

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ВОРОБЬЕВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Н.Б. Мельникова

Нижний Новгород – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы. Дерматологические лекарственные средства наружного применения	15
1.1 Анализ фармацевтического рынка дерматологических лекарственных средств наружного назначения	15
1.1.1 Местные лекарственные средства для лечения дерматологических заболеваний	16
1.1.2 Средства для лечения ожогов	20
1.1.3 Дерматологические косметические средства	21
1.1.4 Ветеринарные средства	22
1.2 Растительные масла: состав и свойства	24
1.2.1 Жирнокислотный состав растительных масел	25
1.2.2 Каротиноиды и их роль в снятии воспалительного процесса ...	27
1.2.3 Влияние токолов на воспалительный процесс.....	30
1.2.4 Фитостеролы и их влияние на воспалительный процесс	32
1.3 Анализ компонентов растительных масел. Современные подходы..	34
1.3.1 Методики пробоподготовки растительных масел для определения токолов и фитостеролов.....	34
1.3.2 Методики анализа токолов и фитостеролов в растительных маслах	37
1.3.3 Методы определения каротиноидов	40
1.3.4 Методы анализа жирнокислотного состава масел	41
1.4 Бетулин как потенциальный компонент лекарственных средств.....	43
1.4.1 Физико-химические свойства бетулина	44
1.4.2 Фармакологические свойства бетулина	46
1.4.3 Патентно-информационные исследования применения бетулина в наружных лекарственных средствах.....	49
1.4.4 Обзор рынка лекарственных и лечебно-косметических форм с бетулином.....	50
Общие выводы по главе 1.	52

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.....	53
2.1 Материалы и реактивы	53
2.2 Методы исследования и приборы	53
2.3 Методики пробоподготовки.....	57
2.4 Методики исследования свойств фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы	58
ГЛАВА 3. Разработка и стандартизация нового фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы	63
3.1 Обоснование и разработка состава фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы	63
3.1.1 Физико-химические свойства фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы	64
3.1.2 Исследование свойств фитопрепарата в эксперименте на острой модели воспаления	76
3.2 Разработка методик количественного определения каротиноидов и анализа жирнокислотного состава масла семян тыквы при входном контроле	82
3.2.1 Количественное определение суммы каротиноидов.....	82
3.2.2 Определение жирнокислотного состава масла семян тыквы....	86
3.3 Разработка методик количественного определения суммы токолов, β -ситостерола и бетулина в фитопрепарате.....	87
3.4 Контроль качества тимола в фитопрепарате.....	93
3.5 Определение срока годности фитопрепарата	94
ГЛАВА 4. Разработка проекта фармакопейной статьи на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы	96
4.1 Нормы качества фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы	
4.2 Валидация методик анализа фитопрепарата.	97
ГЛАВА 5. Лекарственные формы на основе бетулина в масле семян тыквы	103
5.1 Разработка лекарственных форм на основе фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы	103
5.2 Исследование ранозаживляющего действия крема с бетулином на основе масла семян тыквы	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	129
Приложение 1. Проект фармакопейной статьи на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы «Бетупам»	129
Приложение 2. ^1H – ЯМР спектр бетулина	141
Приложение 3. ^{13}C – ЯМР спектр бетулина	142
Приложение 4. Выделение и идентификация бетулина.....	143
Приложение 5. Результаты испытаний при проведении определения срока годности фитопрепарата	144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- МСТ – масло семян тыквы
- ПЛП – поверхностная липидная пленка
- ГКСП – глюкокортикостероидные препараты
- ГКС - глюкокортикостероид
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- БАВ – биологически активные вещества
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ЛПНП – липопротеины низкой плотности
- ПФ – подвижная фаза
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- АОА – антиоксидантная активность
- ПРЭ – перекисная резистентность эритроцитов
- ДФПГ[·] - 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильный радикал
- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- α -Т – α -токоферол
- γ -Т – γ -токоферол
- ГХ – газовая хроматография
- НФ-ВЭЖХ – нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия
- УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия
- UV-vis – спектрофотометр

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Лекарственные средства (ЛС) для 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.

Базовую терапию при дерматозах составляет группа 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].

Препараты глюкокортикостероидов при высокой фармакологической эффективности обладают рядом серьезных побочных эффектов. Их длительное применение крайне нежелательно. В связи с этим актуальным представляется вопрос поиска лекарственных веществ, не уступающих по силе действия глюкокортикостероидам, но при этом имеющих сниженный риск возникновения побочных реакций. Кроме того, травмированность кожного покрова, с которой зачастую сопряжено большинство дерматозов, предполагает введение в состав дерматологического препарата репаративного компонента.

Близкую природу к глюкокортикостероидам имеют тритерпеновые спирты, которые не проявляют побочных эффектов, например, бетулин, содержащийся в коре березы повислой (*Betula pendula*). Бетулин 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].

Одним из механизмов улучшения репаратного эффекта является антиоксидантное действие компонентов наружного средства. В целом можно отметить общность механизма противовоспалительного действия ЛС дерматологического назначения и ЛС для лечения ожогов. Наружных средств для лечения ожогов с использованием репарантов с сильными антиоксидантными свойствами недостаточно. В настоящее время крайне важны отечественные ЛС, проявляющие мягкое репаративное действие с минимальными побочными эффектами.

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 Current 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 является 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 методики 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 ксилониндуцированного отека у мышей.

- Усовершенствованы методики количественного определения основных компонентов МСТ и бетулина и дана их валидационная оценка.

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; 4) тимола 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.

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

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на XI научной сессии молодых учёных и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2012); I Всероссийской XII ежегодной научной сессии молодых учёных и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2013); II Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2014); II Всероссийской с международным участием XIII научной сессии молодых учёных и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015); VIII Международной научно-практической конференции «Приоритетные направления развития науки и образования». (г. Чебоксары, 2016); XXIV Международная научно-практическая

конференция «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.

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 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.

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 основе бетулина в масле семян тыквы. 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.

ГЛАВА 1. Обзор литературы. Дерматологические лекарственные средства наружного применения

1.1 Анализ фармацевтического рынка дерматологических лекарственных средств наружного назначения

По данным Госкомстата за 2013 год заболеваниями кожи и подкожной клетчатки страдают 4,7% населения России. Причинами возникновения такого рода болезней являются как внешние факторы, так и наследственные. [38].

Среди наиболее распространенных дерматологических заболеваний – псориаз, экзема, нейродермиты и пр. Внешние проявления дерматозов причиняют пациентам неудобства с эстетической точки зрения, наблюдаются покраснение, шелушение, сухость, огрубение кожи и т.п. [1]

Причина любого дерматологического заболевания – нарушение структуры или функций кожного покрова. Кожа, выполняющая ряд жизненно важных функций, состоит из эпидермиса и дермы (Рисунок 1.1). Кератиноциты эпидермиса после дифференцировки образуют роговой слой, пространство между ними заполнено липидами. Количество кератиноцитов при некоторых дерматозах (например, псориаз) является маркирующим показателем [22]. Под роговым слоем эпидермиса находится зернистый слой, составляющей которого являются предшественники межклеточных липидов рогового слоя, которые после гидролиза образуют церамиды и свободные жирные кислоты. Наряду с холестерином эти вещества создают барьер в роговом слое эпидермиса [105].

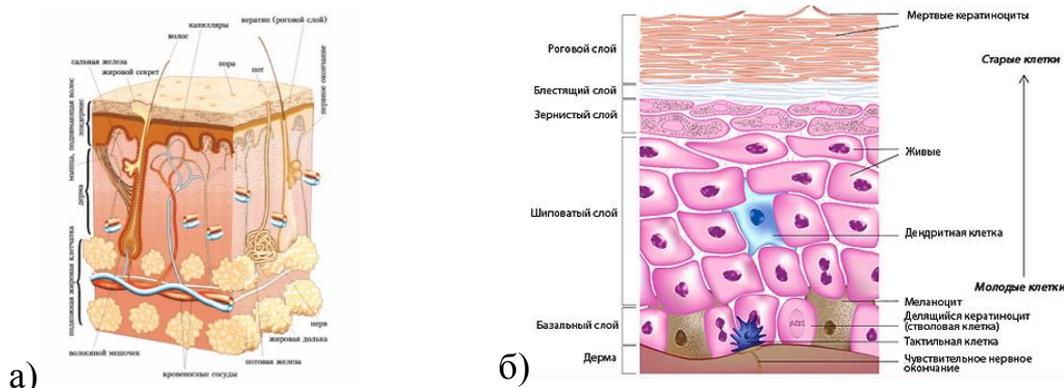


Рисунок 1.1. Структура кожи (а) и эпидермиса (б)

Нарушения липидного баланса на системном уровне и местно на поверхности эпидермиса, влекущие дисфункцию эпидермального барьера, являются одной из причин таких заболеваний кожи, как атопический дерматит, псориаз, нейродермиты и другие [4]. Межклеточные липиды, образующие ламеллярные структуры, - компоненты поверхностной липидной пленки (ПЛП), влияют на состояние кожного барьера и регулируют проникание в кожу липофильных веществ. Гидрофильные вещества и вода проникают в ПЛП кожи благодаря глицеридам, триглицеридам, свободным жирным кислотам, стеролам, а также другим компонентам кожи [43]. Комплексная терапия дерматозов направлена на восстановление соотношения гидрофильных и липофильных веществ в ПЛП кожи [65]. Современные методы лечения дерматозов включают применение системных и местных дерматологических средств.

1.1.1 Местные лекарственные средства для лечения дерматологических заболеваний

Наружная терапия дерматозов направлена на этиологию (устранение причины) и симптомы заболевания (устранение патоморфологических изменений и нивелирование субъективных ощущений) [53].

Все наружные фармакологические средства возможно разделить на индифферентные (действие основано на физических свойствах веществ) и средства, обладающие специфическим терапевтическим действием [67].

Индифферентные средства часто используются в качестве основы для местных дерматологических форм. Это могут быть: вода, химически нейтральные порошкообразные вещества, масла, жиры, жироподобные вещества и пр. Правильно выбранная основа позволяет регулировать степень высвобождения лекарственных веществ, и сама по себе влияет на течение воспаления в очаге поражения.

Для лечения дерматологических заболеваний используют следующие лекарственные формы (ЛФ): лосьоны, присыпки, взбалтываемые смеси, гели, пасты, аэрозоли, кремы, мази, лаки, пластыри. [29] Формы на гидрофильной основе чаще применяются в фазу острого воспаления; жировые лекарственные формы - при хронических дерматозах.

Противовоспалительные средства. Глюкокортикостероиды

Основные фармакологически активные группы, применяемые в дерматологии: противовоспалительные, антибактериальные, противогрибковые, противовирусные, антигистаминные средства, ретиноиды, цитостатики и иммунодепрессанты.

В таблице 1.1 приведены новые более эффективные и безопасные *противовоспалительные ЛС*.

Таблица 1.1.

Основные группы веществ противовоспалительного действия, применяемые в дерматологии [8]

	Группа	Механизм действия	Фаза воспаления
Противовоспалительные средства в составе наружных дерматологических ЛФ	вяжущие	осаждение белков из экссудата, образование пленки	острое воспаление
	ихтиол, нафталан,	уменьшают чувствительность нервных рецепторов в коже	острое воспаление
	ингибиторы кальциневрина	Пимекролимус (Элидел) селективно действует на Т-лимфоциты и тучные клетки, не вызывает атрофии кожи.	лёгкое обострение атопического дерматита
	глюкокортикоиды	действуют на специфические ГКС-рецепторы	острое, подострое, хроническое воспаление

Чаще всего при лечении дерматологических заболеваний применяются препараты глюкокортикостероидов (ГКС). Остальные средства применяются дополнительно или на более поздних этапах лечения [12].

Противовоспалительное действие ГКС обусловлено опосредованным подавлением активности фосфолипазы A_2 , это, в свою очередь, ведет к торможению образования медиаторов воспаления [13, 35, 63]. Глюкокортикостероидами блокируется альтеративная и экссудативная фазы воспаления [37].

ГКС также оказывают десенсибилизирующее, противоаллергическое, иммуносупрессивное и другие действия. Механизм иммуносупрессивного и противоаллергического действия связан с лизисом Т-лимфоцитов, угнетением макрофагов [64].

ГКС наряду с высокой фармакологической эффективностью имеют ряд побочных эффектов на локальном и системном уровнях. Они способны изменять клиническую картину дерматоза (патоморфоз), вызывать атрофические изменения кожи, способствовать ослаблению ее защитной функции [71]. Кроме того, для ГКС характерны эффекты привыкания и «синдром отмены» [26]. Эти препараты могут оказывать системное действие на организм при нанесении на большую

площадь поражения. Противопоказанием к назначению топических стероидов являются инфекционные и неопластические поражения кожи [39].

Основа для глюкокортикостероидного препарата (ГКСП) подбирается с учетом остроты дерматоза, проницаемости кожи [31]. Применяемая ЛФ влияет на эффективность топических ГКСП. В настоящее время фармацевтический рынок выпускает ГКСП в форме мазей, кремов, гелей, эмульсий, лосьонов и др. Проникающая способность уменьшается в следующем ряду: жирная мазь>крем>лосьон (эмульсия) [28]. При дерматозах, сопровождающихся повышенной сухостью и шелушением кожи целесообразнее применять мази, т.к. жировая основа способствует увлажнению эпидермиса и увеличивает глубину проникания ЛС в кожу. Лосьоны и эмульсии применяются при лечении острых дерматозов [31].

Местные ГКСП отличаются друг от друга по химической структуре и по силе местного противовоспалительного действия [7, 59]. Введение атомов галогенов в структуру ГКСП позволило увеличить их эффективность, но при этом число нежелательных эффектов также возросло. Модификация ГКСП путем получения солей органических кислот не вела к усилению побочного действия [55].

Таким образом, актуальным представляется поиск аналога глюкокортикостероидных средств, сравнимого с ними по эффективности, но при этом со сниженным риском возникновения побочных эффектов.

Другие фармакологически активные вещества, применяемые в составе наружных дерматологических средств

В состав наружных дерматологических средств входят также следующие группы препаратов:

антибактериальные, противогрибковые и противовирусные средства используют при дерматозах, сопряженных с инфекцией [1]; *цитостатики и иммунодепрессанты* действуют антипролиферативно и иммуносупрессивно, влияя на Т - и В – лимфоциты [10]; *антигистаминные средства* - применяются как классические антагонисты H-гистаминовых рецепторов (1 поколение), так и

препараты II поколения, не обладающих седативным эффектом [10]; *витамины*: - *ретиноиды* - оказывают регенеративное действие на эпителий, регулируют кератогенез, обладают антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, улучшают усвоение организмом протеина, что препятствует старению кожи, применяются при гиперкератозах (имеются частые побочные эффекты, соответствующие проявлениям гипервитаминоза А, - сухость, шелушение кожи) [34]; - *кальциферолы* влияют на фосфорно-кальциевый обмен, нормализуют водный обмен в коже [9]; - *токолы* влияют на все виды обмена в организме, оказывают противовоспалительное, антиоксидантное, иммуностимулирующее действие, замедляют кератинизацию [97, 136]; - *аскорбиновая кислота* – антиоксидант, способствующий регенерации тканей, участвует в синтезе коллагена [118]; - *филлохинон (витамин К)* способен усиливать действие стероидных гормонов [103].

Включение в состав дерматологического средства перечисленных выше компонентов позволяет достичь комплексного фармакологического эффекта.

1.1.2 Средства для лечения ожогов

При разработке составов дерматологических средств учитывается возможность их применения на поверхностях с нарушением целостности кожного покрова. Так, некоторые препараты используются как при лечении дерматитов, так и раневых травм во второй и третьей стадии, например, ожоговых.

В терапии ожогов применяются средства различной фармакологической направленности: антибактериальные, обезболивающие ЛС, ЛС репаратного и регенерантного действия и другие. Применение противоожоговых ЛС в различных формах зависит от стадии раневого процесса [5, 14, 27, 46].

Препараты второй и третьей стадии раневого процесса защищают раны от вторичного инфицирования (антисептики, антибиотики, противогрибковые ЛС), стимулируют обменные процессы, улучшают кровообращение, стимулируют

ранозаживление (токоферолы, каротиноиды, метилурацил, аллантиин и др.) [3, 68].

Стоит отметить, что в настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке нет дифференцированных препаратов для лечения на различных стадиях раневого процесса.

1.1.3 Дерматологические косметические средства

Принципы создания лечебно-профилактической косметики согласуются с правилами составления лечебных дерматологических композиций. Отличие заключается в том, что косметические средства защищают кожу от повреждающего влияния окружающей среды и при необходимости нормализуют гидрофильно-липофильный баланс кожи (увлажнение), восполняют недостаток биологически активных веществ и т.д.

Наряду с вышеупомянутыми витаминами, в состав косметики часто включают следующие компоненты.

Макро- и микроэлементы - соли калия, натрия и магния используются как регуляторы осмоса и pH [23]. Введение различных глин в косметическую продукцию способствует сорбции избытка жира с поверхности кожи. Очищающее действие глин необходимо учитывать при их комбинации с жировой основой, так как при этом может возникнуть обратный эффект – закупоривание пор [80].

Аминокислоты представлены индивидуальными аминокислотами, или низкомолекулярными белковыми гидролизатами, так как только они способны проникать через эпидермальный барьер. Аминокислоты играют в составе косметических средств питательную роль и проявляют регенерирующий эффект [108].

Регенерирующие добавки растительного и животного происхождения - сыворотки биологических жидкостей, экстракты животных тканей, как источники гормонов и гормоноподобных веществ (молочная сыворотка, пчелиное маточное

молочко, сыворотка крови, мед пчелиный, яичные желтки и другие) увеличивают активность фибробластов, стимулируют деление клеток эпидермиса [25, 114].

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) оказывают как положительное (очищающий эффект, увеличение проницаемости БАВ), так и отрицательное действие (разрушение белковых веществ, раздражающее действие) на кожу [119].

Основа косметических средств включает природные жиры и жирные масла, в основном это синтетические производные липидов – моно-, ди- и триглицериды [73]. Дешевые косметические средства имеют в своем составе продукты нефтепереработки – вазелин и минеральное масло. Преимуществом косметики на основе отдельных компонентов жиров и жирных масел является высокая степень очистки сырья в отличие от цельных растительных или животных жиров [102, 144].

Космецевтические средства на гидрофильной основе имеют в своем составе полимеры – природные (хитозан, гиалуроновая кислота и др.) и синтетические (поливинилпирролидон, пропиленгликоли и др.). В отличие от форм на жировой основе, эти средства не закупоривают поры и способствуют увлажнению кожи за счет влаги из окружающей среды [106].

1.1.4 Ветеринарные средства

Ветеринарные наружные дерматологические средства часто содержат в своем составе жирные масла и экстракты растительного происхождения – при этом препараты проявляют комплексный фармакологический эффект.

Некоторые лекарственные препараты с тритерпеноидами, применяемые в ветеринарии, представлены в таблице 1.2.

Таблица 1.2.

Дерматологические ветеринарные средства с терпенами.

