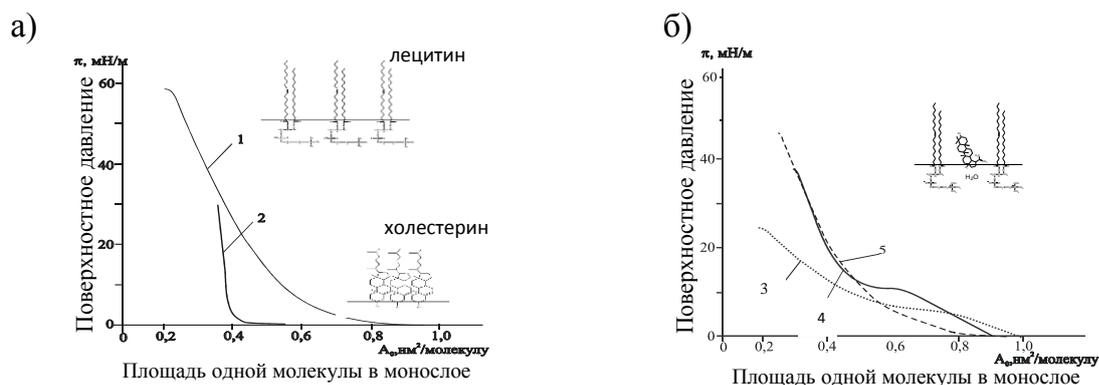


ν, cm^{-1}	Бетулин	Тимол	Смесь
ОН 3200- 3600	3380	3280	3380, 3280, 3550
-C-O (спирт) 1000- 1100	1028	1091	1044
=CH2 800-890	881	806	804

Рисунок 1. ИК-спектральные данные бетулина (а), тимола (б), смеси бетулин-тимол в молярном соотношении 1:1 после перетирания (в)

Другим положительным свойством бетулина, близкого по структуре к глюкокортикоидам, является его способность достижения липидной поверхностной пленки кожи, встраивания и прохождения через нее. Это свойство бетулина взаимодействия с липидной частью биологической мембраны было изучено на модели искусственной мембраны – ленгмюровского монослоя лецитина, традиционно используемой для этой цели. Молекулярная площадь A_0 лецитина (1-пальмитоил – 2 – олеил – фосфатидилхолина) в монослое, сформированном на границе раздела «вода-воздух», равна $0,54 \text{ нм}^2$, в отличие от холестерина, образующего жестко конденсированную пленку с $A_0 = 0,41 \text{ нм}^2$ и бетулина, который не образует в этих условиях монослоя (Рисунок 2).

Близость значений A_0 лецитина в гомогенном монослое и в смесевом монослое с бетулином свидетельствует о «двумерном» растворении бетулина в лецитиновой пленке, за счет существенного межмолекулярного взаимодействия компонентов. Эти результаты могут служить прогностическим фактором липидсохраняющей функции эпидермального барьера в присутствии бетулина.



№ кривой	Монослой	$A_0 \pm 0,02$, нм ² /молекула	Модуль сжатия $C_S^{-1} = -A_0(d\pi/dA)$, мН/м
1	Лецитин	0,54	92
2	Холестерин	0,41	29
3	Бетулин-лецитин 1:1	0,50	65
4	Холестерин-лецитин 1:1	0,58	58
5	Бетулин-лецитин 1:2	0,50	70

Рисунок 2 а, б. Изотермы сжатия $\pi = f(A_0)$ (293 К) монослоев на воде.

На основании исследований по увеличению растворимости бетулина в МСТ, способности бетулина к взаимодействию с ПЛП, повышения стабильности фитопрепарата в присутствии тимола, нами предложен следующий состав фитопрепарата (масс.%): бетулин – 2.1, тимол – 6.4, МСТ до 100.0.