Наименование	Действующие компоненты	Фармакологическое действие
Вединол для лап гигиенический бальзам	3% эфирное масло сосны, экстракт почек сосны	противовоспалительное, антимикробное, регенерирующее, смягчающее
Бальзам Гамабиол	полипренолы и терпеноиды хвойных пород деревьев, плацента денатурированная эмульгированная (ПДЭ), сульфат цинка, гиалуроновая кислота	регенерирующее, устраняющее шелушение, раздражение и зуд, улучшающее трофику кожи, противовоспалительное, иммуностимулирующее
Мазь Пихтоин	живица сосновая, воск пчелиный (или вощина)	сосудорасширяющее, противоотечное, противовоспалительное и болеутоляющее действие, повышающее и восстанавливающее эластичность кожи, регенерирующее, антимикробное
Мазь камфорная 10%	10 г камфоры	антисептическое, противовоспалительное, раздражающее
Мазь серно-дегтярная	кислота салициловая, окись цинка, сера, деготь, скипидар	дезинфицирующее, инсектицидное, местнораздражающее, противомикробное, противопаразитарное, кератопластическое
ВТОРАЯ КОЖА спрей с дегтем	деготь, водный экстракт чистотела и подорожника	кератопластическое и кератолитическое, дезинфицирующее

Основа лекарственного средства подбирается с учетом места нанесения (специфические особенности кожного покрова животного и высокая степень оволоснения) и продолжительности эффекта.

Выводы по разделу 1.1

В составе местного дерматологического средства особую роль играет основа ЛФ: она является вектором доставки ЛВ – влияет на глубину и продолжительность эффекта. В состав лечебных, косметических и ветеринарных средств часто входят растительные масла – как многокомпонентные системы биологически активных веществ. Любой местный эффект дерматологического средства (противовоспалительный, ранозаживляющий, увлажняющий) так или иначе связан с протеканием окислительных процессов на коже – этим обуславливается необходимость введения антиоксидантов в состав ЛФ. Анализ рынка показал наличие препаратов полифункционального действия, при этом

средств дифференцированной направленности по отношению к раневому процессу крайне недостаточно.

1.2 Растительные масла: состав и свойства

Общая характеристика и сопоставительный анализ основных масел

Фармакологические свойства любого жирного масла обусловлены его химическим составом. Для лечения дерматологических заболеваний наиболее значимыми являются следующие компоненты: жирные кислоты, токолы, каротиноиды, фитостеролы. Жирные масла могут использоваться как в качестве самостоятельных лекарственных средств, так и в качестве основы для наружных дерматологических форм. Применение в медицине нашли многочисленные масла, такие как оливковое, персиковое, облепиховое, масло виноградных косточек и другие.

В качестве основы растительные масла выполняют питательную, защитную, транспортную роль. Жирные масла и твердые жиры в составе дерматологических средств способны увлажнять кожу, создавая на ее поверхности водонепроницаемую пленку. Животные жиры, содержащие насыщенные жирные кислоты, препятствуют испарению влаги с поверхности кожи.

Эмоленты на основе растительных масел замещают дефекты в роговом слое, восполняют недостаток липидов на поверхности кожи, регулируют степень окклюзии, действуют быстро и длительно [34]. Так как масла способны легко окисляться, в них добавляют антиоксиданты. В некоторых средствах используются масла, сами обладающие антиоксидантными свойствами – масло виноградных косточек, зародышей пшеницы и др. [58] Неомыляемые компоненты масел (такие как фитостеролы) оказывают противовоспалительный эффект [133].

1.2.1 Жирнокислотный состав растительных масел

Поскольку почти все дерматологические заболевания (псориаз, экзема, нейродермиты и другие виды дерматозов) чаще всего сопровождаются воспалением, наличие в местной ЛФ противовоспалительного агента очень важно. Причиной заболеваний нередко является нарушение липидного баланса кожи. [54] Липидный барьер кожи состоит из фосфолипидов и керамидов. На перемену состава липидного барьера влияют ферменты из клеток зернистого слоя. Жирорастворимая часть керамидов представлена полиненасыщенными жирными кислотами, например, линолевой. При отсутствии или недостаточном количестве линолевой кислоты на ее место встраивается олеиновая. При этом роговой слой утолщается, а проницаемость кожи увеличивается. В масле бурачника и черной смородины содержится значительное количество линолевой кислоты, что обуславливает их противовоспалительное действие [62]. Линолевая и линоленовая кислоты не синтезируются в организме и должны поступать извне [53]. Действие этих жирных кислот обусловлено двумя механизмами: во-первых, они являются предшественниками биологически-активных веществ; во-вторых, такие жирные кислоты способны непосредственно встраиваться в структуру межклеточного матрикса рогового слоя кожи [26]. Недостаток ненасыщенных жирных кислот нарушает барьерную функцию кожи. Существуют данные, что возникновение таких заболеваний, как атопический дерматит, псориаз, связано с недостатком $\Delta 6$ -десатуразы – фермента, превращающего линолевую кислоту в γ -линоленовую кислоту [16].

Линолевая кислота, являясь предшественником арахидоновой кислоты – медиатора воспаления (Схема 1.1), присутствует во многих растительных маслах.

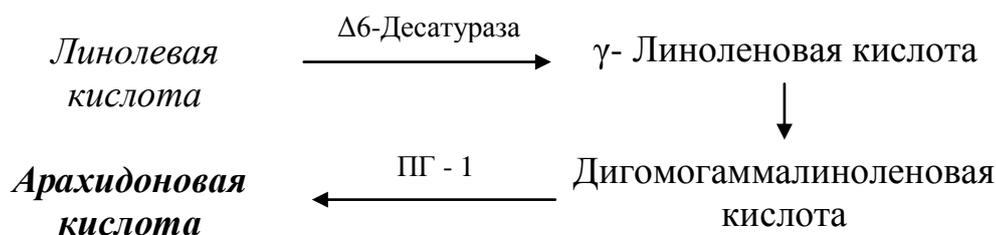


Схема 1.1. Метаболизм жирных кислот

В таблице 1.3 представлен жирнокислотный состав растительных масел, применяемых в составе дерматологических и косметических средств.

Таблица 1.3.

Сравнительный анализ жирнокислотного состава масел (%) [57, 70, 74, 81, 84, 111, 113]

№	Название масла	Ненасыщенные кислоты				Насыщенные кислоты	
		Пальмитолеиновая 16:1	Олеиновая 18:1	Линолевая 18:2	Линоленовая 18:3	Пальмитиновая 16:0	Стеариновая 18:0
1	Абрикосовое	1.4	55-70	25-35	1	3-6	2
2	Амаранта		22-26	46-50		19-20	3
3	Горчичное		45	32	14	4	
4	Кукурузное		30-49	40-56		8-11	2.5-4.5
5	Облепиховое	23-31	9-13	15-16	4-6	29-40	1.5
6	Пальмовое красное	0.1	45.9	13.8	0.5	35	3.8
7	Персиковое		60	до 35		до 8	
8	Рыжиковое		12-20	14-22	35-39	5-7	2-2.5
9	Тыквы семян		38	42		12.7	6
10	Шиповника		13-18	41-51	24-39	3-8	1-3

На основании приведенных литературных данных по жирнокислотному составу некоторых масел можно считать тыквенное масло одним из самых перспективных с точки зрения источника линолевой кислоты как регулятора воспалительных процессов.

1.2.2 Каротиноиды и их роль в снятии воспалительного процесса

На течение воспалительного процесса влияют также пигменты, входящие в состав масел – каротиноиды, хлорофиллы.

Каротиноиды обладают А-витаминной активностью, активируют ядерные ретиновые рецепторы, влияя таким образом на процессы пролиферации эпителия выводных протоков сальной железы и дифференцировку кератиноцитов. Каротиноиды проявляют противовоспалительное и иммуностропное действие в очаге поражения, ингибируя медиаторы воспаления [89]. Содержание каротиноидов в некоторых маслах приведено в таблице 1.4.

Таблица 1.4.

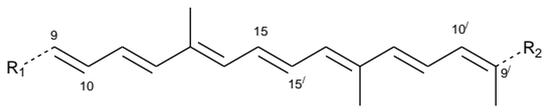
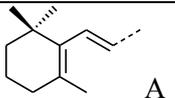
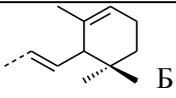
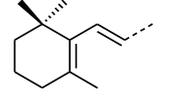
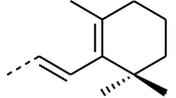
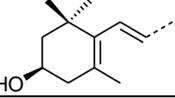
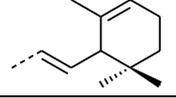
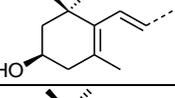
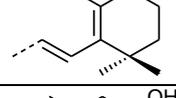
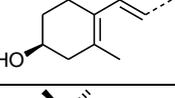
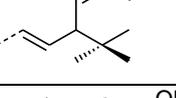
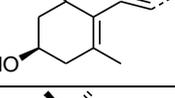
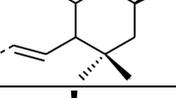
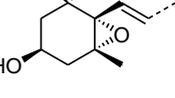
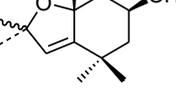
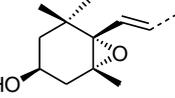
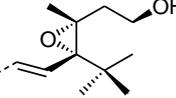
Содержание каротиноидов в некоторых маслах [91]

№	Название масла	Содержание каротиноидов, мг%
1	Абрикосовое масло	α -каротин (1.5)
2	Амаранта масло	β -каротин (20-120), α -криптоксантин (1-2), неоксантин (10-45), лютеин (20-30), виолаксантин (20-250), зеаксантин (6-20)
3	Горчичное масло	общее содержание 0.3
4	Кукурузное масло	α -каротин (0.23-0.3), ксантофил (2-5)
5	Облепиховое масло	общее содержание 314 – 2139
6	Пальмовое красное масло	α -каротин (23.6), β -каротин (18.5), ликопин (1.5), Общее содержание (54.5)
7	Персиковое масло	общее содержание 2.5
8	Рыжиковое масло	общее содержание 1.5
9	Тыквы семян масло	α -каротин (10-90), β -каротин (5-300), α -криптоксантин (2-7), <i>cis</i> – β - каротин (4.9-30), <i>cis</i> - ζ -каротин(1–30), α – зеакаротин (13), зейноксантин (6.3), лютеин (5-130), <i>cis</i> - лютеин (1-10), зеаксантин (9.7), тараксантин (3.6), виолаксантин (26), неоксантин (4.2)
10	Шиповника масло	общее содержание 50

Следует помнить, что при использовании масел, богатых каротиноидами, нередко возникают аллергические реакции в месте нанесения. При этом кожа начинает шелушиться, наблюдается гиперэмия. С точки зрения аллергенности наиболее опасным (содержит наибольшее количество каротиноидов) является облепиховое масло. Масло тыквы также насыщено каротиноидами, но при этом

аллергических реакций не вызывает (Таблица 1.5) (Регистр лекарственных средств, 2014).

Таблица 1.5.
Основные каротиноиды тыквы *Cucurbita pepo* и *Cucurbita maxima* [21, 75, 91, 143]

Каротиноид			λ_{\max} , нм
	R ₁	R ₂	
α -каротин			422, 445
β -каротин			425, 450
α -криптоксантин			428, 450
β -криптоксантин			450
лютеин			421, 445
зеаксантин			428, 450
лютеоксантин			—
виолаксантин			440

Процессы биосинтеза и биотрансформации определяют структуру и состав каротиноидов в процессе получения масла и его неправильного хранения по схеме:

α -ряд: α -каротин \rightarrow α -криптоксантин \rightleftharpoons лютеин \rightleftharpoons лютеоксантин

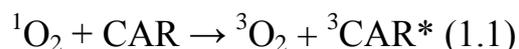
β -ряд: β -каротин \rightarrow β -криптоксантин \rightleftharpoons зеаксантин \rightleftharpoons виолаксантин

Преобразованию гидроксированных каротиноидов до эпокисоединений сопутствуют окисление и отщепление эпокисидной группы, при этом происходит

регенерация исходного каротиноида. В структуре виолаксантина присутствуют эпоксигруппы на обоих концах молекулы. Фотовосстановление в присутствии аскорбиновой кислоты приводит к атероксантину, а если восстановление затрагивает оба конца – образуется зеаксантин (виолаксантиновый цикл) [96].

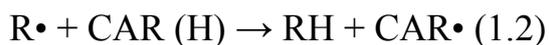
Наряду с противовоспалительным действием каротиноиды проявляют антиоксидантную активность.

Антиоксидантные свойства каротиноидов (CAR) определяются, главным образом, способностью физического захвата синглетного кислорода [95]:



Каротиноиды легко возвращаются в исходное состояние (CAR) из триплетной формы, выделяя энергию в виде теплоты. При этом каротиноиды сохраняют интактное состояние и могут дополнительно захватывать синглетный кислород ${}^1\text{O}_2$. Число конъюгированных двойных связей в молекуле каротиноидов прямо пропорционально энергии их возбужденного состояния и обратно пропорционально эффективности захвата каротиноидов, эпоксидная группа увеличивает способность к захвату. Триплетная форма каротиноидов - низкоэнергетическая, не способная к генерации других реагирующих частиц путем переноса энергии. Вместо диссипации энергии внутри молекулы тепло выделяется в окружающую среду. Кроме того, каротиноиды выполняют роль катализаторов, дезактивирующих синглетный кислород [95].

Вторым механизмом антиоксидантной активности каротиноидов является взаимодействие с радикалами, способными оторвать протон от каротиноида (1.2). В этом случае неспаренный электрон движется к каротиноиду (1.3) или образует аддукт с радикалом (1.4) [93].



Образовавшиеся аддукты с резонансно-стабилизированными центрами ингибируют ПОЛ, прекращая цепную реакцию. Эти соединения влияют на

эффективность захвата радикальных частиц. Такой процесс ведет к нарушению структуры каротиноидов, при этом происходит потеря цвета.

1.2.3 Влияние токолов на воспалительный процесс

Токоферолы и токотриенолы способствуют накоплению жирорастворимых витаминов в организме, снижают проницаемость сосудистой стенки, оказывают антитромботический и противовоспалительный эффекты. Токолы (структура представлена на рисунке 1.2) оказывают антиоксидантное действие, но антиоксидантный потенциал их значительно ниже, чем у каротиноидов. В связи с этим, каротиноиды защищают токоферолы, токотриенолы и липиды от преждевременного окисления. Влияя на клетки Т-супрессоры, токолы проявляют иммуностимулирующий эффект.

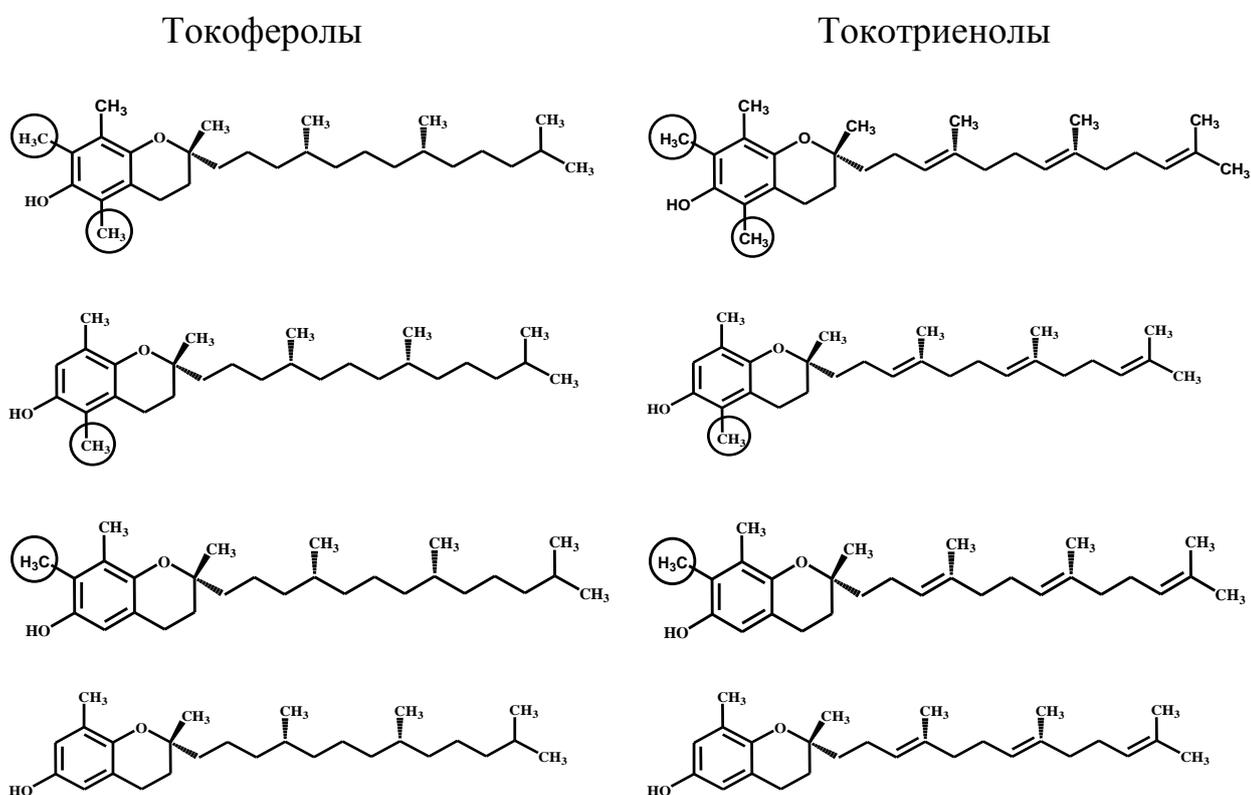


Рис. 1.2. Формулы токолов

Примечание: активен только один вид изомеров, $\pm D,L$ -формы цитотоксичны.

Общее содержание и качественный состав токолов в растительных маслах изменяется в зависимости от способа выделения жирного масла, места произрастания растения. Данные для некоторых пищевых масел представлены в таблице 1.6.

Таблица 1.6.

Сравнительная таблица содержания токоферолов в различных маслах [81, 87, 111, 113, 122, 141]

Растительное масло	Содержание токоферолов, мг%				Содержание токотриенолов, мг%				Общее содержание токолов, мг%
	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ	
Абрикосовое									70-80
Амаранта	10-23	25-55	5-15	20-40					50-130
Горчичное	2-3		6-12						5-15
Кукурузное									10-20
Облепиховое	60-200	10-15	1-180	8-45		8-15			100-200
Красное пальмовое	15-20				20-25		25-30	5-10	70-80
Персиковое									90-110
Рыжиковое									80-120
Тыквы семян	2-8		7-50	2-110	0,1-3		7-11	1-4	5-120
Шиповника									50-110

Ряд авторов показывают более высокую эффективность токотриенолов по сравнению с токоферолами. В частности, антиканцерогенная, гиполлипидэмическая, кардиопротекторная активность очень высоки для γ -токотриенола (Таблица 1.7).

Таблица 1.7.

Фармакологическая активность токолов [83, 110, 115, 123-128, 131-132, 135,137, 139-142]

Фармакологическое действие	Токоферолы				Токотриенолы			
	α-	β-	γ-	δ-	α-	β-	γ-	δ-
Антиоксидантное	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++
Е-витаминная активность	+++ 100 (2R)	25-50	8-19	0.1-3	21-50	4-5	++ -	- -
Антигипертензивное	++	+	++	+	+	-	++ -	-
Гиполипидэмическое	-	-	-	-	+	+	+++	+
Гепатопротекторное	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Противовоспалительное	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
Гемолиз (%)	100	15-27	3-20	0.3-2	17-25	1-5	-	-

Примечание: “-“обозначает отсутствие действия, “+” обозначает относительно средний эффект, “++” обозначает более высокую активность, и “+++” обозначает значительный фармакологический эффект (согласно литературным данным)

Антиоксидантное действие токолы проявляют совместно с каротиноидами.

1.2.4 Фитостеролы и их влияние на воспалительный процесс

Вместе с фосфолипидами фитостеролы и их производные входят в состав растительных клеточных мембран, являются предшественниками некоторых метаболитов, таких как растительные стероидные гормоны. Фитостеролы найдены во всех растительных маслах, но их качественный и количественный состав индивидуальны для каждого масла, что используется для их идентификации (Таблица 1.8, Рисунок 1.3) [78].

Образовавшийся в организме или полученный с пищей холестерин всасывается в кровь и встраивается в мицеллы липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) до удаления клетками. Благодаря сходству химической структуры β-ситостерола и холестерина, ситостерол способен взаимодействовать с ЛПНП в

плазме, оказывая гипохолестеринэмический эффект. Альтернативным путем гипохолестеринэмического действия является организация довольно стабильных комплексов β -ситостерола с холестерином, при этом затрудняется их всасывание из желудочно-кишечного тракта [79, 121, 130].

Таблица 1.8.

Содержание фитостеролов в некоторых растительных маслах (мг/100г) [109]

Название масла	Брассика-стерол	Кампестерол	Стигма-стерол	Ситостерол	Авенастерол	Общее содержание фитостеролов
Кукурузное		2-5	1-2	7-12	0-1	7-20
Подсолнечное		0-1	0-1	2-6	0-0.5	3-8
Соевое		0-1	0-1	1-3		2-6
Оливковое		0-0.5	0-0.5	1-3		2-6
Тыквы семян	5-10	3-7	2-6	100-150		120-200

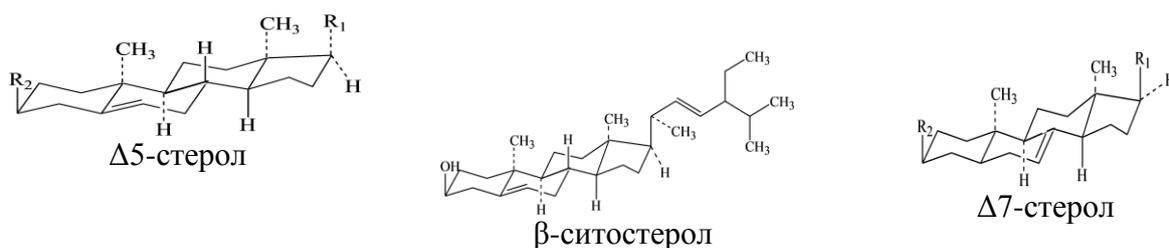


Рисунок 1.3. Структура некоторых фитостеролов, присутствующих в масле семян тыквы

Структурная схожесть фитостеролов с холестерином обуславливает их действие и в составе наружных дерматологических форм. Холестерин заключен между церамидами и свободными жирными кислотами. Его роль заключается в поддержании структуры эпидермиса. Фитостеролы способны встраиваться в мембрану вместо холестерина. Они ускоряют дифференцировку клеток и препятствуют неоангиогенезу, укрепляют структуру кожи, ингибируя разрушение волокон и протеогликанов ферментами [129].

Кроме того, фитостеролы обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным (бета-ситостерол) [129] действием. Эти свойства объясняются близкой к глюкокортикостероидным гормонам структурой.

Вывод по разделу 1.2

Растительные масла – уникальные поликомпонентные системы, содержащие комплекс ценнейших биологически активных веществ: жирные кислоты, каротиноиды, токоферолы и токотриенолы, фитостеролы. Различные фармакологические эффекты этих соединений позволяют включать масла в состав наружных дерматологических лекарственных форм, как средств с широким терапевтическим эффектом. Масло семян тыквы является перспективным компонентом лекарственных форм, так как содержит сбалансированный комплекс БАВ и получается из отечественного легкодоступного сырья.

1.3 Анализ компонентов растительных масел. Современные подходы.

1.3.1 Методики пробоподготовки растительных масел для определения токолов и фитостеролов

В растительных маслах определение токолов (токоферолов и токотриенолов) и фитостеролов проводится с использованием физико-химических методов. Наиболее распространены хроматографические методики: высокоэффективная жидкостная хроматография как в нормально-фазовом, так и в обращенно-фазовом режимах, и газовая хроматография. Идентификация и количественный анализ проводятся и использованием различных детекторов: ультрафиолетового, диодно-матричного, флуоресцентного, масс- и прочих.

Для определения токолов и фитостеролов с помощью нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (НФ-ВЭЖХ) и газовой хроматографии (ГХ) образцы масел растворялись в неполярных органических растворителях, чаще всего гексане, хлороформе или их смесях с другими растворителями.

В литературе описан ряд методик определения токолов и фитостеролов в маслах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ – ВЭЖХ). Перед анализом необходимо избавиться от сопутствующих веществ – жиров, белков, углеводов и т.д. Международный протокол пищевой аналитической химии регламентирует проведение омыления перед определением токолов в масле [86]. Под действием водного раствора щелочи (чаще всего 60-80 масс.% КОН) разрушаются эфирные связи липидов. В результате омыления ацетатные формы токоферолов и токотриенолов также преобразуются до свободных форм токолов. Объем щелочи варьирует в зависимости от количества присутствующих в масле липидов. В процессе омыления к образцу добавляется спирт этиловый 96%, который способен стабилизировать омыленный раствор и препятствовать осаждению солей жирных кислот. Соотношение щелочь:этанол:жир обычно выдерживается 3(г):15(мл):1(г), но может быть изменено в зависимости от типов жиров в образце. Для большинства пищевых масел достаточно омыления в течение 30 минут при 70°C.

Иногда проводится экстракция липидов до омыления во избежание мешающего влияния продуктов гидролиза белков и углеводов.

В процессе гидролиза образец подвергается длительной температурной обработке, анализируемые компоненты могут окисляться. Для предотвращения деструкции в систему вводят антиоксиданты, чаще всего, аскорбиновую кислоту или пиригаллол [86]. Кроме того, для защиты легкоокисляющихся соединений, через пробу перед омылением пропускают ток азота.

Схема окислительной реакции, происходящей с фитостеролами, представлена на рисунке 1.4.

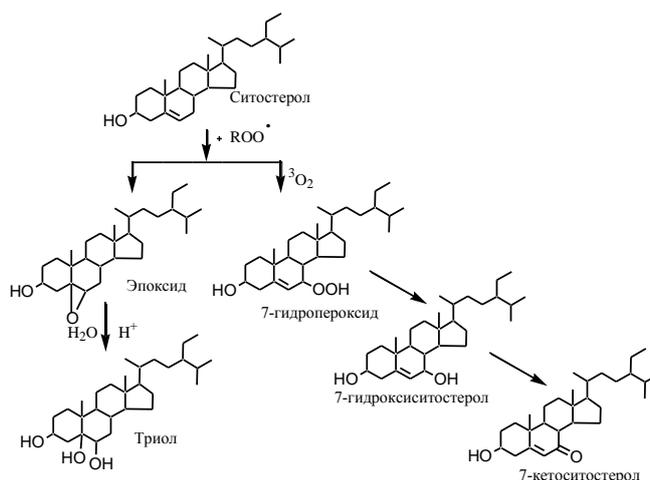


Рисунок 1.4. Химические превращения фитостеролов под воздействием окислителей [86]

Кроме того, особенностью омыления фитостеролов является невозможность использования кислотного гидролиза, так как он вызывает деструкцию $\Delta 7$ -фитостеролов [86].

После омыления к смеси добавляют органический растворитель с целью экстракции неомыляемых компонентов. Двухфазную систему пропускают через делительную воронку – в водной фазе остаются сопутствующие вещества, в органической – анализируемые компоненты. В качестве органического растворителя обычно используют гексан – он способен хорошо экстрагировать α -токоферол, тогда как остальные фракции токолов (β -, γ -, δ - формы) извлекаются неполностью. Для полного извлечения всех форм токолов применяют смесь гексан-этилацетат, но при этом соэкстрагируется часть полярных сопутствующих веществ. Другим приемом достижения полной экстракции является обработка смеси двумя-тремя порциями гексана – в конце органические фракции объединяют [86].

Гексановые извлечения выпаривают в токе азота или при низкой температуре под вакуумом во избежание окислительной деструкции. Сухой остаток после перегонки растворяют в необходимом количестве подвижной фазы.

1.3.2 Методики анализа токолов и фитостеролов в растительных маслах

Многочисленные литературные данные по условиям анализа токолов и фитостеролов в образцах растительных масел свидетельствуют об актуальности разработок по этой теме. Известные методики ВЭЖХ-анализа отличаются разнообразием используемых элюентов и детекторов. Данные по условиям хроматографирования приведены в таблице 1.9.

Таблица 1.9.

Условия хроматографирования токолов и фитостеролов методами нормально- и обращенно-фазовой ВЭЖХ

Известные методики [72, 77, 82, 85, 92, 94, 98-101, 107, 112, 116]	Условия анализа токолов		Условия анализа фитостеролов	
	НФ-ВЭЖХ	ОФ-ВЭЖХ	НФ-ВЭЖХ	ОФ-ВЭЖХ
	<p>ПФ: этилацетат/уксусная кислота/гексан 1:1:198 (v/v/v) Детектор: флуоресцентный (возбуждение 290 нм, эмиссия 330 нм) Колонка: 4.6 mm × 25 cm, 5-μm Supelcosil LC-Si</p>	<p>ПФ: метанол/ацетонитрил/метилен хлорид 25:22:3 (v/v/v) Детектор: ультрафиолетовый (295 нм) Колонка: 4.6 mm × 25 cm, 5-μm Supelco Discovery C18</p>	<p>ПФ: гексан/изопропанол 100:3 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый Колонка: μPorasil 300x3.9 mm</p>	<p>ПФ: спирт этиловый 96%/ацетонитрил или 15:85 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый (198 нм) Колонка: 4.6 mm × 25 cm, 5-μm, C18, t = 25°C, v = 1 мл/мин</p>
	<p>ПФ: н-гексан/изопропанол 99:1 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый (295 нм) Колонка: 4.6 mm × 25 cm, 5-μm Lichrosorb Si60-5, t = 25°C, v = 1 мл/мин</p>	<p>ПФ: метанол/ацетонитрил 50:50 (v/v) Детектор: флуоресцентный (возбуждение 290 нм, эмиссия 325 нм) Колонка: 4.6 mm × 25 cm, 5-μm Alltima RP C-18 или Колонка: 3.9 mm × 150 mm, 5-μm Symmetry C-18, v = 1 мл/мин, t = 25°C, v = 1 мл/мин</p>	<p>ПФ: гексан/хлороформ 6:4 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый Колонка: μPorasil 300x3.9 mm</p>	<p>ПФ: метанол/вода 86:14 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый (208 нм) Колонка: 2.1 mm × 150 mm, 5-μm, C8</p>

Таблица 1.9 (продолжение)

	ПФ: 1,4-диоксан / н-гексан 3.5:96.5 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый (295) флуоресцентный (возбуждение 290 нм, эмиссия 330 нм) Колонка: 3 mm × 25 cm, 5-μm, t = 25°C, v = 0.7 мл/мин	ПФ: метанол/вода 96:4 (v/v) Детектор: диодноматричный (292 нм) Колонка: 4.4 mm × 150 mm, 5-μm Alltima RP C-18, t = 45°C, v = 2 мл/мин	ПФ: хлороформ/метанол 6:4 (v/v) Детектор: ультрафиолетовый Колонка: Ругосcarbon Si. 10μ 150X4.6 mm	ПФ: метанол/вода 80:20 (v/v) Детектор: диодноматричный нм Колонка: 4.6 mm × 250 mm, 5-μm, C8 или Колонка: 2 mm × 150 mm, 3-μm, C8
--	---	---	--	---

В некоторых случаях при анализе компонентов использовали внутренние стандарты: δ-токоферолов для токолов при условии отсутствия этой формы в образце; холестерин для фитостеролов.

Хроматограммы токолов из масла рисовых отрубей, полученные методом ОФ-ВЭЖХ с использованием УФ-детектора представлены на рисунке 1.5.

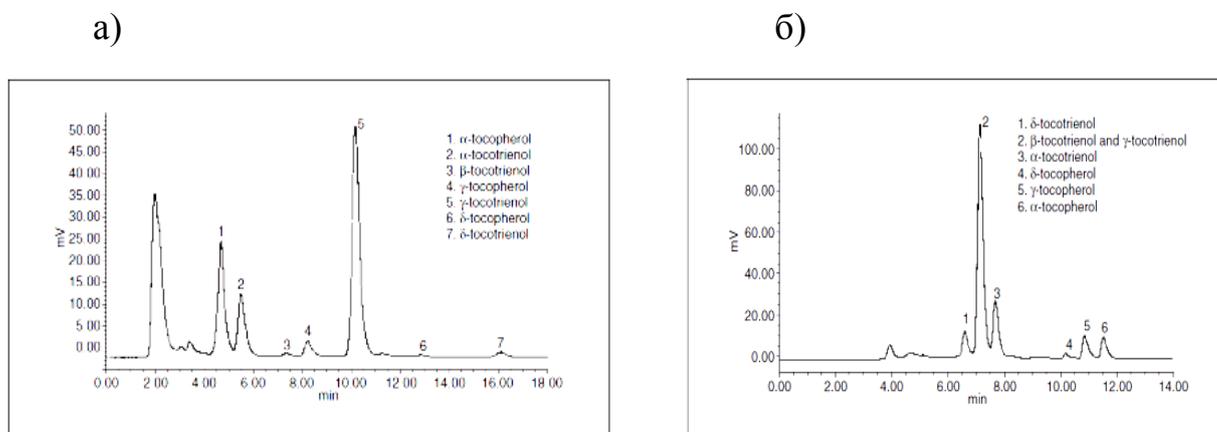


Рисунок 1.5. Хроматограммы образцов масла рисовых отрубей, полученные методами: а) НФ-ВЭЖХ; б) ОФ-ВЭЖХ [86].

В работе [77] показано, что флуоресцентная детекция токолов дает лучший уровень сигнала соединений, чем ультрафиолетовая (Рисунок 1.6).

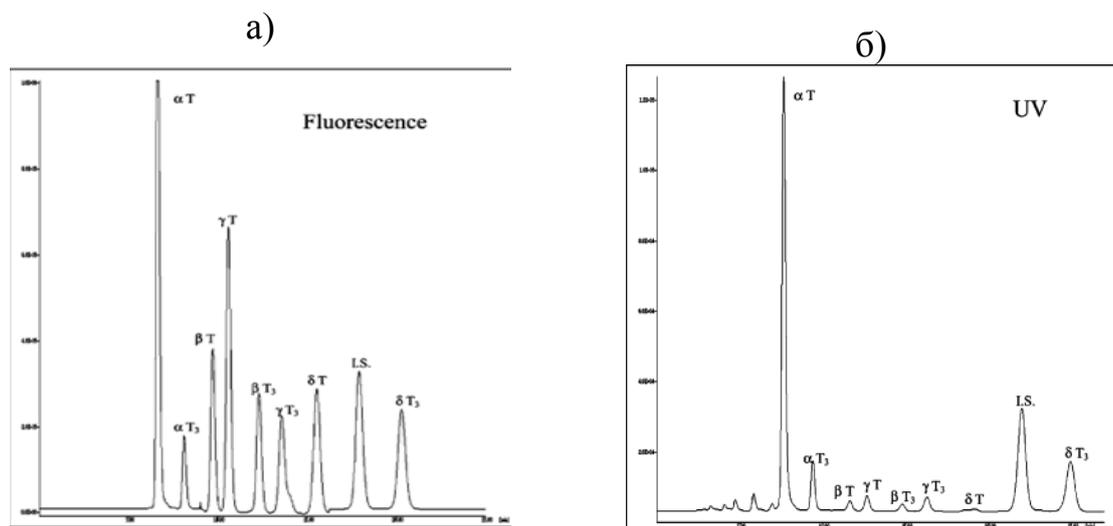


Рисунок 1.6. Хроматограмма смеси стандартных растворов токоферолов и токотриенолов при: а) флуоресцентном детектировании; б) ультрафиолетовом детектировании [77]

Определение фитостеролов часто проводят методом газовой хроматографии (ГХ) (Рисунок 1.7).

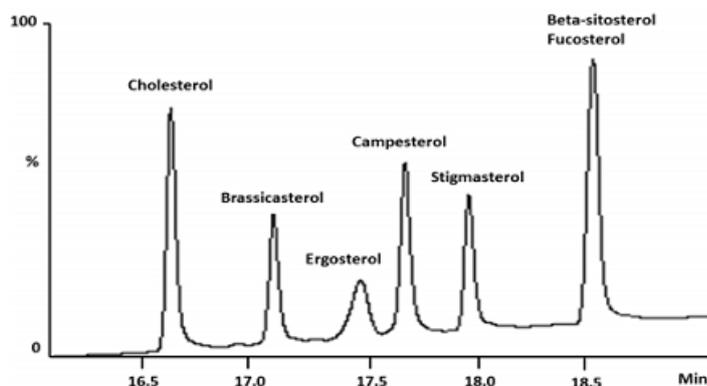


Рисунок 1.7. Газовая хроматограмма смеси стандартных образцов фитостеролов [112]

В соответствии с ГФ XII α -токоферола ацетат определяют методом ГХ с применением внутреннего стандарта дотриокантана и пламенно-ионизационного детектора. В Фармакопее США USP 3.0 описана методика определения α -токоферола, его ацетата и сукцината, а также смеси изомеров (β -, α -, δ - и γ -), полученной из растительных масел, методом ГХ с применением пламенно-

ионизационного детектора. В качестве внутреннего стандарта в анализируемую пробу вводят гексадецилгексадеканат. Следует отметить, что в предлагаемых условиях не наблюдается разделения пиков β - и γ -токоферолов.

Кроме хроматографических методов для анализа токолов используются химические (титриметрия), электрохимические (напр., полярография), спектрофотометрические, поляриметрия, рефрактометрия, ЯМР-спектроскопия [61].

1.3.3 Методы определения каротиноидов

Определение каротиноидов основано на их физико-химических свойствах.

Наиболее распространенным методом анализа каротиноидов является спектроскопия в УФ и видимой области (Рисунок 1.8) [76].

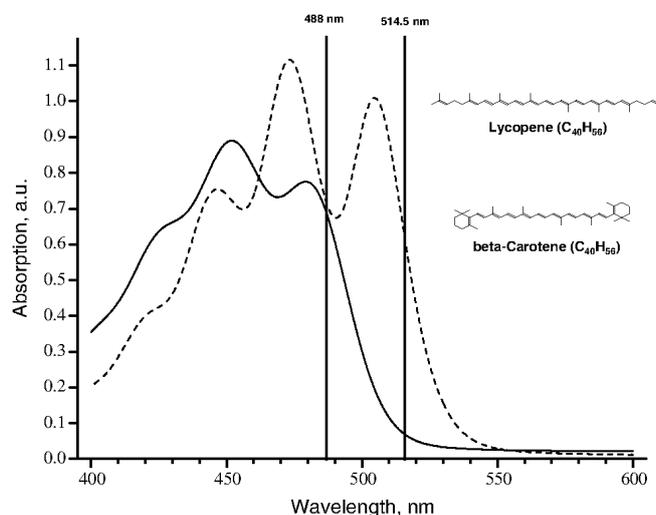


Рисунок 1.8. УФ-спектр стандартных образцов β -каротина и ликопина [88]

Установление структуры каротиноидов, как правило, проводится методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса.

Установление подлинности каротиноидов проводят с помощью метода спектрометрии в инфракрасной области. Анализ соединений проводится также с использованием метода масс-спектропии (возможно, в сочетании с ВЭЖХ).