1.2 Исследование свойств фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ в эксперименте на острой модели воспаления – ксилोल-индуцированном отеке уха

Во всех экспериментах ухо мыши, обработанное ксилолом, увеличивалось по толщине и весу ткани. Измерения величины отека по толщине и весу проводили через час после обработки ксилолом (Рисунок 3). Растворы сравнения (минеральное масло или физиологический раствор) по сравнению с фитопрепаратом или отдельными его компонентами существенно не изменяли толщину уха (данные не показаны). В то же время, фитопрепарат ингибировал вызванный ксилолом отек уха по параметрам толщины уха и весу по сравнению с соответствующим положительным контролем ($P < 0,05$) через 1 час. Это ингибирование было аналогичным эффекту гидрокортизона и масла семян тыквы (Рисунок 3, Таблица 3).

Таблица 3.

Местный противовоспалительный эффект масла семян тыквы (МСТ) и других веществ на острой модели воспаления (n = 45).

Исследуемые вещества	Ингибирование воспаления (%)
МСТ, 100 %	65,17±3,11
Фитопрепарат	66,81±4,91
6,4% тимола в минеральном масле	21,45±8,24
0,5% мазь гидрокортизона	67,15±7,35

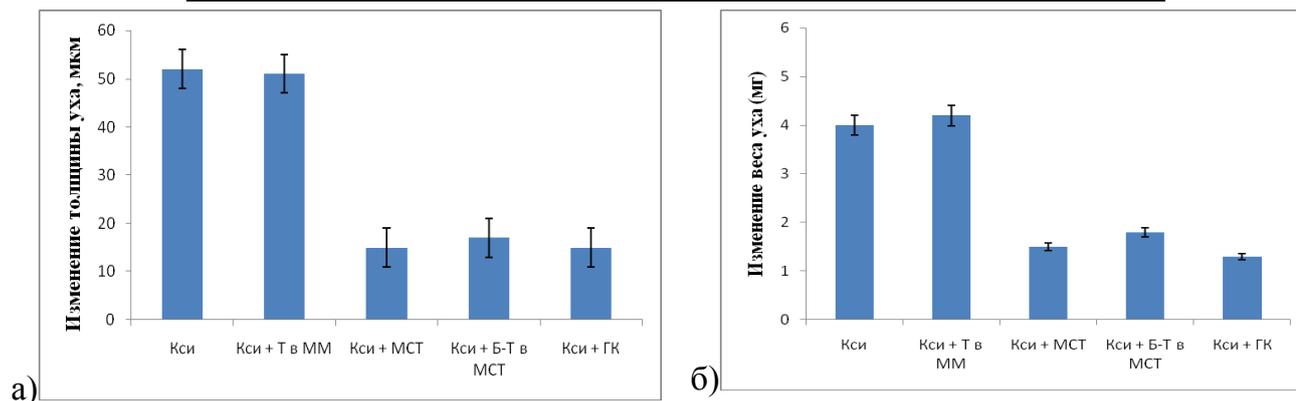


Рисунок 3. Местная активность тимола в минеральном масле (Т в ММ), масла семян тыквы (МСТ), фитопрепарата (Б-Т в МСТ) и 0,5% гидрокортизона (ГК) на ксиллоиндуцированном (Кси) ушном отеке у мышей. Отек уха был измерен через 1 час после индукции воспаления по толщине уха (а) и весу ткани (б). Положительный контроль – минеральное масло (ММ).

Мы полагаем, что противовоспалительная активность МСТ обусловлена высоким содержанием фитостеролов, каротиноидов и токолов и ненасыщенных жирных кислот, вследствие чего предлагаемый фитопрепарат, содержащий дополнительно бетулин и тимол, оказывает больший противовоспалительный эффект и может быть использован при различных кожных заболеваниях как наружное средство.