Структура каротиноидов (полиеновые фрагменты, стерические эффекты, циклические концевые группы), а также природа растворителя обуславливают положение максимумов светопоглощения. Чаще всего спектры поглощения каротиноидов имеют 3 максимума поглощения или 2 максимума поглощения и плечо. В работе [35] проведен сравнительный анализ электронных спектров некоторых каротиноидов, который показал зависимость интенсивности поглощения от числа сопряженных связей в молекуле. Чем длиннее цепочка сопряженных связей, тем выраженнее батохромный сдвиг полос поглощения. В то же время концевые циклы в молекуле увеличивают вероятность гипсохромного сдвига. В итоге взаимного влияния фрагментов молекулы авторы приходят к следующему выводу: чем больше сопряженных связей и меньше концевых циклов в молекуле, тем более выражен батохромный сдвиг максимумов поглощения; большое количество концевых циклических фрагментов при равном количестве сопряженных связей предполагает гипсохромный сдвиг полос поглощения.

1.3.4 Методы анализа жирнокислотного состава масел

Согласно ГОСТ 30418-96 «Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава» и ГОСТ Р 51483-99 "Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме" жирнокислотный состав масел определяется с помощью метода газовой хроматографии с предварительной пробоподготовкой – получением метиловых эфиров жирных кислот (Рисунок 1.9). Использование этого метода позволяет идентифицировать масла, определить количество примесей. Получение и хранение жирного масла контролируют по соотношению изомерных форм жирных кислот.

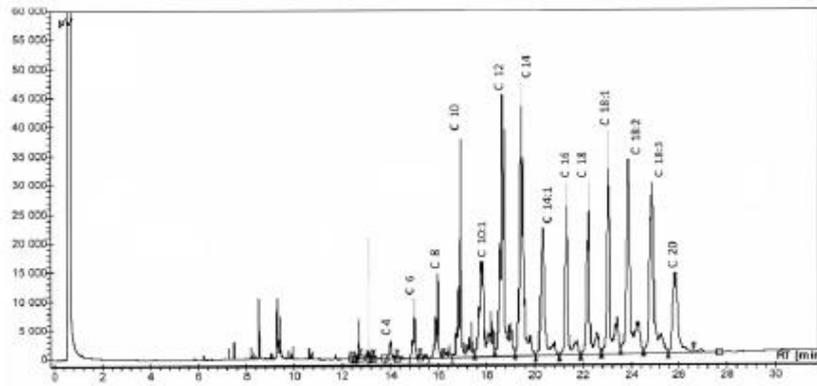


Рисунок 1.9. Газовая хроматограмма заменителя молочного жира

В ряде работ предпочтение отдается капиллярным колонкам различной полярности [44]. Разделение метиловых эфиров жирных кислот на неполярных колонках затруднено, так как они не дают нужной степени разрешения пиков. Режим хроматографирования устанавливается с учетом увеличения температуры термостата.

Идентификация пиков на хроматограмме проводится путем сопоставления полученных данных времен удерживания пиков с табличными величинами или, используя градуировочные графики стандартных смесей метиловых эфиров жирных кислот (либо метиловых эфиров жирных кислот жиров известного состава) (Рисунок 1.10).

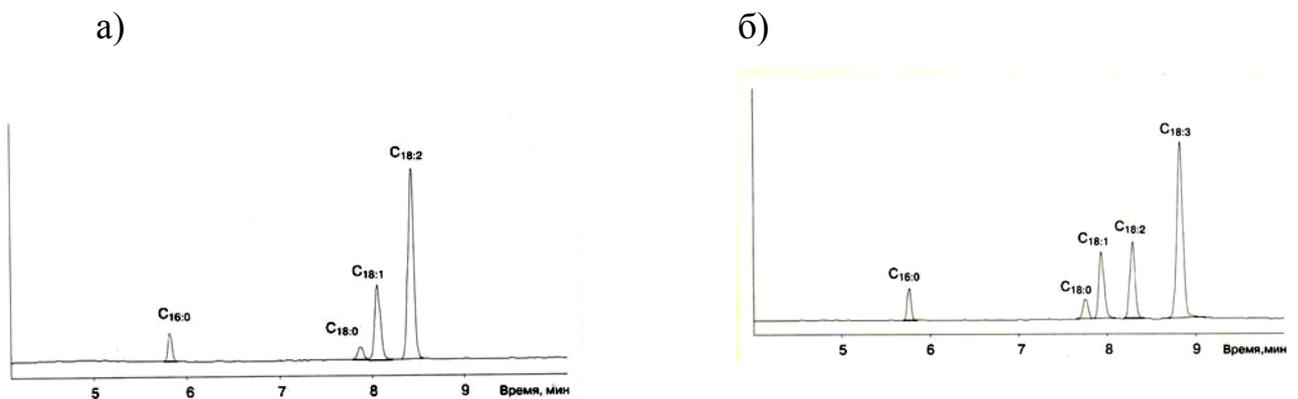


Рисунок 1.10. Газовые хроматограммы: а) подсолнечного масла; б) льняного масла ($t_{\text{колонки}} = 270^{\circ}\text{C}$, носитель – N_2)

В качестве градуировочных образцов используются следующие масла: подсолнечное, высокоолеиновое подсолнечное, льняное, горчичное, кокосовое, пальмоядровое.

Выводы по разделу 1.3

Поликомпонентный состав масла обуславливает необходимость применения различных методик анализа для каждого из компонентов. Чаще всего токолы и фитостеролы анализируются методом ВЭЖХ, каротиноиды – УФ-спектроскопии, а жирнокислотный состав определяется методом газовой хроматографии. Условия анализа также определяют сложный процесс пробоподготовки, особенностью которого является введение дополнительного количества антиоксидантов с целью сохранения качественного и количественного состава компонентов.

1.4 Бетулин как потенциальный компонент лекарственных средств

В березовой коре содержатся разнообразные классы биологически активных веществ. В бересте различных видов берез преобладают пентациклические тритерпеноиды ряда лупана и β-амирина. Бетулин – самый распространенный тритерпеноид, содержание которого в бересте может составлять свыше 35% (Рисунок 1.11) [104].

Тритерпеновый спирт $C_{30}H_{50}O_2$ в литературе встречается под названиями «бетулин» и «бетулинол» [30].

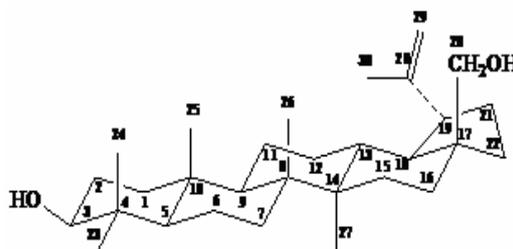


Рисунок 1.11. Структура бетулина (3β,28-дигидрокси-20(29)-лупен)

Основными преимуществами, выделяющими бетулин среди других подобных соединений, являются: доступная сырьевая база, высокое содержание основного продукта в сырье, относительная лёгкость выделения субстанции.

1.4.1 Физико-химические свойства бетулина

Субстанция бетулина представляет собой игольчатые кристаллы без вкуса и запаха от белого до светло-бежевого цвета.

Соединение характеризуется высокой температурой плавления (240-260°C), инертными свойствами, что обеспечивает устойчивость бетулина к воздействию различных факторов среды. Бетулин устойчив к действию кислорода и солнечного цвета, не токсичен (относится к четвёртому классу опасности) [60]. Как соединение, относящееся к классу тритерпеноидов, бетулин обладает поверхностной активностью, проявляет свойства эмульгатора и структурообразователя.

Бетулин мало растворим в органических неполярных растворителях (бензоле, бутаноле), жирных маслах. К недостаткам этого соединения следует отнести его низкую растворимость в полярных растворителях (этанол, изопропанол, вода). Это создает трудность как с точки зрения биодоступности соединения, так и с технологической стороны – введение бетулина в состав лекарственных форм.

В последнее время проводятся работы, направленные на увеличение растворимости бетулина различными способами. Ряд исследователей предлагают методики получения эфиров бетулина – в частности, сульфатов. Сульфатирование тритерпеноидов проводится с использованием серной кислоты и комплексов серного ангидрида с пиридином, диметилсульфоксидом или диоксаном. Доказательством получения комплексов являются данные ИК- и ЯМР ^{13}C -спектров. В ИК-спектрах полученных соединений наблюдаются новые полосы поглощения, характерные для сульфо-группы в области 820 и 1246 см^{-1} .

Химический сдвиг в области 28 атома углерода в ЯМР-спектре сульфата бетулина свидетельствует о полном замещении гидроксильной группы на сульфогруппу [20].

Направление других работ посвящено получению комплексов тритерпеноида с полимерами путем механо-химической активации [40]. Такой способ обработки ЛВ ведет к их диспергированию и изменениям в кристаллической структуре, что способствует повышению растворимости субстанций. Введенный полимерный компонент способен стабилизировать вновь полученную структуру путем плакирования частиц и/или образования водородных связей. В качестве такого стабилизатора часто выступают водорастворимые полимеры или олигомеры, например арабиногалактан, поливинилпирролидон, циклодекстрин и др. [117] Так, например, в работах Маляра Ю.Н. в качестве сорастворяющих агентов были использованы водорастворимые синтетические полимеры аэросила с полиэтиленгликолем, поливинилпирролидон и природный полимер арабиногалактан. Варьируя время и силу механо-химической обработки в ударно-шаровой мельнице, исследователям удалось получить комплексы бетулина с полимерами, доказательством образования которых являлось появление новых полос поглощения в ИК-спектрах продуктов (область валентных колебаний ОН-групп ($3200 - 3500 \text{ см}^{-1}$). После растворения комплексов полимер: бетулин различного состава в воде концентрация бетулина увеличивалась в 3-20 раз [40].

В работе [69] представлены электронно-сканирующие изображения бетулина и его механоактивированных композитов с ПВП и ПЭГ, где хорошо видна структура исходного бетулина и полученных соединений (Рисунок 1.12).

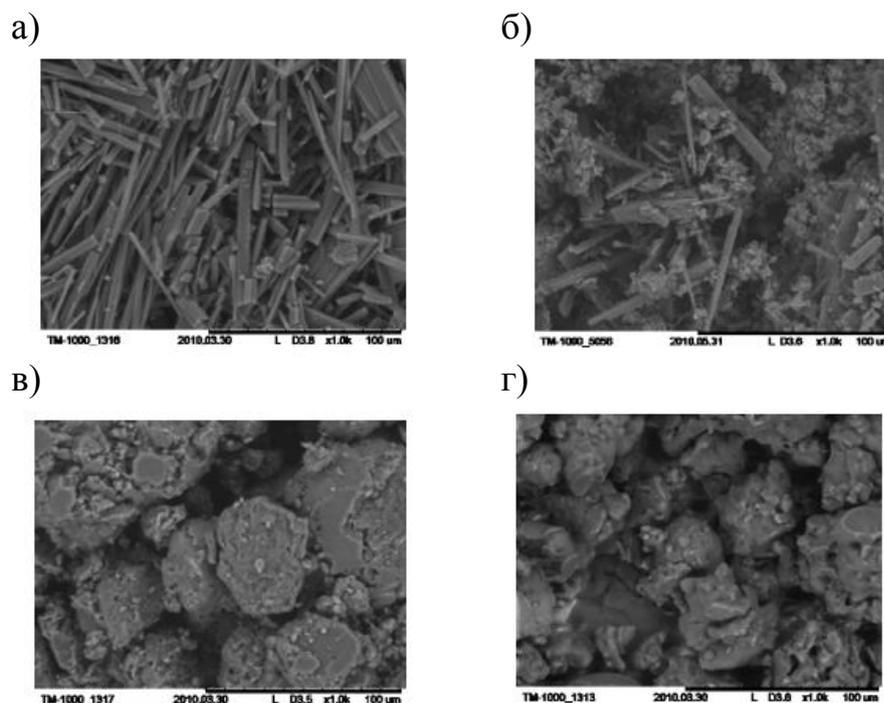


Рисунок 1.12. Электронно-сканирующие изображения: а) бетулина, перекристаллизованного из спирта этилового 96%; б) механо-активированного бетулина; в) механо-активированного композита бетулин-полиэтиленгликоль; г) механо-активированного композита бетулин-поливинилпирролидон

Большой эффект был получен при добавлении к смеси небольшого количества спирта этилового 96%. Авторы предполагают, что это могло быть связано с пластифицирующим влиянием на полимер.

Еще одним способом увеличения растворимости бетулина является получение комплексов включения тритерпеноида с циклодекстринами [90].

Полимер способен образовывать полость, в которую может встраиваться гидрофобная молекула, при этом сама структура сохраняет гидрофильность за счет внешних гидроксильных радикалов.

1.4.2 Фармакологические свойства бетулина

Бетулин – малотоксичное соединение (4 класс токсичности): полуметальная доза бетулина при приеме внутрь составляет 9000 мг/кг. Бетулин не проявляет

аллергенного, кожнораздражающего, сенсибилизирующего, канцерогенного, мутагенного, эмбриотоксического или кумулятивного эффектов [60]. Структура тритерпеноида обуславливает его сродство к биологическим мембранам клеток человека. Многочисленные биологические исследования свидетельствуют о высокой биологической активности бетулина.

В ряде работ показана противовоспалительная активность тритерпеноида. Было установлено что при введении внутрь и наружной обработки ран суспензией бетулина в концентрации 0,5 мг/кг на примере модели «ватной гранулемы», тритерпеноид оказывает выраженный противовоспалительный эффект как на стадии экссудации, так и в пролиферативной фазе [29].

Противоаллергическое действие бетулина было доказано на модели сенсибилизации раствором белка куриного яйца при внутрибрюшинном введении [24]. Некоторые авторы показывают антибактериальный эффект соединения относительно штаммов *E.coli* (Mutai С., 2009). В то же время другие работы не доказывают такого действия тритерпеноида. [60] В ряде работ также было изучено гепатопротекторное действие суспензии бетулина. В работах Михайленко М.А. и соавт. [42] исследованы фармакологические свойства механокомпозитов бетулина с полимерами, а именно, гастропротекторная, противоязвенная активность. При этом данные виды действий наилучшим образом проявились в группе, где применялся механически активированный бетулин. Там концентрация введенного тритерпеноида значительно меньше, чем в параллельной группе, в которой применялась суспензия исходного бетулина. При этом фармакологическая активность была существенно выше. Кроме этого, была исследована противоопухолевая активность на асцитной карциноме Эрлиха. В опыте композиты бетулина с полимерами препятствовали клеточному делению. Противоопухолевая и хемотерапевтическая активность бетулина наиболее подробно рассмотрена в обзоре [33]. Отмечается низкая цитотоксичность бетулина к нормальным клеткам. Несмотря на то, что антинеопластический механизм действия бетулина до конца не выяснен, предлагается использовать бетулин в комбинации с наиболее широко известными химио-терапевтическими

препаратами, предполагая, что синергетический эффект способствует удалению опухолевых клеток, включая лекарственно устойчивые клетки. Основная область терапевтического применения в настоящее время - это онкологические заболевания кожи.

Антиоксидантный эффект бетулина определялся по уровню активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и продуктов окисления липидов [32].

В работах Сергеева Д.В. [56] были показаны репаративные свойства бетулина на модели полнослойной кожно-плоскостной раны у крыс. Наибольшей эффективностью обладала бетулиновая мазь с содержанием бетулина в концентрации 0,5%. Исследуемая мазь оказывала выраженное противоожоговое действие, не уступая препарату сравнения «Пантенол».

Известно также антирахитное, гипохолестеринэмическое, желчегонное, иммуностимулирующее и противовирусное действие бетулина [60].

Считается общепринятым, что механизм действия бетулина связан со структурной схожестью соединения с глюкокортикостероидами. Соединяясь с глюкокортикостероидными рецепторами, бетулин влияет на синтез простагландинов, лейкотриенов и других агентов воспаления и иммуносупрессии. При этом бетулин лишен недостатков, присущих стероидным гормонам. Кроме того, для бетулина свойственно холестеринопободное действие, что также связано с его структурой. Антиатеросклеротическое и гепатопротекторное действие вещества, вероятно, обусловлено, замещением бетулином холестерина в липопротеинах. Схожесть с холестерином также обуславливает влияние бетулина на кожу – регенерирующий и ранозаживляющий эффект.

1.4.3 Патентно-информационные исследования применения бетулина в наружных лекарственных средствах

Проведенный в рамках данной работы патентный поиск среди отечественных источников выявил интенсивность исследований в области разработок наружных композиций с бетулином.

Наружные лекарственные формы с бетулином представлены композициями на гидрофильной и липофильной основе.

Гидрофильный гель с бетулином и β -циклодекстрином показал высокую антимикробную активность, а также оказался эффективен в отношении вируса герпеса. Бетулин в этом случае помещали в раствор циклодекстрина в воде, а затем добавляли оставшиеся ингредиенты [52].

Согласно другим источникам, бетулин, проявляющий низкий бактерицидный эффект, может быть использован в комбинации с антимикробными компонентами типа катамина АБ, мирамистина, сульфаниламида, триметоприма или триклоана. Бетулин использовался в виде водной дисперсии наночастиц с размером от 200 до 1000 нм. Полученная композиция обладала хорошей ранозаживляющей и противовоспалительной (на модели ожога ушной раковины кролика) способностью. Композицию предлагалось выполнить в виде мази на бентонитовой основе, крема, геля, аэрозоля или пленки [51].

Разработана композиция бетулина с биосовместимыми носителями – поливинилпирролидоном и полиэтиленгликолем. Опытным путем установлено оптимальное соотношение компонентов композиции и условия ее активации – время и сила механического воздействия [50].

Композиция нескольких тритерпеноидов, полученная путем толуольной экстракции бересты, обладала выраженным антиаллергенным эффектом. Исследования фармакологического эффекта изучалось при проведении

комплексной терапии бронхиальной астмы. Полученный продукт не обладал побочными действиями [49].

Для введения в состав косметических средств разработана композиция бетулина в растительном масле с использованием гидрофильных и липофильных поверхностно-активных веществ. В качестве жировой фазы используют оливковое, соевое или касторовое масла. В расплавленную смесь ПАВов вводят сухой бетулин, добавляют растительное масла и доводят температуру композиции до 100-120°C. Высокодисперсное коллоидное состояние бетулина при введении в состав готовых форм позволяет хорошо проникать тритерпеноиду в эпидермис и оказывать более эффективное воздействие на кожу [48].

Композиция, содержащая бетулин, также может быть выполнена в виде пудры-присыпки. За счет присутствия тритерпеноида пудра обладает противовоспалительным и десенсибилизирующим действиями [47].

В иностранных патентных продуктах также встречаются разработки, посвященные наружным дерматологическим формам с бетулином.

В патенте № EP2384741 A2 «Topical product» представлена композиция, компонентами которой являются бетулин в концентрации 0,05-0,23 масс%, оливковое масло 1-10 масс%, аллантоин 0,1-1,0 масс.% и вспомогательные вещества. Композиция обладает антисептическим, слабо выраженным регенерантным и репаратным действием, эффективна при лечении псориаза и экземы, уменьшает зуд после укуса насекомых. Фармацевтическая композиция может быть представлена в виде крема, мазей, гелей и лосьонов.

1.4.4 Обзор рынка лекарственных и лечебно-косметических форм с бетулином

На настоящий момент современный отечественный фармацевтический рынок бедно представлен средствами с бетулином. В основном это биологически активные добавки к пище, проявляющие гепатопротекторное,

антихолестеринэмическое действие. Наружные бетулинсодержащие формы (Таблица 1.10) официально не зарегистрированы в качестве лекарственных препаратов: по большей части, это косметические средства.

Таблица 1.10.

Некоторые торговые наименования наружных средств с бетулином

Торговое наименование	Действующие компоненты	Заявленный эффект
«Звёздная пыль» пудра-присыпка с бетулином	Паста хвойная хлорофилло-каротиновая, медные производные хлорофилла, бетулин	Устраняет потливость, снимает раздражение, обладает противовоспалительным, подсушивающим, антисептическим эффектом
Крем для лица для проблемной кожи ReviLine	Пептидный комплекс А-6, экстракт бересты “Бетулавит”®, , экстракты шалфея, ромашки и календулы, облепиховое масло	Противовоспалительный, регенерирующий эффект
Крем «Чистая кожа» против сеточек и звездочек	Пептидный комплекс А-3, экстракт корня солодки, бересты “Бетулавит”®, экстракт гаммелиса, масло виноградной косточки	Нормализация водно-солевого обмена в коже, капилляроукрепляющее действие, антибактериальный эффект
Крем «Гистан»	Экстракты: березовых почек, вероники колосистой, травы молочая, череды трехраздельной, фиалки трехцветной, травы водянки, цветков календулы; пептидный экстракт люпина, бетулин, масло ландыша	Противоаллергическое, противозудное

Вывод по разделу 1.4

Бетулин – субстанция, выделенная из отечественного сырья – обладает комплексом ценнейших фармакологических эффектов, при этом недостатком бетулина является плохая растворимость как в воде, так и в органических неполярных растворителях и маслах, что в свою очередь ухудшает биодоступность. Работы по увеличению биодоступности соединения позволили ввести новые технологические операции (получение солевых форм, комплексов включения) для более широкого применения бетулина. Структурные особенности

вещества свидетельствуют о необходимости механо-химической обработки соединения.

Общие выводы по главе 1.

1. На фармацевтическом рынке наружные ЛС противовоспалительного и ранозаживляющего действия на основе природных компонентов представлены недостаточно. ТрITERпеноидный спирт – бетулин и масло семян тыквы могут являться активными компонентами противовоспалительных ЛС, тогда как лекарственные средства такого состава отсутствуют.

2. Существуют серьезные проблемы по созданию унифицированных методик контроля качества масла семян тыквы по показателям количественное содержание токотриенолов и токоферолов, фитостеролов и каротиноидов.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1 Материалы и реактивы

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, полученная методом, указанным в приложении 4); 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); спирт этиловый 96% (ГОСТ 51652 2000); гексан марки х.ч.; метанол марки о.с.ч.; дихлорметан марки о.с.ч.; глицерин (ГОСТ 6824-96); ацетонитрил для хроматографии сорт 0 (ТУ 2636-040-44493179-00); стеариновая кислота (ГОСТ 6484-96); аскорбилпальмитат (ГОСТ Р 55517-2013); аллантиин (CAS 97-59-6); цетилстеариловый спирт CAS № 67762-30-5; цетеарет-25 (CAS 68439-49-6); глицерилстеарат (CAS 31566-31-1); левомицетин (ФС 42-3679-98); натрия аскорбат (рег. №: ЛС-000423 от 31.08.10); 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.

2.2 Методы исследования и приборы

Методы исследования и приборы: Электронные спектры поглощения получали на приборе «Bioline Specord S-100» (Analytik Jena, Germany); ИК-

спектры снимали на ИК-спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan) (табл. KBr); *ВЭЖ-хроматограммы* получали на ВЭЖ-хроматографе «LC-20Avp» (Shimadzu, Japan) в обращено-фазовом режиме с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки и диодно-матричным детектором, колонка Discovery C¹⁸ (25 cm x 4.6 mm, 5 μ m, Supelco); *атомно-силовая микроскопия*: топографию перенесенных слоев исследовали на сканирующем зондовом микроскопе "Solver Bio NT-MDT" (г. Зеленоград) в неконтактном режиме и на приборе Solver – P – 47 (г. Зеленоград) в полуконтактном режиме; микрометр цифровой МКЦ 50-75 кл.1 Калиброн; весы аналитические MS104S Analytical Balance; биохемиллюминиметр 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 MBM-100, термощкаф лабораторный ТЛ-120.

Биомиметические исследования проникания бетулина через липидный барьер на модели монослоев лецитина на межфазной границе «вода-воздух» изучали на установке KSV Nima, Sweden и на опытной установке, схема которой приведена на рисунке 2.1.

Методика получения лецитинового монослоя как модели фосфолипидной мембраны. Для получения монослоев лецитина и смешанных пленок лецитин-бетулин использовали смесь метанол:хлороформ (9:1) в концентрации 1 мг/мл.

После испарения растворителя липидный слой сжимали и фиксировали параметры изотермы сжатия $\pi(A)$.

Предельную молекулярную площадь A_0 лецитина в монослое определяли графическим путем экстраполяцией линейного участка изотермы сжатия $\pi - A$ на ось абсцисс ($\pi=0$).

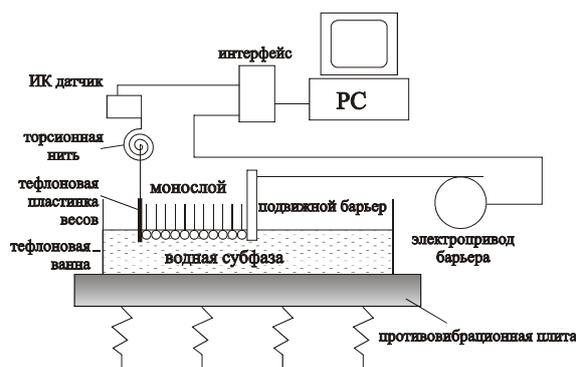


Рисунок 2.1. Схема прибора для формирования пленок Ленгмюра

Молекулярную площадь A_0 в монослое определяли графически вблизи точки коллапса, в которой монослой разрушается $\pi_{\text{коллапса}}$ (плотнупакованный монослой) путем экстраполяции спадающего участка изотермы $\pi=f(A)$ на ось абсцисс ($\pi = 0$) (Рисунок 2.2).

Модуль сжатия как характеристику жесткости монослоя определяли через величину $C_S^{-1} = A_0(d\pi/dA) \left[\frac{MH}{M} \right]$

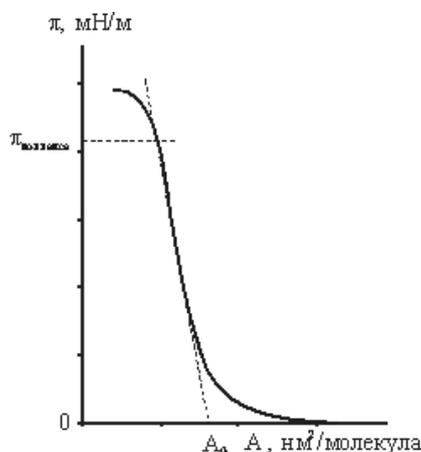


Рисунок 2.2. Типичная изотерма сжатия $\pi=f(A)$, $\pi_{\text{коллапса}}$ - точка коллапса, в которой монослой разрушается.

Анализ каротиноидов. Оптическую плотность (A) стандартных растворов МСТ или фитопрепарата бетулина и тимола в МСТ и испытуемого раствора измеряли три раза (раствор сравнения - гексан).

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

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

где $A_{\text{набл.}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора МСТ или 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° – концентрация равнялась 10 мг/мл, что соответствует концентрации 1% раствора.

ВЭЖХ-анализ токолов, β -ситостерола и бетулина. Все измерения проводили в изократическом режиме при скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин, объем инъекции составлял 20 μ л. *Условия хроматографирования токолов:* подвижная фаза: метанол/ацетонитрил/дихлорметан 50:44:6 (v/v/v), температура термостата 30°C, длина волны детектирования - 284 нм, время анализа 30 мин. *Условия хроматографирования β -ситостерола:* подвижная фаза: спирт этиловый 96%/ацетонитрил 15:85 (v/v), температура термостата 40°C, длина волны детектирования - 210 нм, время анализа 30 мин. *Условия хроматографирования бетулина:* подвижная фаза: ацетонитрил/вода 90:10 (v/v), температура термостата 40°C, длины волн детектирования - 206 и 210 нм, время анализа 20 мин.

ГХ-анализ жирных кислот проводили при следующих параметрах: в качестве газа-носителя использовался гелий (расход 40 см³/мин); температурный режим: температура T_1 колонки 100°C (выдержка 1 мин), T_2 от 100 до 180°C, скорость 20 град/мин (20 мин), T_3 от 180 до 190°C, T_4 от 190 до 240°C, скорость 2 град/мин (5,0 мин), T_3 от 210 до 280°C, скорость 2 град/мин (2,5 мин). Объем вводимой пробы составлял 1.0 мкл без деления потока.

Концентрации стандартных растворов

Исходная стандартная субстанция	C ₀ , %	C, стандартных растворов
бетулин	98	0.063; 0.125; 0.250; 0.500; 1.000 мг\мл
β-ситостерол	95	0.052; 0.078; 0.260 мг\мл
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

Получение модельных смесей 1, 2, 3: бетулин 0.1 г (точная навеска) помещали в ступку, растирали в присутствии 1 мл спирта этилового 96%, к бетулину добавляли 0.5 г тимола, 0.2 г аскорбиновой кислоты, в конце вводили 0.5; 1.0 и 2.0 г МСТ.

Получение модельных смесей 4, 5, 6 проводили аналогично процедуре получения модельных смесей 1,2,3, при этом бетулин был взят в количестве 0.05 г; 0.1 г; 0.15 г. Другие компоненты: 0.5 г тимола; 0.2 г аскорбиновой кислоты; 2.0 г МСТ.

2.3 Методики пробоподготовки

Пробоподготовка анализируемых образцов для определения токоферолов и фитостеролов. К модельной смеси при перемешивании добавляли 50 мл спирта этилового 96%, после растворения к смеси добавляли 60 масс.% водного раствора КОН (30 мл), затем образец нагревали с обратным холодильником при 70°C в течение 30 мин, периодически перемешивая. По истечении 30 минут смесь разделяется на две фазы: нижняя – розоватая (омыленная фракция), верхняя – желтая (неомыленные компоненты). Смесь охлаждали при комнатной температуре, а затем к ней добавляли 100 мл воды очищенной (при этом смесь гомогенизируется). Экстракцию полученного раствора проводили двумя порциями гексана по 100 мл, на каждом этапе смесь взбалтывали в течение не менее 1 минуты. Гексановые фракции объединяли и обрабатывали 1% раствором

аскорбиновой кислоты (100 мл) для избавления от тимола. После этого экстракт промывали водой дважды порциями по 100 мл. Осушали раствор прибавлением безводного Na_2SO_4 . Гексан выпаривали в токе азота до остаточного объема 15 мл, затем это количество пропускали через колонку, заполненную MgO диаметром 1.5 см, высотой 5 см (очистка от каротиноидов). Через колонку пропускали две порции гексана по 25 мл и полученную объединенную гексановую фракцию отгоняли в токе азота досуха. Сухой остаток растворяли в 1 мл элюента.

Пробоподготовка анализируемых образцов для определения жирнокислотного состава масла семян тыквы. Метилирование масла семян тыквы проводили согласно ГОСТ 31665-2012 «Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот». В колбу помещали навеску исследуемого образца МСТ или фитопрепарата массой 0,1 г и добавляли 2 мл гексана, 0,1 мл раствора метилата натрия в метаноле в концентрации 2 моль/дм³. Выдерживали раствор в течение 15 мин, затем в колбу добавляли 2 мл 2% раствора серной кислоты в метаноле и выдерживали еще 15 мин. После охлаждения гексановый экстракт, полученный на делительной воронке, сушили фильтрованием через слой безводного сульфата натрия и использовали для испытания. В качестве стандартной применяли смесь метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот.

2.4 Методики исследования свойств фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

Антиоксидантные свойства крема исследовали на цельной крови, которая была получена в процессе декапитации головы крысы, сонная артерия предварительно была перерезана. Испытания проводили в соответствии с нормативными документами (А.Н. Миронов, 2012). ***Хемилюминесцентные исследования*** проб проводили с помощью метода биохемилюминесценции, реакцию Фентона индуцировали ионами двухвалентного железа и перекисью

водорода, данные регистрировали на биохемилюминометре. Хемилюминограмма позволяла оценить следующие стандартные параметры, характеризующие интегральное состояние системы ПОЛ в исследуемой ткани: S (mV) – светосумма хемилюминесценции за 30 секунд, отражающая потенциальную способность биологического объекта (плазмы крови) к ПОЛ; $\text{tg } 2\alpha$, показывающий скорость спада процессов свободнорадикального окисления в плазме и свидетельствующий об общем антиоксидантном потенциале (АОА); ПРЭ – перекисная резистентность эритроцитов, отражающая светосумму хемилюминесценции за 30 секунд и характеризующая степень выраженности перекисного окисления липидов в эритроцитах. *Эффективность крема* исследовали в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) 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®, содержащем 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 аппаратно – программном комплексе «ЛАКК-М-2». Зонд анализатора устанавливали перпендикулярно на исследуемую область. Микроциркуляцию (4 минуты) оценивали по: 1) *показателю микроциркуляции* (ПМ), или параметру M , в перфузионных единицах; ПМ отражает средний уровень перфузии (средний поток эритроцитов) в единице объема ткани за единицу времени; 2) *среднеквадратичному отклонению* (δ) амплитуды колебаний кровотока от величины ПМ (перфузионные единицы); δ показывает усредненную временную амплитуду микроциркуляторного потока или флукса; 3) *коэффициенту вариации* $K_v = \delta/M \times 100\%$, характеризующему вклад вазомоторного компонента в общую модуляцию тканевого кровотока.

Вейвлет анализ (амплитудно-частотный спектр) осуществляли с помощью программы LDF 3, позволяющей произвести расчет пассивных колебаний (пульсовая волна – параметр С, дыхательная волна-параметр Д) и активных колебаний (миогенные – М, нейрогенные – Н, и эндотелиальные – Э) и вычислением показателя шунтирования – ПШ [12].

Исследование противовоспалительных свойств фитопрепарата на модели острого отека уха, вызванного ксилолом. В исследовании были использованы самки белых беспородных мышей весом 25-30 г. Мышей содержали в стандартных полипропиленовых клетках при контролируемых условиях температуры (23-25°C), относительной влажности (40-45%) и 12 ч цикле день / ночь со свободным доступом к корму и воде. Отек уха у мышей (n = 9 / группу) индуцировали путем местного применения на внутренней и наружной поверхностях правого уха воспалительного агента - ксилола (20 мкл / ухо). Сразу же после применения воспалительного агента правые уши местно обрабатывали 100% МСТ (20 мкл / ухо), 6.4% раствором тимола в минеральном масле (20 мкл / ухо), фитопрепаратом (20 мкл / ухо), раствором сравнения (минеральное масло, 20 мкл / ухо, положительный контроль) и гидрокортизоном 0.5% (0.05 мг / ухо). Левое ухо считалось противоположным контролем и его обрабатывали только минеральным маслом или физиологическим раствором (отрицательный контроль, 20 мкл / ухо). Отек уха оценивали через 1 ч после применения ксилола. *Измерение отека уха.* Толщину уха измеряли до и после индукции воспалительного агента с использованием цифрового микрометра. Микрометр применяли вблизи кончика уха, расположенного по периферии хрящевых гребней, толщину измеряли в мкм. Чтобы оценить вес уха, животных умерщвляли, а затем оба уха удаляли и индивидуально взвешивали. Отек оценивали по изменению толщины уха и как разность веса между правым и левым ушами. Процент ингибирования отека рассчитывали как снижение веса по сравнению с положительным контролем. ***Статистическую обработку*** проводили по программе Statistica 7.0.

Исследование антимикробной активности фитопрепарата

Антимикробную активность изучали *in vitro* методом диффузии в агар. Определение чувствительности патогенных микроорганизмов к крему проводили, используя метод «колодцев». Методика заключалась в следующем: стерильные чашки Петри устанавливали на строго горизонтальную поверхность, наливали в них агар для микробиологических испытаний (рН = 7,2-7,4) в количестве 20 мл для создания оптимальной толщины слоя, равной 4-5 мм. Перед посевом чашки со средой подсушивали в термостате. Сверлом (d=5 мм) проделывали отверстия («колодцы») на расстоянии 2,5 см от центра чашки Петри и на одинаковых расстояниях друг от друга. Слой агара засеивали 1 мл взвеси испытуемых микроорганизмов и растирали шпателем до равномерного распределения микроорганизмов по всей поверхности чашки Петри. Излишек взвеси полностью удаляли, подсушивали в течение 30 минут. «Колодцы» в агаре заполняли исследуемыми объектами. После этого чашки помещали в термостат при 37°C не переворачивая, строго горизонтально, чтобы образовались круглые зоны.

Через 24 часа измеряли диаметры зоны угнетения роста.

Антирадикальная активность фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы. Антирадикальную активность фитопрепарата оценивали, изучая кинетику реакции его взаимодействия с метанольной фракцией стабильного свободного радикала 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ). Изменение концентрации определяли спектрофотометрически при температуре 290 К. Молярный коэффициент поглощения метанольного раствора ДФПГ при длине волны 517 нм равен 5719 л/(моль*см). В дополнение к 5 мл 0,004% метанольного раствора ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразида) было добавлено 50 мкл различных концентраций образцов, растворенных в метаноле. После инкубационного периода в течение 30 минут при комнатной температуре, регистрировали поглощение при 517 нм. Ингибирование свободных радикалов ДФПГ, в процентах (ДФПГ*, %) остающихся в растворе, было рассчитано следующим образом:

$I\% = (A_{\text{контр.}} - A_{\text{образца}}/A_{\text{контр.}}) \times 100$, где $A_{\text{контр.}}$ - это поглощение контрольной пробы, содержащей все реагенты, кроме тестируемого соединения; $A_{\text{образца}}$ - оптическая плотность исследуемого соединения. Значения представлены как среднее \pm SD для 5 параллельных измерений.

ГЛАВА 3. Разработка и стандартизация нового фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

3.1 Обоснование и разработка состава фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

Предложен противовоспалительный фитопрепарат бетулина и природного маслорастворимого антиоксиданта тимола в масле семян тыквы *Cucurbita Pepo*. Для выбора необходимого антиоксиданта и соотношения компонентов необходимо было провести изучение физико-химических и фармакологических свойств веществ, а также исследовать их взаимодействие между собой. Комбинация бетулина и многокомпонентного масла семян тыквы позволяет предположить её высокую фармакологическую активность на основании многочисленных литературных данных по наружному использованию каждого вещества. Стероидные соединения (бетулин – близок по структуре к глюкокортикостероидам) способны проявлять наибольшую активность в липофильных средах – в связи с этим, масло является предпочтительной основой композиции. Токоферолы и каротиноиды способны благоприятно воздействовать на эпидермис, увлажняя и регенерируя кожу. Следует ожидать, что ненасыщенные жирные кислоты в МСТ будут оказывать противовоспалительный эффект, необходимый при лечении дерматозов.

Поликомпонентная система требует стабилизации – как с точки зрения придания устойчивости суспензии бетулина в масле, так и с позиции защиты легкоокисляющихся компонентов фитопрепарата. В качестве такого стабилизатора было выбрано вещество растительного происхождения, для которого доказана антиоксидантная активность по отношению к токолам и каротиноидам в среде масел [122, 132] – монотерпеновый спирт тимол. Кроме

того, комбинация тимола в масле семян тыквы доказала свою эффективность в ЛФ суппозитории Биопрост®.

3.1.1 Физико-химические свойства фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

Комплекс легкоокисляющихся БАВ (токолы, каротиноиды, ненасыщенные жирные кислоты), содержащийся в масле семян тыквы (МСТ), требует их стабилизации в нужной лекарственной форме.