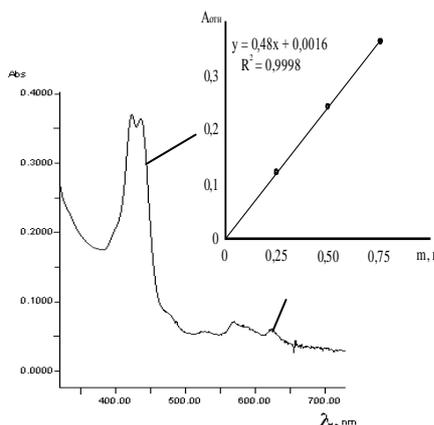
2. Разработка методик количественного определения каротиноидов и анализа жирнокислотного состава масла семян тыквы при входном контроле

Количественное определение каротиноидов проводили методом электронной спектроскопии, жирнокислотный состав МСТ установлен методом газовой хроматографии.

2.1 Количественное определение суммы каротиноидов

Количественный анализ суммы каротиноидов проводили, используя основные полосы электронного спектра с λ_{\max} 424 и 434 нм, характерными для β -криптоксантина,

зеаксантина и виолаксантина (Рисунок 4). Для удаления следов хлорофилловых соединений, поглощающих в области 550-650 нм, нами проводилась адсорбционная очистка гексанового раствора с использованием колонки, заполненной оксидом магния. Калибровочные графики зависимостей интенсивностей поглощения A при 424 и 434 нм от концентрации МСТ имеют линейный характер. На рисунке 4 (врезка) представлена зависимость $A=f(m)$ по $\lambda = 424$ нм, соответствующая уравнению $y = 0.4800x + 0.0016$ ($R^2=0.9998$), на основании которой рассчитан $E_{1\text{см}}^{1\%}$, равный 2515.



Масса МСТ, г	Оптическая плотность А (424 нм)
0.25	0.1216
0.50	0.2416
0.75	0.3616

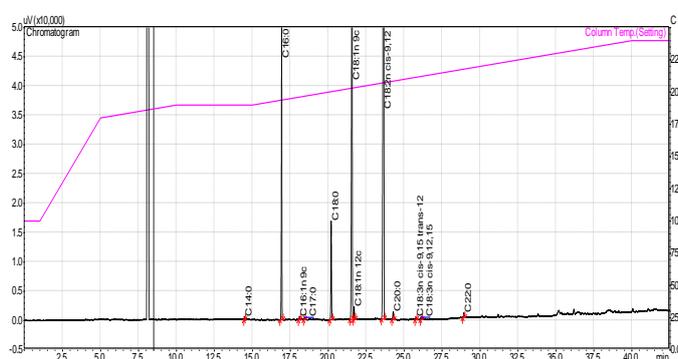
Рисунок 4. Электронные спектры каротиноидов в МСТ (гексан); врезка - зависимость $A=f(C_{\text{МСТ}})$.

Суммарное содержание каротиноидов (в мг) на 100 г МСТ, рассчитанное по формуле 1, равно $0.0483 \pm 0.0013\text{мг}\%$ (48.3 мкг%). Методика соответствовала валидационным показателям линейности, сходимости и правильности.

2.2 Определение жирнокислотного состава МСТ

Жирнокислотный состав, определенный методом ГХ с хроматомасс-детектором представлен на рисунке 5.

Анализ был проведен при метилировании МСТ в щелочной среде без разбавления.



№ пика	Название	Время выхода	Площадь, %
1	C 14:0	14.479	0.1200
2	C 16:0	16.927	13.4815
3	C 16:1n 9c	18.107	0.1485
4	C 17:0	18.432	0.1039
5	C 18:0	20.194	5.1262
6	C 18:1n 9c	21.564	30.1495
7	C 18:1n 12c	21.704	0.6565
8	C 18:2n cis-9,12	23.645	49.1566
9	C 20:0	24.274	0.4746
10	C 18:3n cis-9,15 trans-1	25.781	0.1519
11	C 18:3n cis-9,12,15	26.123	0.1411
12	C 22:0	28.932	0.2897