Для предотвращения окислительных процессов в масло вводят антиоксиданты. Действие антиоксидантов связано с цепным механизмом окислительных реакций. Главную роль в этих процессах играет пероксидный радикал RO_2 . Молекулы антиоксидантов реагируют с пероксидными радикалами. В результате каждой такой реакции активный RO_2 заменяется малоактивным радикалом из молекулы антиоксиданта, не способным энергично продолжать цепь. Поэтому реакция в присутствии антиоксиданта замедляется или приостанавливается. Критерием антиоксидантной активности в конкретной среде и по отношению к определенному окислителю является элементарная константа скорости реакции радикалов RO_2 с антиоксидантом. Одна и та же добавка может тормозить окисление в течение долгих месяцев при невысокой температуре и исчезать за несколько минут при высокой из-за огромной скорости инициирования цепей и, следовательно, высокой концентрации RO_2 . Тормозящее действие зависит и от момента введения антиоксиданта в реакцию. Если ввести антиоксидант в исходное масло, когда процесс окисления только начинается, то наблюдается сильное торможение реакции. При введении его в развивающийся процесс – торможение более слабое и непродолжительное.

Нами показано, что при введении в МСТ тимола – природного антиоксиданта – окислительные процессы тормозятся (Таблица 3.1). Вероятно, что тимол в концентрации, в сотни раз превышающей природные антиоксиданты

– токолы, каротиноиды, фитостерлы, способен конкурентно в среде МСТ взаимодействовать с пероксидными радикалами. Вероятно, процесс протекает через образование феноксидного радикала с последующим возможным окислением до хинона (Рисунок 3.1). Поскольку по природе действия жирорастворимые антиоксиданты разделяются на первичные антиоксиданты и синергисты, то в роли синергистов могут выступать токоферолы и каротиноиды.

Таблица 3.1.

Изменение состава масла семян тыквы 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-Токотриенол	50,0	38-45	50,0	25,0	50,0
Фитостеролы	105-150	85-90	105-150	52,5-75,0	105-150

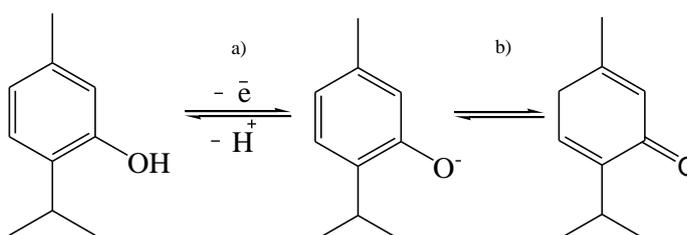


Рисунок 3.1. Окислительно-восстановительные превращения тимола в процессах ПОЛ

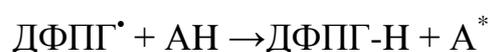
Детальный механизм окисления тимола в масле семян тыквы не изучен. Однако, данные таблицы 3.1 подтверждают его антиоксидантное действие.

Кроме того, в минимальной концентрации тимол влияет на механизмы адгезии бактерий и грибков к человеческому эндотелию.

Количественный анализ компонентов масла семян тыквы, хранящегося при комнатной температуре, показал уменьшение содержания биологически активных соединений – токолов, каротиноидов, фитостеролов. При этом масло, выдержанное при тех же условиях в течение сопоставимого времени, в присутствии тимола сохраняло свой количественный и качественный состав.

Антирадикальная активность.

Одной из методик оценки общей антиоксидантной активности является колориметрия свободных радикалов с использованием реакции метанольного раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ) с антиоксидантом. Реакция протекает по схеме:



Пурпурно-синяя краска раствора снижается за счет восстановления ДФПГ[•], оптическая плотность регистрируется при длине волны 517 нм.

С помощью этой методики была определена антирадикальная активность фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы. Имеются литературные данные, согласно которым масло семян тыквы проявляет антирадикальную активность против 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ[•]), подавляет перекисное окисление липидов в организме человека.

Тем не менее, МСТ может окисляться при комнатной температуре и хранении на свету, поэтому необходимо вводить антиоксиданты и консерванты в фитопрепарат для ее включения в лекарственные формы.

Тимол – компонент эфирного масла душицы и тимьяна, обладает антиоксидантными свойствами, способен поглощать радикалы 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ[•]) в фитопрепарате на основе масла семян тыквы.

Фитопрепарат бетулина и тимола в МСТ и спиртовой раствор тимола отличаются своими антирадикальными способностями относительно ДФПГ[•] (Таблица 3.2). Спиртовой раствор тимола показывает самые сильные антирадикальные свойства относительно ДФПГ[•], поглощает 70-76% радикалов в реакционной смеси через 10 минут с момента начала реакции (I = 24-30%), МСТ

(25 мг/мл) поглощает 30 - 36% радикалов из начальной реакционной смеси (I = 64-70%) (Таблица 3.2).

Таблица 3.2.

Данные по ингибированию свободно-радикальной реакции с ДФПГ^{*} по радикальному остатку

Система	C, % тимола	I, % ДФПГ [*] радикальный остаток
МСТ	-	67±3
МСТ и тимол	6,2	51±2
Спиртовой раствор тимолола	6,2	27±3
Смесь МСТ, бетулина и тимолола	6,2	50±3

Кроме антиоксидантного действия, тимол в составе фитопрепарата способствует повышению растворимости бетулина как в водных, так и в липофильных средах (Таблица 3.3).

Таблица 3.3.

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)	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$

Повышение растворимости бетулина в МСТ в присутствии тимолола, вероятно, обусловлено образованием комплексов включения тимолола и бетулина при механо-химической обработке их смеси. Литературные данные показывают высокую способность бетулина образовывать димерные структуры по типу «голова к хвосту» и «голова к голове» за счет гидрофобного связывания [15]. В результате такого взаимодействия внутри димерных структур формируются полости (Рисунок 3.2), в которых могут размещаться молекулы небольших

размеров. Для подтверждения возможного взаимодействия бетулина и тимола нами проведены следующие эксперименты.

Перетирание смеси бетулина и тимола в мольном соотношении 1:1 осуществляли при достаточно значительном механическом воздействии в присутствии спирта этилового 96%. Анализировали инфракрасный спектр полученной смеси (Рисунок 3.3).

Валентные колебания концевой метиленовой группы $-C=CH_2$, проявляющейся полосой с $\nu = 1646 \text{ см}^{-1}$ ($\nu_{C=C}$) и интенсивной полосой в области 881 см^{-1} (δ_{CH} (неплоские), два атома Н колеблются в противоположных направлениях), существенно изменяются.

Появление очень узкой интенсивной полосы в области ИК-спектра, характерной для валентных колебаний спиртовых групп O-H, с $\nu = 3550 \text{ см}^{-1}$, свидетельствует о возникновении сильной межмолекулярной водородной связи как в димере бетулина, так и π -водородной связи [43].

В целом, изменения полос валентных колебаний ароматического цикла фенола в области $1600\text{-}1500 \text{ см}^{-1}$, спиртовых и фенольного гидроксила в бетулине и тимоле, соответственно, характерны для молекулярных ассоциатов типа комплексов включения тимола в димер бетулина (Таблица 3.4).

Размер полости (в поперечнике), рассчитанный на основании квантово-химических данных, позволяет разместиться молекуле тимола в ней (минимальный размер полости по вертикали составляет $6,0195 \text{ \AA}$, а по горизонтали – $3,2065 \text{ \AA}$).

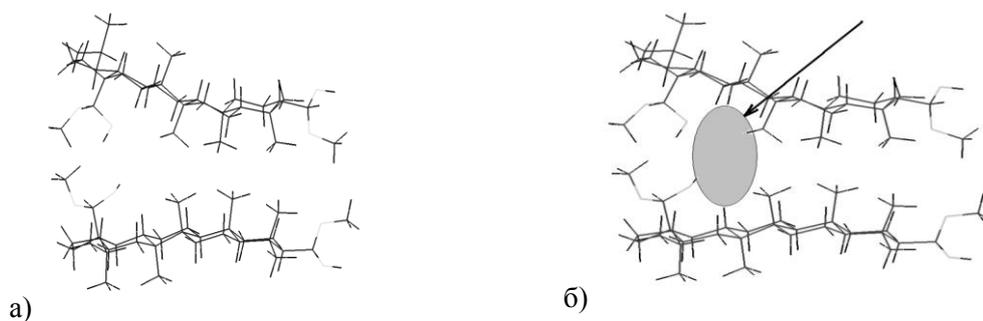


Рисунок 3.2. Димерная структура бетулина (а); полость внутри димера бетулина (б)

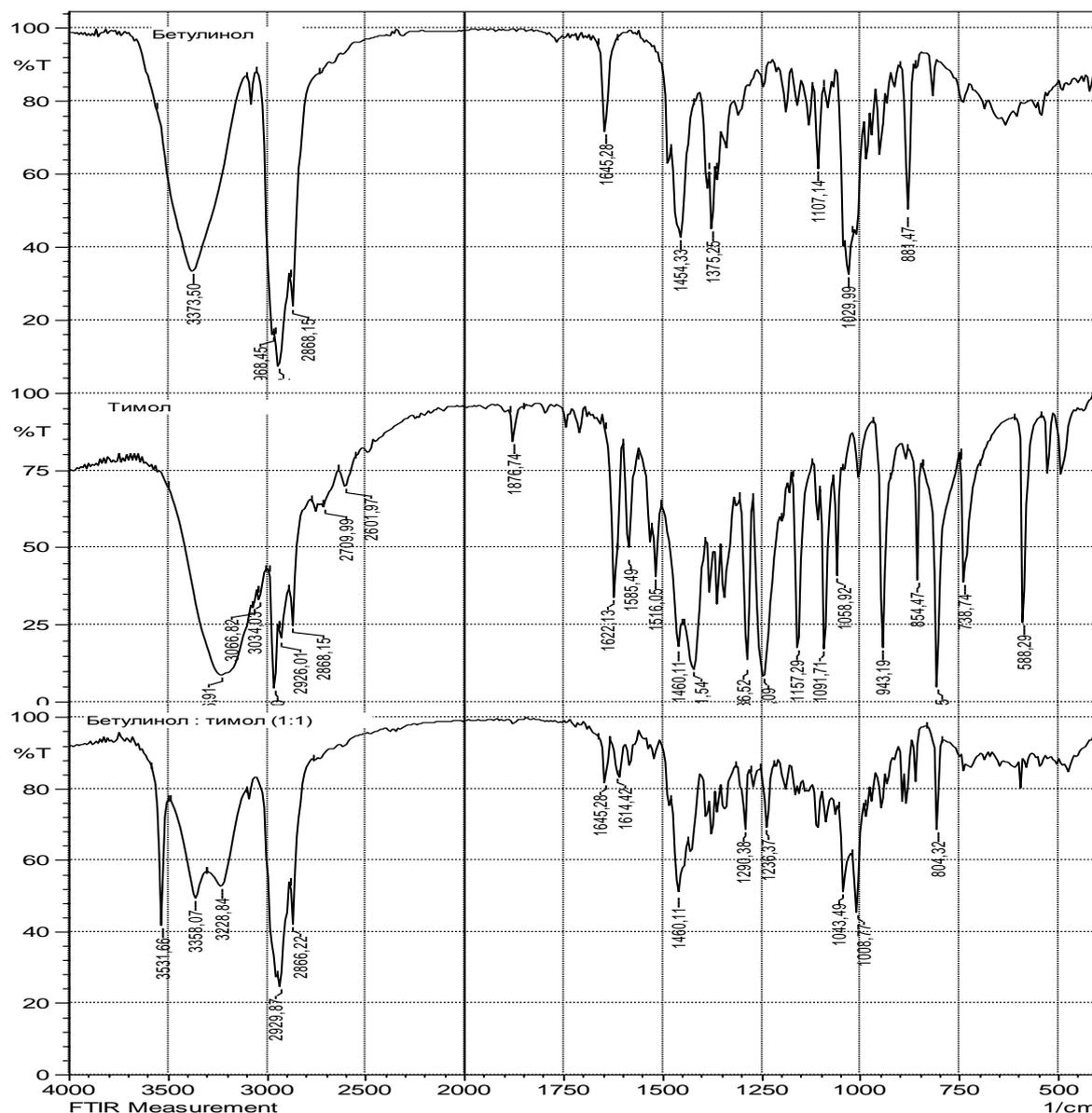


Рисунок 3.3. ИК-спектры бетулина (а), тимола (б), смеси бетулин-тимол в молярном соотношении 1:1 после перетирания

Таблица 3.4.

Данные ИК-спектров бетулина, тимола и смеси бетулин:тимол (1:1)

ν, cm^{-1}	- OH 3200-3600	-C-O (спирт) 1000-1100	=CH ₂ 800-890
Бетулин	3380	1028	881
Тимол	3280	1091	806
Смесь	3380, 3280, 3550	1044	804

Биомиметическое изучение взаимодействия бетулина с липидными поверхностями.

Модель фосфолипидной мембраны

Липидный баланс кожи влияет на фазовые переходы и текучесть биологических мембран – двумерных растворов глобулярных белков, диспергированных в жидком фосфолипидном матриксе (Рисунок 3.4). Гидрофобные частицы жирных кислот, ориентированные в липидном бислое почти параллельно друг другу, образуют жесткую структуру. Низкие температуры переводят липидный бислой в состояние геля. При высоких температурах упорядоченное состояние бислоя сменяется на неупорядоченное, система становится жидкой и текучей.

При повышении текучести мембрана становится проницаемой для воды и низкомолекулярных гидрофильных молекул, ускоряется латеральная диффузия белков, увеличивается транспорт веществ через мембрану. Простая диффузия растворенных веществ через мембрану связана с тепловым движением молекул, градиентом веществ по обе стороны мембраны, растворимостью вещества в гидрофобном слое биомембраны (коэффициентом проницаемости).

Фрагмент биомембраны – половина бислоя – моделируется с использованием Ленгмюровского монослоя. В модели используется фосфатидилхолин, полярная часть молекул которого погружена в воду, а гидрофобные остатки определяют фазовое двумерное состояние (как и проницаемость мембраны для молекул).

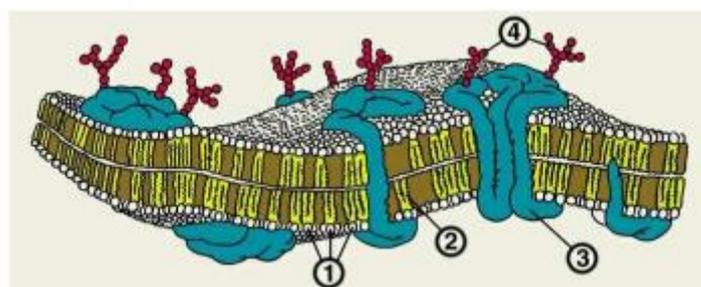


Рисунок 3.4. Схема строения плазматической мембраны: 1— фосфолипиды; 2— холестерин; 3— интегральный белок; 4— олигосахаридная боковая цепь.

Бетулин, близкий по структуре к глюкокортикостероидам, способен хорошо проникать в липидную поверхностную пленку кожи. Проникание бетулина через липидную часть биологической мембраны изучали на модели искусственной мембраны – ленгмюровского монослоя лецитина, традиционно используемой для этой цели.

Монослой лецитина (Рисунок 3.5), сформированный на границе раздела «вода-воздух» характеризовался изотермой сжатия $\pi = f(A_0)$, типичной для 1-пальмитоил – 2 – олеил – фосфатидилхолина: $\pi_{\text{коллапса}}=56-58\text{мН/м}$, а молекулярная площадь $A_0 = 0,54 \text{ нм}^2$, что соответствует литературным данным [15]. В отличие от этого, холестерин образует жестко конденсированные пленки с $A_0 = 0,41\text{нм}^2$, а бетулин не образует в этих условиях монослои. Из смеси холестерин-лецитин состава 1:1 формируются эластичные пленки с обширной жидкой областью и наличием двумерного перехода в расширенные конденсированные слои (Рисунок 3.6б – кривая 3). Изотермы сжатия смесевой пленки бетулин-лецитин аналогичного состава характеризуют более конденсированное состояние монослоя в области изотермы при $\pi > 10-15 \text{ мН/м}$ и наличие четко выраженного двумерного фазового перехода (Рисунок 3.6б – кривая 4).

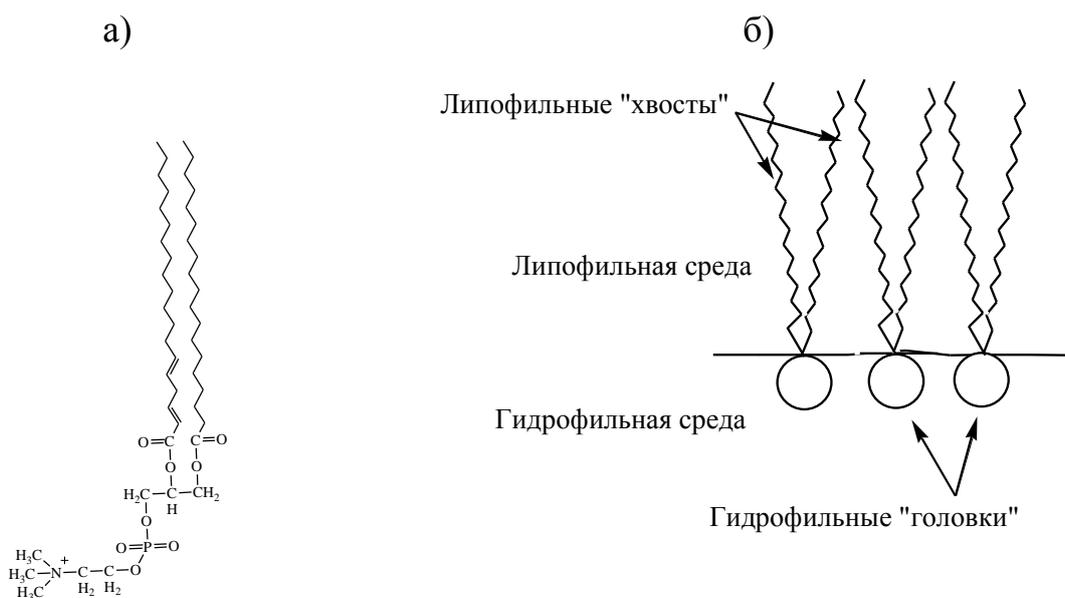


Рисунок 3.5. а) структура лецитина; б) ориентация молекул лецитина в монослое

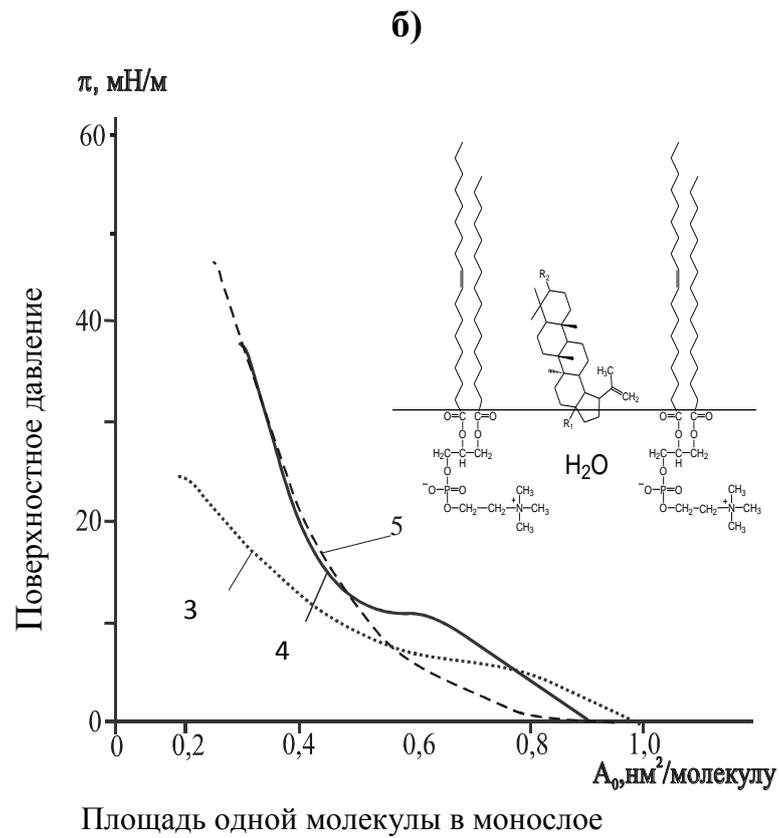
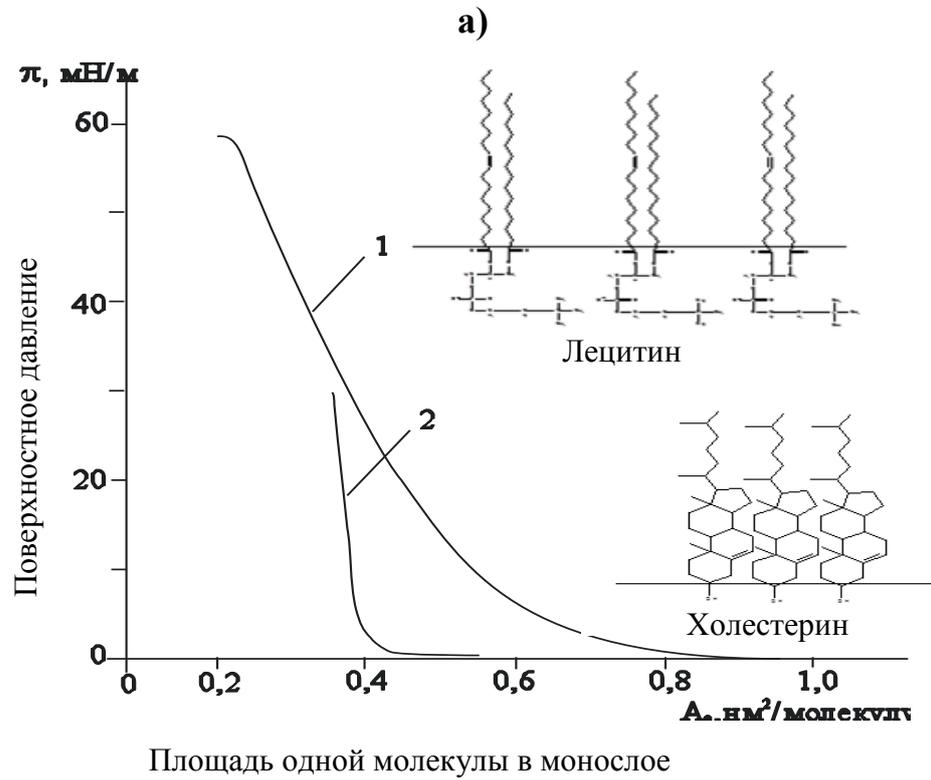


Рисунок 3.6 а, б. Изотермы сжатия $\pi = f(A_0)$ (293 К) монослоев липидов на ВОДЕ

Таблица 3.5.

Данные по фазовому состоянию монослоев липидов.

№ кривой	Монослой	$A_0 \pm 0,02$, нм ² /молекула	Модуль упругости монослоя $C_S^{-1} = -A_0(d\pi/dA)$, 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

Величина предельной площади эффективной A_0 в первой области фазового состояния близка к A_0 лецитина и равна 0,50 нм², сжимаемость C_S^{-1} уменьшается, а эластичность увеличивается по сравнению с монослоем лецитина (Таблица 3.5). Приближенная оценка A_0 лецитина в смесевой пленке, выполненная в соответствии с аддитивностью A_0 составляющих компонентов монослоя, и близостью молекулярной площади бетулина и холестерина $A_{0,бетулин} \approx A_{0,холестерина}$, дает величину 0,48 нм² в области монослоя при $\pi > 10-15$ мН/м.

$$A_{\text{набл.}} = \varphi_1 \cdot A_{0,\text{лец.}} + (1-\varphi_1) \cdot A_{0,\text{бетулин}}$$

Форма изотермы и эффективная молекулярная площадь A_0 в смесевом монослое бетулин – лецитин в избытке лецитина состава 1:2 близки к таковым для монослоя лецитина (Таблица 3.5, Рисунок 3.6б – кривая 5) [15]. Отсутствие двумерного фазового перехода на изотерме сжатия $\pi = f(A_0)$ и близость значений A_0 лецитина в монослое характеризует смесевой монослой как гомогенный с однородным распределением бетулина в нем, а «выдавливание» бетулина в гидрофобную часть монослоя не происходит. Полученные данные свидетельствуют о существенном межмолекулярном взаимодействии компонентов, благодаря которым бетулин способен «двумерно» растворяться в лецитиновом слое, при этом состояние монослоя определяется молярным соотношением компонентов.

Визуализация тонких смешевых пленок «бетулин - лецитин», перенесенных на поверхность кварца (50 слоев), методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) подтвердила данные изотерм сжатия, в соответствии с которыми состояние, а, следовательно, и структура пленок зависит от содержания бетулина в пленке (Рисунок 3.7).

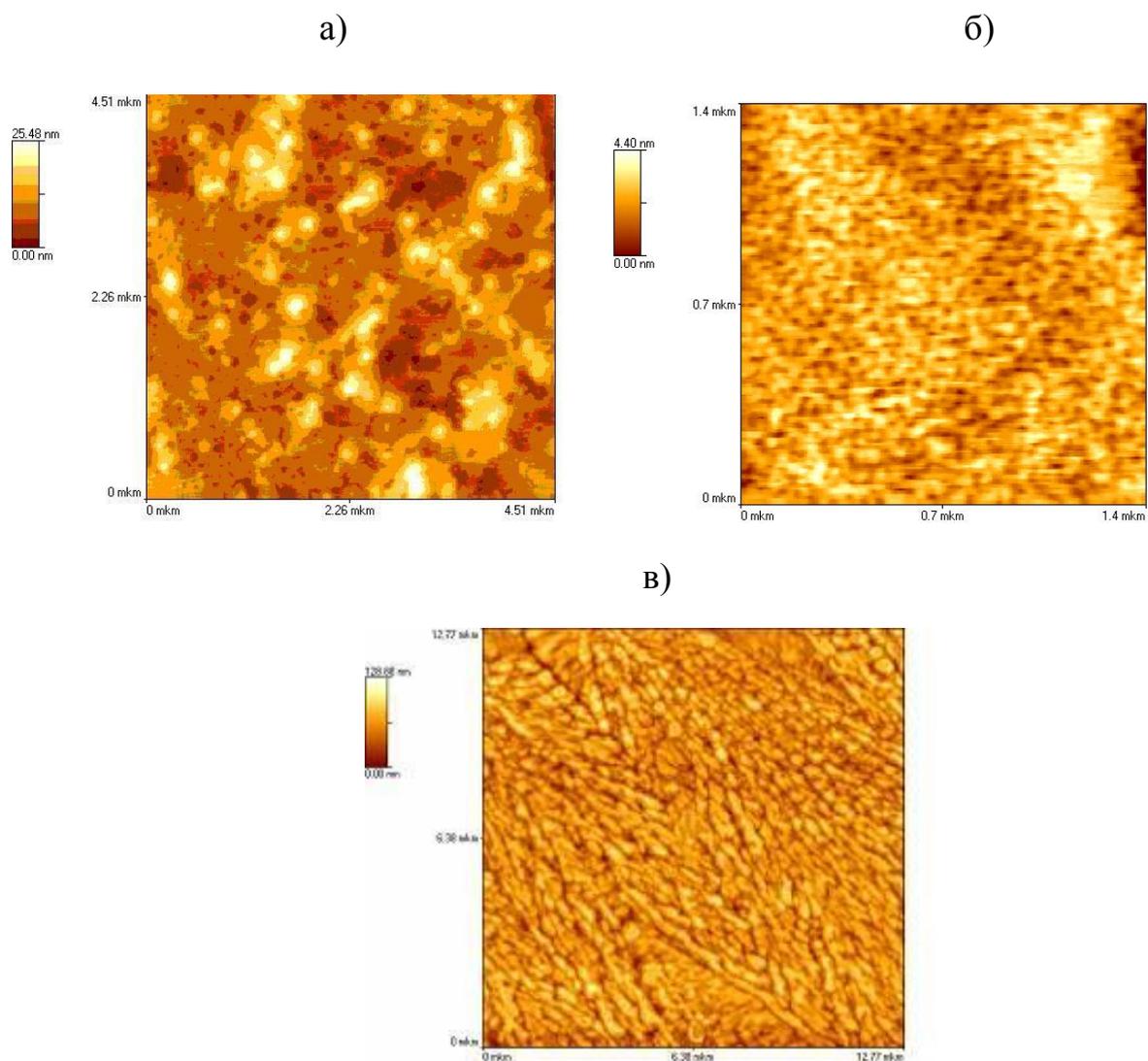


Рисунок 3.7. АСМ – визуализация (неконтактный режим) смешанных пленок «бетулин - лецитин» и пленки лецитина, перенесенных с поверхности воды: а) пленка лецитина; б) бетулин - лецитин (1:4); в) бетулин – лецитин (4:1).

Пленки с большим содержанием лецитина (до 80 мольных %) имеют аморфную глобулярную природу (Рисунок 3.7а), аналогичную пленкам лецитина.

Особенностью бетулин-содержащих пленок является появление текстуры. При увеличении доли бетулина структурированность пленок усиливается, а в пленках, содержащих более 80,0 мольных % бетулина, пленка имеет четкую текстуру (Рисунок 3.7б).

Таким образом, биомиметическое исследование влияния бетулина на липидные бислои свидетельствует о способности бетулина к сильным межмолекулярным взаимодействиям с липидами, близкими по природе к лецитину. Сильные межмолекулярные взаимодействия бетулина и лецитина способствуют его иммобилизации монослоем и могут характеризовать высокую биодоступность бетулина в многослойные липидные структуры кожи.

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

Использование бетулина в концентрации меньше 1.5% увеличивает сроки заживления ран и снятия воспалительного процесса, а введение бетулина в концентрации больше 2.5% затрудняет взбалтывание суспензии, не приводит к улучшению заживления и экономически нецелесообразно. Введение тимола в концентрации меньше 4% неэффективно стабилизирует фитопрепарата, при концентрации более 7% возможно проявление раздражающего действия тимола.

Седиментационная устойчивость фитопрепарата была определена в соответствии с ГФ XII. После хранения в течение 24 часов суспензия бетулина с тимолом в масле семян тыквы восстанавливает равномерное распределение частиц по всему объему при взбалтывании в течение 17 с, а после 3 суток хранения — в течение 52 с.

3.1.2 Исследование свойств фитопрепарата в эксперименте на острой модели воспаления

Многочисленные литературные данные о высокой фармакологической активности отдельных компонентов фитопрепарата позволили предположить хороший комплексный эффект при лечении дерматологических заболеваний, сопровождающихся воспалением.

Противовоспалительный эффект фитопрепарта исследовали на острой модели воспаления – ксилол-индуцированном отеке уха.

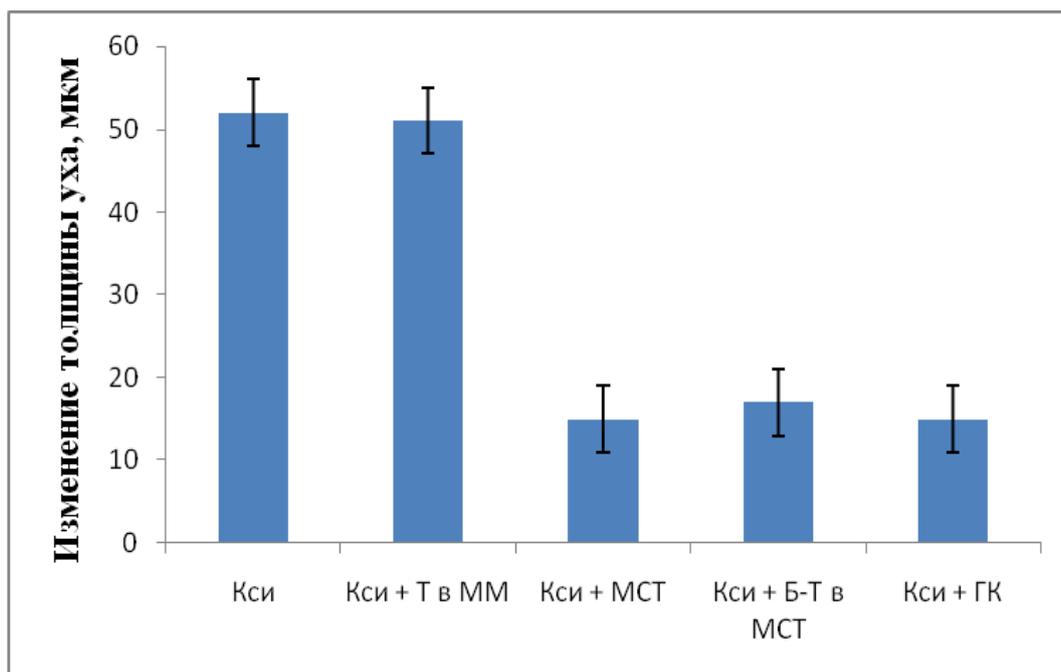
Во всех экспериментах ухо мыши, обработанное ксилолом, увеличивалось по толщине и весу ткани. Измерения величины отека по толщине и весу проводили через час после обработки ксилолом (Рисунок 3.8). Местное применение растворов сравнения (минеральное масло или физиологический раствор) по сравнению с фитопрепаратом или отдельными его компонентами существенно не изменяют толщину уха (данные не показаны). В то же время, фитопрепарат ингибирует 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 3.8 – 3.9, Таблица 3.6).

Таблица 3.6.

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

а)



б)

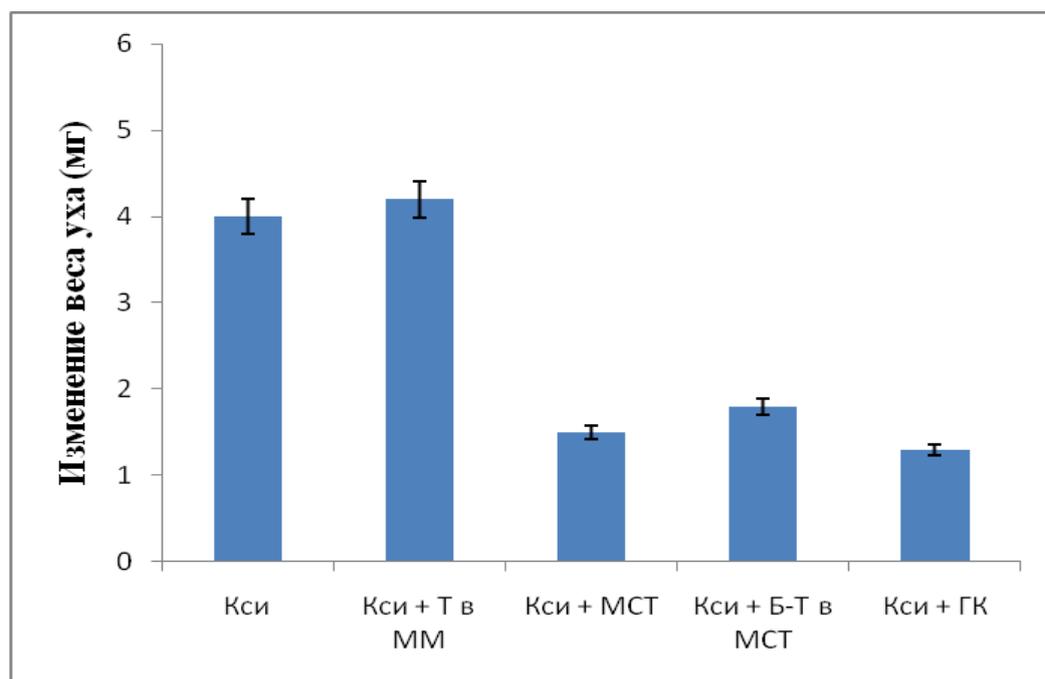


Рисунок 3.8. Местная активность тимола в минеральном масле (Т в ММ), масла семян тыквы (МСТ), фитопрепарата (Б-Т в МСТ) и 0,5% гидрокортизона (ГК) на ксилон-индуцированном (Кси) ушном отеке у мышей. Отек уха измеряли через 1 час после индукции воспаления по толщине уха (а) и весу ткани (б). Положительный контроль – минеральное масло (ММ).



Рисунок 3.9. Результаты гистологических испытаний фитопрепарата и ее компонентов на ксилол-индуцированной модели воспаления уха.

Ксилол индуцировал выраженный отек дермы. Наблюдалась гиперемия, явления гемостаза, выход эритроцитов из сосудистого русла. Гистологическая картина характеризовалась отеком эндотелия, краевым положением лейкоцитов. Была выражена инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами и моноцитами, наблюдалось большое количество макрофагов. Аналогичные данные были получены после обработки индуцированного уха вазелиновым маслом и тимолом.

После нанесения фитопрепарата наблюдался умеренно выраженный отек дермы. Явления гиперемии и гемостаза уменьшались, редко наблюдался выход эритроцитов. Отек эндотелия был выражен слабо, лейкоциты занимали краевое

положение. Была выражена умеренная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами. Наблюдалось большое количество макрофагов. Гистологическая картина была схожа с наблюдаемыми эффектами глюкокортикоида.

Впервые противовоспалительное действие МСТ было показано на нескольких моделях острого и хронического воспаления в эксперименте на мышцах [120]. В этом исследовании авторы использовали в качестве воспалительного индуктора острого воспаления ксилон, вызывающий нейрогенные изменения. Положительное влияние МСТ объяснялось исследователями возможностью изменения воспалительного ответа посредством модуляции клеточных и молекулярных медиаторов, близкое к действию дексаметазона, при этом побочные эффекты отсутствовали. Кроме того, авторы работы объясняли положительный эффект МСТ высоким содержанием и оптимальным балансом ω -6 и ω -9 ненасыщенных жирных кислот, присутствующих в МСТ [120].

Свой вклад в проявление противовоспалительной активности МСТ вносят также фитостеролы, каротиноиды и токолы, присутствующие в масле в высокой концентрации, вследствие чего предлагаемый фитопрепарат, содержащий дополнительно бетулин и тимол, оказывает больший противовоспалительный эффект и может быть использован при различных кожных заболеваниях как наружное средство.

Исследование антимикробной активности композиций.

В некоторых работах (Е.А. Радькова, 2007 , Сергеев Д.В., 2011 и др.), посвященных исследованию лекарственных форм с тритерпеноидами лупанового ряда из бересты березы, не показано наличие антибактериального эффекта бетулина (кремы и мази). В то же время, ряд других авторов доказывают антибактериальное действие экстрактов коры березы.

В данной работе нами были проведены испытания по изучению антибактериального действия фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы и крема с бетулином в масле семян тыквы.

На испытание были представлены фитопрепараты следующих составов:

1.1 состав, %: бетулин 2.5, тимол 5.0, масло семян тыквы 92.5

1.2 состав, %: бетулин 2.7, масло семян тыквы 97.3

1.3 состав, %: тимол 5.2, масло семян тыквы 94.8

Препараты анализировали с помощью 2 методов – дисковый метод и метод лунок. Для исследования препаратов были выбраны 3 культуры бактерий: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Все три состава не показали активности в отношении этих штаммов микроорганизмов, а также в отношении некоторых штаммов грибов.

Препараты типа «крем» имели следующие составы:

Состав 1, %: бетулин 0.2, тимол 0.8, масло семян тыквы 12.0, клотримазол 0.5, глицерилстеарат 5.0, глицерин 4.0, цетеарет-25 2.5, цетилстеариловый спирт 2.0, стеариновая кислота 2.0, натрия аскорбат 1.0, аллантаин 0.2, вода 69.8.