Рисунок 5. Жирнокислотный состав МСТ

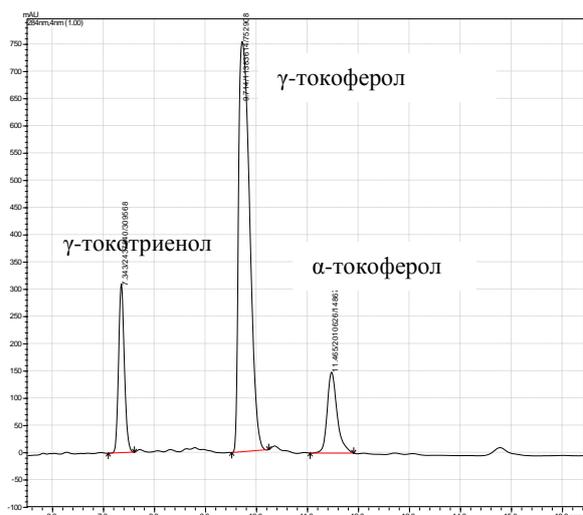
Показано, что МСТ характеризуется высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот – олеиновой ($\approx 30\%$) и линолевой (49%), что, вероятно, обеспечивает высокую противовоспалительную активность МСТ.

3. Количественное определение ОФ-ВЭЖХ суммы токолов, β -ситостерола и бетулина в фитопрепарате бетулина и тимола в МСТ

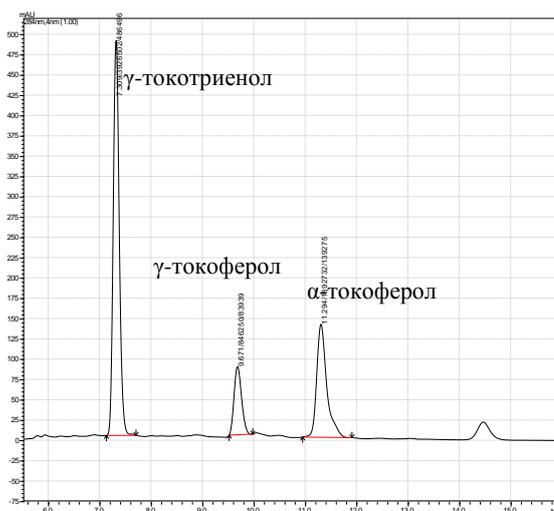
Нами показано, что введение аскорбиновой кислоты в омыляемую смесь в рекомендуемых Международным протоколом концентрациях, приводило к частичному окислению токоферолов, каротиноидов и деструкции β -ситостерола, проявлявшееся в невоспроизводимости результатов. В качестве антиоксиданта для проведения пробоподготовки нами предложено использовать тимол, который в присутствии аскорбиновой кислотой (АК) эффективно вступает в реакции обрыва цепи, регенерируя окисленную АК. Пробоподготовку проводили в присутствии смеси тимола и АК при их массовом соотношении 2.5:1. На рисунке 6 показано влияние времени омыления на состав токолов. После 30 минут токолы представлены: α -токоферолом (α -Т) ($\tau = 11.47$ мин), γ -токоферолом (γ -Т) ($\tau = 9.71$ мин) и γ -токотриенолом (γ -ТТ) ($\tau = 7.34$ мин). Показано, что площадь пика γ -Т в 6 раз выше, чем α -Т, а площадь пика γ -ТТ существенно больше, чем у α -Т (Рисунок 6б). После длительного омыления (60 минут), вероятно, происходит частичный переход γ -Т в γ -ТТ и концентрация γ -Т резко уменьшается, при этом соотношение площади пика γ -Т к α -Т составляет 1:1.5. Учитывая этот факт, в дальнейшем омыление проводили в течение 30 минут.

Количественное содержание α - и γ -Т в фитопрепарате, выполняли с использованием калибровочного графика по стандартам α - и γ -Т (Рисунок 6). Рассчитанная концентрация α - и γ -Т равна 7.50 мг% и 5.77 мг%, соответственно.

а) время омыления 30 мин



б) время омыления 1 час



Токол	$\tau_{уд.}$, МИН	Площадь		$S_{\gamma-T} / S_{\alpha-T}$	
		30 мин	1 час	30 мин	1 час
α -Т	11.47	2010626	1892732	6:1	1:1.5
γ -Т	9.71	11383614	846250		

Рисунок 6. ВЭЖ-хроматограммы фитопрепарата после омыления: а) 30 мин и б) 1 час.

Определение линейности проводили на 4 уровнях концентраций от ожидаемого содержания α - и γ - Т в фитопрепарате, аналогично определению каротиноидов. Уравнения линейной регрессии и значения коэффициентов корреляции (R) характеризуют приемлемость данной методики по показателю линейности.

Методика соответствует критерию сходимости по величине RSD, %, равному 1.68% для α -Т и 3.84% для γ -Т.

Правильность методики устанавливали методом добавок «введено-найдено» путем измерения количественного содержания α - и γ - токоферолов в растворах при добавлении определенного количества стандартов к исследуемому раствору. Отношение количества введенного токола к найденному (X_{cp}) соответствовало 98.75 % (α -Т) и 99.13 % (γ -Т), что характеризует разработанную методику как правильную.

Методика имеет предел обнаружения равный 0.0015 ± 0.0002 г/мл, предел количественного определения равный 0.010 ± 0.002 г/мл.

Для анализа β -ситостерола и бетулина в фитопрепарате на основе МСТ был предложен другой режим ОФ-ВЭЖХ-анализа, указанный в методологической части.

На рисунке 7 приведены типичные ВЭЖ-хроматограммы компонентов фитопрепарата после пробоподготовки.

а) Стандарт β -ситостерола

б) МСТ

в) Бетулин в фитопрепарате

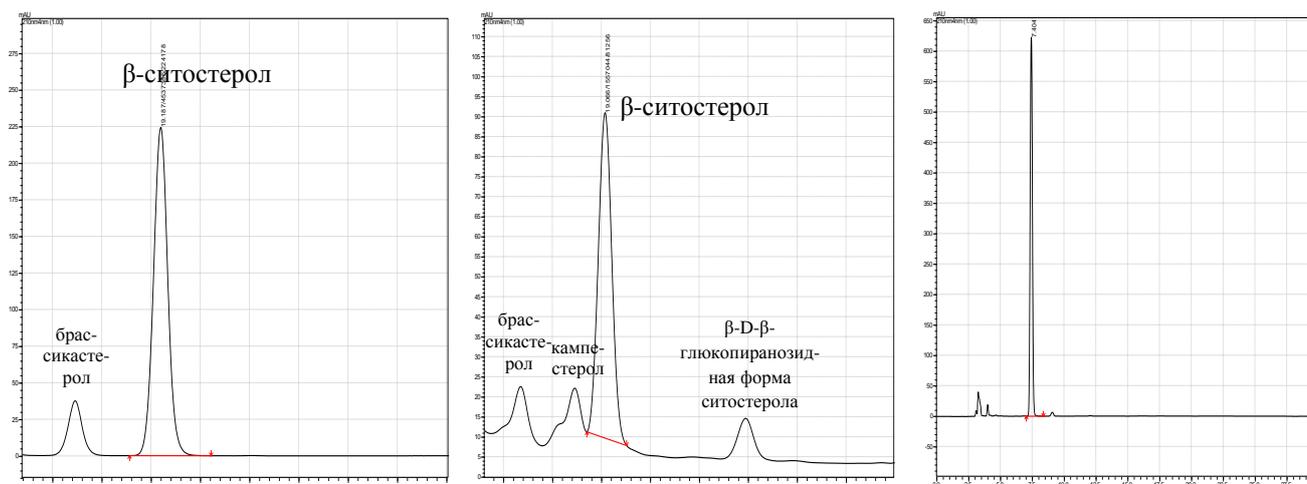


Рисунок 7. ВЭЖ-хроматограмма: а) β -ситостерол; б) МСТ; в) бетулин.

Показано, что количественное содержание, определенное по градуировочным зависимостям стандартов, β -ситостерола в фитопрепарате равно 150 ± 10 мг%, а бетулина составило 2.13 ± 0.32 г/100 г. Линейность определяли при 3 концентрациях β -ситостерола и бетулина. Уравнение линейной регрессии для β -ситостерола имели вид: $y = 3449375x$, для бетулина $Y = 6867462x$. Значение R во всех случаях составляло не менее 0.999.

Сходимость методики оценивали по величине RSD%, которое составляло 3.56 % для β -ситостерола и 2.8 % для бетулина, соответственно. Правильность методики устанавливали методом добавок. X_{cp} для β -ситостерола имеет значение от 95,5 до 101,4 %, его средняя величина составила 97,65 %, а для бетулина от 96.15 до 101.42 % (в среднем 98.31 %). Таким образом, методики определения β -ситостерола и бетулина удовлетворяли требованиям по линейности, сходимости, правильности. Методики имели пределы обнаружения, равные 0.0075 ± 0.0002 г/мл (для β -ситостерола) и 0.0075 ± 0.0017 г/мл (для бетулина). Пределы количественного определения: 0.050 ± 0.003 г/мл (для β -ситостерола) и 0.0500 ± 0.0011 г/мл (для бетулина).

4. Дерматологические препараты с бетулином и тимолом в масле семян ТЫКВЫ

В работе показана возможность получения различных лекарственных форм на основе бетулина и тимола в масле семян тыквы.

Лекарственные формы имели следующие составы (масс.%):

крем на эмульсионной основе: бетулин 0.2; тимол 1.0; МСТ 12.0; аллантаин 0.1; нипагин 0.01; аскорбилпальмитат 1.0; цетилстеариловый спирт 2.0; стеариновая кислота 2.0; цетеарет-25 2.5; глицерин 4.0; глицерил стеарат 5.0; вода до 100.0;

жирная мазь: бетулин 0.1; тимол 0.2; МСТ 3.0; ланолин б/в 7.0; нафталанская нефть 20.0; вазелин до 100.0.

На первой стадии получали суспензию бетулина и тимолола в масле семян тыквы.. Необходимое количество бетулина и тимолола растирали в присутствии спирта этилового 96% до испарения растворителя, а затем к ним прибавляли масло семян тыквы. Затем суспензию вводили в подготовленную основу лекарственной формы.

Ранозаживляющее действие фитопрепарата, содержащего бетулин и тимол в МСТ, было изучено в лекарственной форме – креме на крысах на 2-е сутки от начала опыта, используя в качестве контроля лечение Левомеколем® (Таблица 4).

Таблица 4.

Изменение площади ожога у крыс при лечении Левомеколем® и фитопрепаратом, в %

Группа	Кол-во крыс	Площадь раны во времени (%)						
		Сутки						
		1	2	3	4	5	6	7
Контроль (Левомеколь®)	15	100	89±1	94±2	88±1	85±3	83±3	80±4
Крем с Б-Т в МСТ	45	100	89±2	87±2	80±3	78±3	76±2	72±4

При лечении кремом с бетулином и тимолом в масле семян тыквы отмечалось ослабление экссудативной фазы воспаления по сравнению с Левомеколем® и большее сокращение площади раны (Таблица 4). Кроме того, наблюдалась позитивная динамика микроциркуляции в зоне поражения. Через 10 суток при лечении кремом с бетулином и тимолом в масле семян тыквы показатель микроциркуляции (ПМ) был равен 10.6 ± 1.08 перф. ед., что составляло 78% от уровня здоровых животных, тогда как этот показатель при лечении Левомеколем® существенно ниже - 61% от исходного уровня (8.28 ± 0.73 ; $p < 0,05$).

Заживление ожоговых ран при лечении Левомеколем® происходило на фоне развившегося оксидативного стресса: интенсивность ПОЛ возросла на 69%, АОА снизилась на 48% по сравнению с интактными крысами (Таблица 5).

Таблица 5.

Биохимические параметры крови крыс на фоне лечения ожога кремом с бетулином и тимолом в масле семян тыквы и Левомеколем®

Параметр	Интактные крысы	Контроль Левомеколь® (10 суток)	Крем с бетулином и тимолом в масле семян тыквы (10 суток)
S (светосумма ХЛ)	10,52±1,10	17,73±1,81*	13,43±1,21**
tg 2α (АОА)	0,44±0,09	0,23±0,04*	0,99±0,08*/**
ПРЭ	8,05±0,90	6,21±0,40*	7,63±0,72**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0.05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

При лечении крыс кремом с бетулином и тимолом в масле семян тыквы на 10 сутки отмечалось увеличение АОА более чем в 2,2 раза ($0.99 \pm 0.08^*$) по сравнению с исходным уровнем. Суммарная АОА в опытной группе была выше в 4.3 раза по сравнению с контролем. Под влиянием крема с бетулином и тимолом в масле семян тыквы отмечено снижение интенсивности ПОЛ в плазме крови на 24% по сравнению с контролем и нормализация показателя ПРЭ по сравнению с интактными крысами.

В целом следует отметить, что лечение кремом с бетулином и тимолом в масле семян тыквы способствовало активации репаративных процессов в ожоговой ране, ускорению эпителизации за счёт возрастания транспортных способностей сердечно-сосудистой системы, что проявляется в усилении объёмного микрокровотока и оптимизации про- и антиоксидантного потенциала организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами разработаны состав и методики контроля качества противовоспалительной фитокомпозиции бетулина и тимола в масле семян тыквы, а также предложены возможные лекарственные формы.

Основные **выводы** по работе представлены ниже.

1. Обоснован и разработан состав противовоспалительного фитопрепарата бетулина (2.1 %) и тимола (6.4%) в масле семян тыквы *Cucurbita Pepo*. Установлена способность тимола стабилизировать ненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, токолы и фитостеролы в масле семян тыквы и образовывать комплексы с бетулином. На биомиметической модели проникания биологически активных веществ в лецитиновый монослой показана способность бетулина взаимодействовать с многослойными липидными структурами кожи.

2. Разработана методика количественного анализа каротиноидов в масле семян тыквы и в фитопрепарате бетулина и тимола в масле семян тыквы методом электронной спектроскопии, предполагающая первичную адсорбционную очистку от сопутствующих примесей.

3. Методом ГЖХ с хроматомасс-детектором изучен жирнокислотный состав масла семян тыквы (80.4 % ненасыщенных жирных кислот) для входного контроля качества.

4. Разработаны методики ОФ-ВЭЖХ-анализа суммы токолов (токоферолы и токотриенолы), β -ситостерола и бетулина, методика УФ-анализа тимола в фитопрепарате бетулина и тимола в масле семян тыквы. Предложено проводить пробоподготовку омылением 60% водным раствором КОН в присутствии аскорбиновой кислоты и тимола, взятого в 2,5-кратном избытке по отношению к аскорбиновой кислоте.

5. Проведена валидация методик количественного определения бетулина, каротиноидов, токолов и β -ситостерола в фитопрепарате бетулина и тимола в масле семян тыквы. Методики ВЭЖХ-анализа токоферолов, β -ситостерола и бетулина удовлетворяют требованиям по правильности, линейности и сходимости и характеризуются пределом обнаружения (равном 0.15 ± 0.01 мг/л для α и γ -токоферолов; 0.0075 ± 0.0002 мг/мл для β -ситостерола), пределом количественного определения (равном 1.00 ± 0.02 мг/л для α и γ -токоферолов; 0.050 ± 0.003 мг/мл для β -ситостерола).

6. Изучен противовоспалительный эффект фитопрепарата на модели острого воспаления – ксилол-индуцированного отека уха у мышей. Ингибирование воспалительного процесса при воздействии разработанного фитопрепарата ($66.81 \pm 4.91\%$) сопоставимо с эффектом 0.5% гидрокортизоновой мази ($67.15 \pm 7.35\%$).

7. В эксперименте на крысах показаны ранозаживляющие свойства дерматологического крема с бетулином в масле семян тыквы на модели ожоговой раны. Установлено, что на заживление ожоговой раны влияет антиоксидантная активность компонентов фитопрепарата, которая увеличивалась в 2,2 раза при лечении кремом по сравнению с действием Левомеколя®.

Практические рекомендации

Разработанный проект фармакопейной статьи на новый фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы «Бетупам» может быть внедрён в производственный процесс фармацевтических предприятий. Разработанные методики анализа компонентов фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы могут быть внедрены в лабораторные практикумы, учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в получении новых лекарственных форм на основе компонентов фитопрепарата бетулина и тимола в масле

семян тыквы с широким спектром фармакологического воздействия и исследовании их медико-биологических свойств.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Vorobyova, O.A. Analysis of the components of pumpkin seed oil in suppositories and the possibility of its use in pharmaceuticals / O.A.Vorobyova, A.E. Bolshakova, R.A. Pegova, O.V. Kol'chik, I.N. Klabukova, E.V. Krasilnikova, N.B. Melnikova // **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. – 2014. – №6(5). – P. 1106-1116.
2. Пегова, Р.А. Растительные масла. состав и перспективы использования масла семян тыквы *cucurbita pepo* в терапии (обзор) / Р.А. Пегова, О.А. Воробьева, О.В. Кольчик, А.Е. Большакова, О.Е. Жильцова, Н.Б. Мельникова // **Медицинский альманах**. – 2014. – №2(32) – С. 127-134.
3. Воробьева, О.А. Разработка и валидация методов анализа компонентов фармацевтической композиции бетулина и тимола в масле семян тыквы *Cucurbita Pepo* / О.А.Воробьева, Н.Б.Мельникова // **Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований**. – 2015. - №10. – С. 295-303.
4. Воробьева, О.А. Разработка и исследование противовоспалительной фитокомпозиции бетулина и тимола в масле семян тыквы в эксперименте / О.А. Воробьева, А.Г. Соловьёва, А.К. Мартусевич, П.В. Перетягин, Р.Д. Лапшин, И.В. Мухина, О.Е. Жильцова, Н.Б. Мельникова // **Медицинский альманах**. – 2015. – №4 – С. 209-212.
5. Воробьева, О.А. Разработка раневых покрытий с тритерпеноидами лупанового ряда / О.А.Воробьева // **МедиАль**. – 2013. –№ 1(6). – С. 117.
6. Воробьева, О.А. ВЭЖХ-анализ бетулина и β -ситостерина в фармацевтической композиции в виде порошка / О.А. Воробьева // **Актуальные вопросы медицины в современных условиях: сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции**. - г. Санкт-Петербург, 2016. - №3. - С. 204-207.
7. Воробьева, О.А. Разработка противовоспалительных препаратов с бетулином в масле семян тыквы / О.А. Воробьева // **Приоритетные направления развития науки и образования: материалы VIII Международной научно-практической конференции**. - г. Чебоксары, 2016. - №1 (8).– С. 76-78.
8. Воробьева, О.А. Особенности пробоподготовки при проведении ОФ-ВЭЖХ анализа токолов в масле семян тыквы / О.А. Воробьева // **Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты: материалы XXIV Международной научно-практической конференции**. – г. Новосибирск, 2016. – С. 147-151.
9. Воробьева, О.А. Анализ бетулина и фитостеролов в дерматологических лекарственных средствах, содержащих масло семян тыквы / О.А. Воробьева, О.Е. Жильцова, Н.Б.Мельникова // **Теоретические и прикладные аспекты современной науки: сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции в 2 ч. Ч.2** – г. Белгород, 2014.- С. 128-134.

Патент

1. Пат. RU 2567730 Российская Федерация, МПК А61К9/06, А61К9/10, А61К36/185, А61К36/42, А61К36/53, А61К31/05, А61К47/48, А61Р17/00. Фармацевтическая композиция наружного применения для лечения заболеваний кожи / Мельникова Н.Б., Воробьева О.А., Клабукова И.Н., Жильцова О.Е., Истранов Л.П., Истранова Е.В., заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России). - № 2014143672/15. заявл. 30.10.2014, опубл. 10.11.2015.