Состав 2, %: бетулин 0.2, тимол 0.8, масло семян тыквы 12.0, левомецетин 1.0, глицерилстеарат 5.0, глицерин 4.0, цетеарет-25 2.5, цетилстеариловый спирт 2.0, стеариновая кислота 2.0, натрия аскорбат 1.0, аллантаин 0.2, вода 69.3.

Состав 3, %: бетулин 0.2, тимол 0.8, масло семян тыквы 12.0, левомецетин 1.0, клотримазол 0.5, глицерилстеарат 5.0, глицерин 4.0, цетеарет-25 2.5, цетилстеариловый спирт 2.0, стеариновая кислота 2.0, натрия аскорбат 1.0, аллантаин 0.2, вода 68.8.

Препараты были проанализированы с помощью метода лунок (Таблицы 3.7-3.8).

Таблица 3.7.

Зона ингибирования роста микроорганизмов, мм

Состав крема	E.coli		Ps. aeruginosa		St. aureus	
	r	d	r	d	r	d
1	0	0	0	0	0	0
2	15	35	12	29	17	39
3	15	35	12	29	17	39

Таблица 3.8.

Зона ингибирования роста грибов, мм

Состав крема	Aspergillus niger		Penicillium chrisogenum		Alternaria alternate	
	r	d	r	d	r	d
1	10	20	13	26	8	16
2	0	0	0	0	0	0
3	9	18	12	24	13	26

Зоны угнетения роста измеряли через 24 часа.

Таблица 3.9.

Влияние левомецетина на рост микроорганизмов в креме, содержащем смесь бетулина с тимолом в масле семян тыквы

Композиция	Характеристика зон ингибирования (r и d, мм)					
	E.coli		Ps. aeruginosa		St. aureus	
	r	d	r	d	r	d
Крем без левомецетина	0	0	0	0	0	0
Крем с левомецетином	15	35	12	29	17	39

Было доказано, что бетулин в изучаемом фитопрепарате и креме на основе бетулина в масле семян тыквы не проявляет антибактериальный эффект. Введение антибиотика широкого спектра – левомецетина в состав препарата позволило обеспечить антибактериальные свойства крема (Таблица 3.9).

Вывод по разделу 3.1

Комбинация в одном фитопрепарате тритерпенового спирта стероидоподобной структуры – бетулина, богатого биологически активными компонентами (токолы, каротиноиды, фитостеролы, ненасыщенные жирные кислоты) масла семян тыквы и монотерпенового спирта – тимола позволяет получить систему с высокой фармакологической активностью, при этом фитопрепарат является седиментационноустойчивым и защищенным от образования перекисных радикалов. Фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы проявляет высокую противовоспалительную активность в

эксперименте на животных. Предполагаемый антибактериальный эффект крема с бетулином на основе масла семян тыквы доказан не был.

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

3.2.1 Количественное определение суммы каротиноидов

Количественный анализ каротиноидов в МСТ проводили методом электронной спектроскопии. В качестве растворителей использовали гексан и хлороформ (Рисунок 3.10). Для очистки от сопутствующих соединений растворы пропускали через адсорбционную колонку (Рисунок 3.11). В качестве полярных сорбентов использовали: CaCO_3 , MgO , Al_2O_3 . На адсорбционной колонке образовывались 3-4 окрашенные в желто-оранжевые цвета зоны, в которых частично осаждались каротиноиды и сопутствующий им в тыквенном масле хлорофилл. Нижняя зона в колонке имела зеленый цвет, а продукты гидролиза жировой фракции из модельных смесей окраски не имели и оставались в верхней части колонки. Высота окрашенных зон увеличивалась в ряду:



При смене растворителей и сорбентов не изменялся общий вид спектра (форма и положение полос поглощения), а оптическая плотность в области поглощения каротиноидов (400-500 нм) в гексановом растворе увеличивалась в этом же ряду.

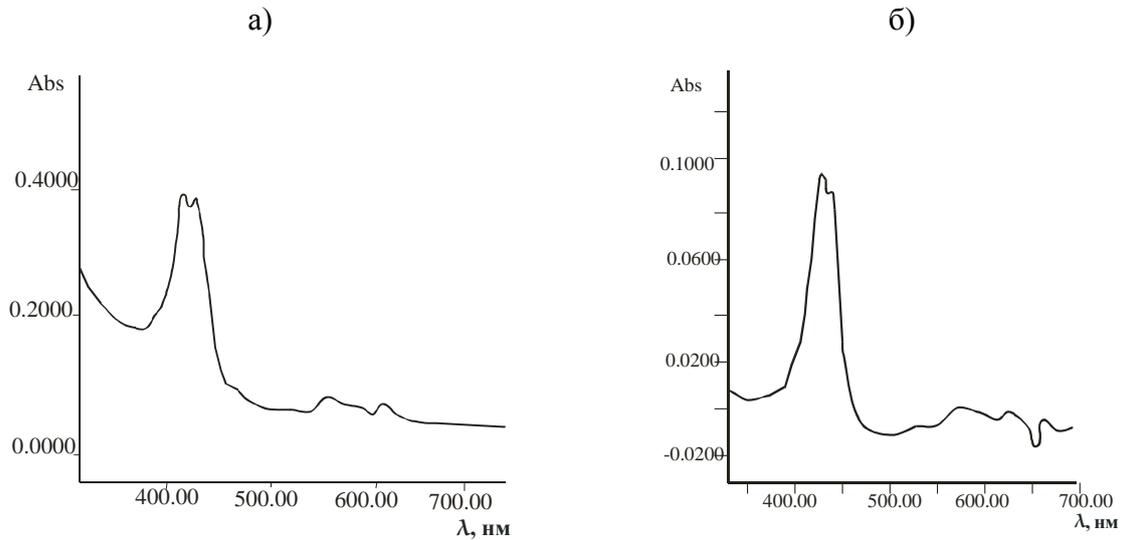


Рисунок 3.10. Спектры фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы, полученные: а) в гексане (0.75 мг/мл); б) в хлороформе (0.75 мг/мл).

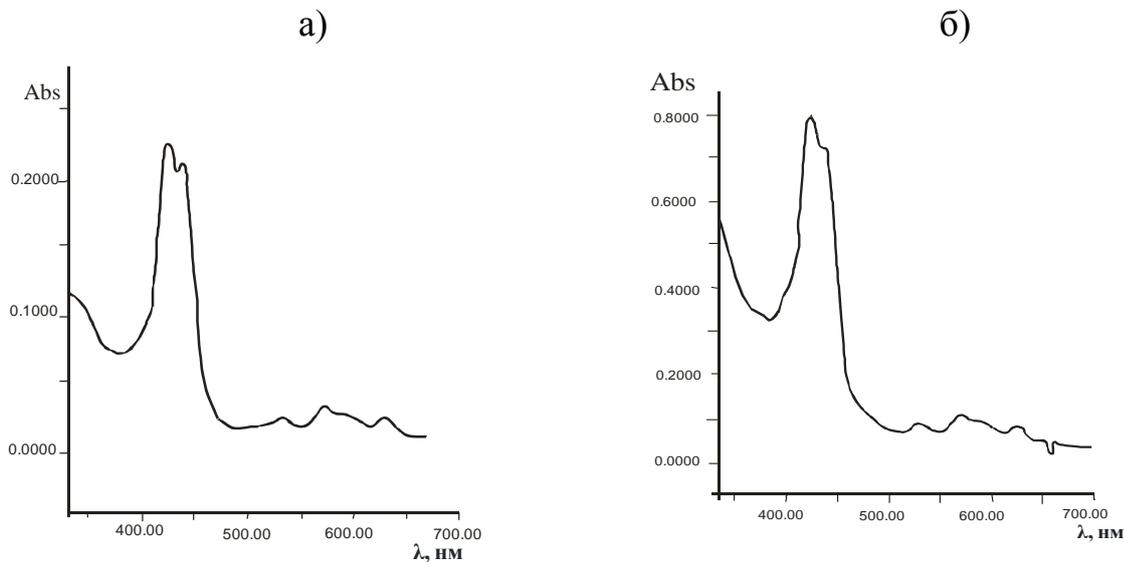


Рисунок 3.11. Спектры фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы в гексане (объединенные вытяжки, $C=0.40$ мг/мл и 1.60 мг/мл соответственно), полученные после пропускания через колонку с: а) MgO ; б) $CaCO_3$

Оптическую плотность измеряли для различных фракций после пропускания через адсорбционную колонку. При этом интенсивность поглощения уменьшалась у каждой последующей фракции, хотя максимумы интенсивности оставались неизменными.

На рисунке 3.11а представлена типичная картина электронного спектра объединенной гексановой фракции раствора масла семян тыквы после его пропускания через колонку с MgO. В спектре хлороформного раствора (Рисунок 3.10б) после вымывания этим растворителем каротиноидов из адсорбционной колонки наблюдались основные полосы с максимумом поглощения 424 и 434 нм, такие же как в спектре гексанового раствора, но с другими значениями оптической плотности. Таким образом, содержание каротиноидов в масле семян тыквы и модельных смесях может быть определено с использованием гексанового или хлороформного растворителей после очистки извлечений на адсорбционной колонке с использованием соответствующих калибровочных графиков.

Кроме того, в спектрах наблюдалось плечо в области 474 нм, а также полосы в области 531 нм, 572 нм и 630 нм, характерные для протофильных соединений, например, хлорофилла после омыления.

Отнесение полос поглощения к определенным структурам каротиноидов выполняли по литературным данным.

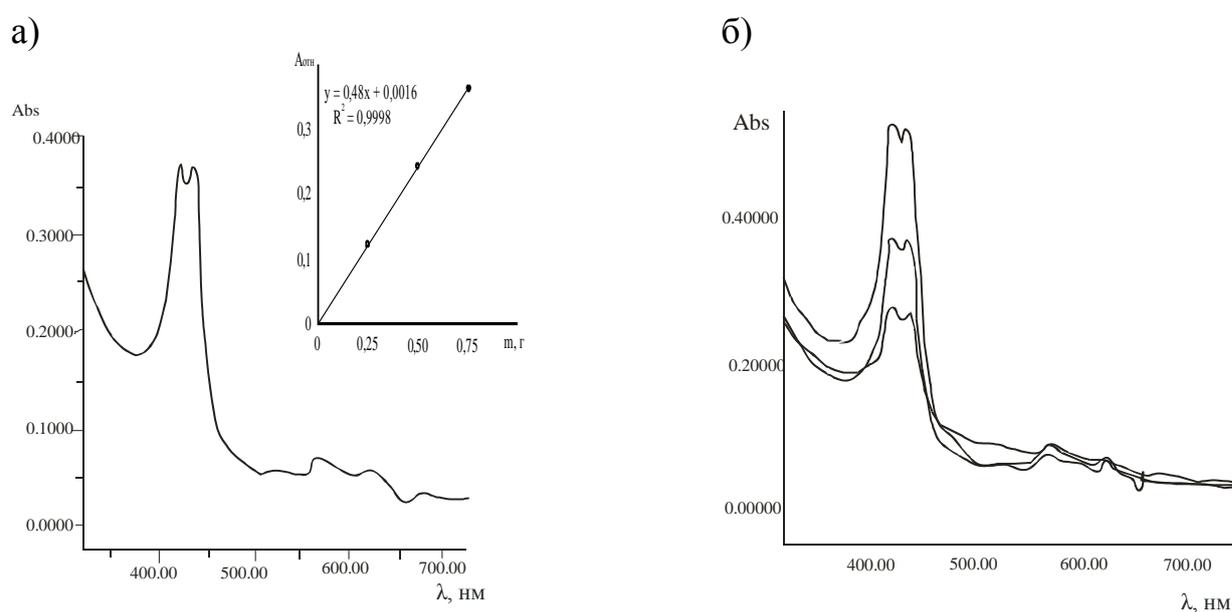
Структура и состав каротиноидов будет определяться процессами биосинтеза и биотрансформации, в процессе получения масла и его неправильного хранения по схеме:



Упомянутые процессы перехода гидроксированных каротиноидов в эпоксисоединения сопровождаются окислением и отщеплением эпоксидной группы с регенерацией исходного каротиноида. Виолаксантин содержит эпоксигруппы на обоих концах молекулы. Фотовосстановление в присутствии аскорбиновой кислоты приводит к атероксантину; если восстановление затрагивает оба конца – образуется зеаксантин (виолаксантиновый цикл).

Спектр поглощения гидрокси- и эпокси-производных α -каротина, например, лютеина, имеющего также 11 кратных связей, тождественен электронному спектру α -каротина, поскольку хромофорная полиеновая система одна и та же, а гидрокси- или эпоксигруппы не оказывают влияния на λ_{max} . Аналогично UV-vis

спектры β -каротина близки спектрам зеаксантина и виолаксантина. Удельные коэффициенты поглощения гидрокси- и эпокси-производных каротина также имеют близкие значения. Следовательно, использование интенсивности поглощения полос при $\lambda_{\max 1} = 424$ нм и $\lambda_{\max 2} = 434$ нм в растворах масла семян тыквы и в модельных смесях, а также калибровочного графика (Рисунок 3.13а, врезка) зависимости оптической плотности от концентрации стандартов α - и β -каротинов позволяет рассчитать суммарное содержание каротиноидов в масле и в фитопрепарате по модельным смесям (Рисунок 3.13б), принимая усредненный удельный коэффициент экстинкции равным 2510.



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

Рис. 3.13. Электронные спектры гексановых растворов каротиноидов: а) раствор фитопрепарата в гексане; врезка - зависимость $A=f(C_{\text{МСТ}})$; б) UV-vis спектры модельных смесей.

Суммарное содержание каротиноидов (в мг) на 100 г МСТ, рассчитанное по формуле 2.1, равно 0.0483 ± 0.0013 мг% (48.3 мкг%).

3.2.2 Определение жирнокислотного состава масла семян тыквы

Масло семян тыквы подвергли пробоподготовке и анализировали жирнокислотный состав согласно ГОСТ 51483-99 «Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме». Методика основана на получении и газохроматографическом анализе метиловых эфиров триглицеридов жирных кислот. Процесс метилирования позволяет получить соединения с температурой кипения ниже, чем у исходных кислот.

Жирнокислотный состав МСТ представлен на рисунке 3.14 и в таблице 3.10.

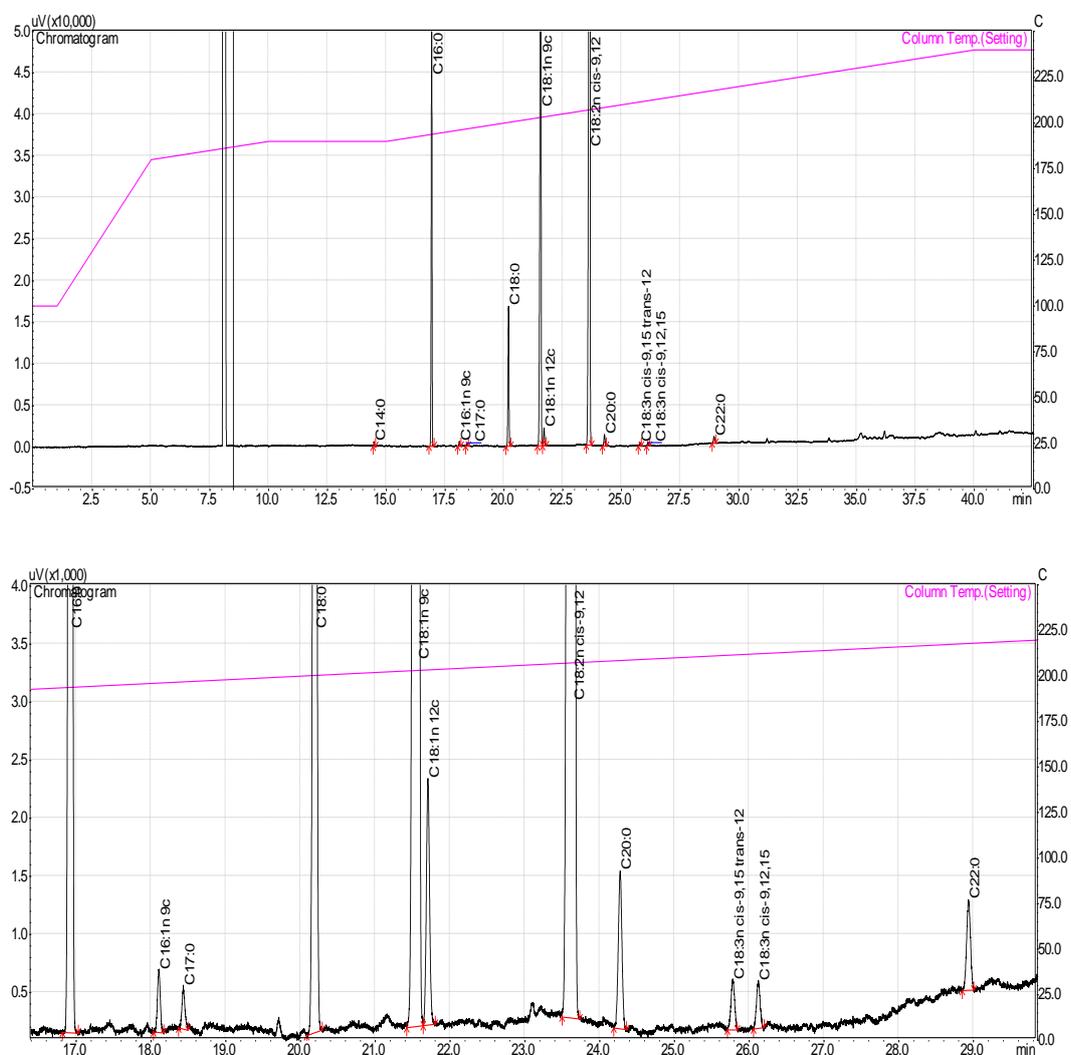


Рисунок 3.14. Хроматограмма образца масла семян тыквы

Таблица 3.10.

Жирнокислотный состав МСТ

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

Показано, что МСТ характеризуется высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот – олеиновой ($\approx 30\%$) и линолевой (49%), что объясняет высокую противовоспалительную активность МСТ. Соотношение количества этих кислот совпадает с рассчитанным балансом компонентов в так называемом «идеальном жире», формула которого разработана Институтом питания РАМН.

Вывод по разделу 3.2

Входной контроль масла семян тыквы показал наличие в нем высокой концентрации каротиноидов и ненасыщенных жирных кислот (линолевой кислоты). Подбор условий для анализа каротиноидов показал возможность использования различных экстрагирующих органических растворителей, при этом правильность методики не нарушается. Сорбционная очистка извлечения позволяет избежать мешающего влияния сопутствующих соединений.

3.3 Разработка методик количественного определения суммы токолов, β -ситостерола и бетулина в фитопрепарате

Нами показано, что введение аскорбиновой кислоты в омыляемую смесь в рекомендуемых Международным протоколом концентрациях, не обеспечивает

стабильности системы: приводит к частичному окислению токоферолов, каротиноидов и деструкции β -ситостерола, что выразалось в невоспроизводимости результатов по количественному определению. В качестве антиоксиданта, препятствующего разрушению компонентов МСТ, для проведения пробоподготовки нами предложено использовать тимол. Выбор тимола обусловлен тем, что, как показано в работе Venu, S., 2013, тимол способен в паре с аскорбиновой кислотой проявлять свойства сильного восстановителя, регенерируя окисленную аскорбиновую кислоту (Рисунок 3.1) [138].

В дальнейшем все эксперименты при пробоподготовке проводили в присутствии смеси тимола и аскорбиновой кислоты при их массовом соотношении 2.5:1 (25% концентрации тимола по отношению к фитопрепарату) (Схема 3.2).

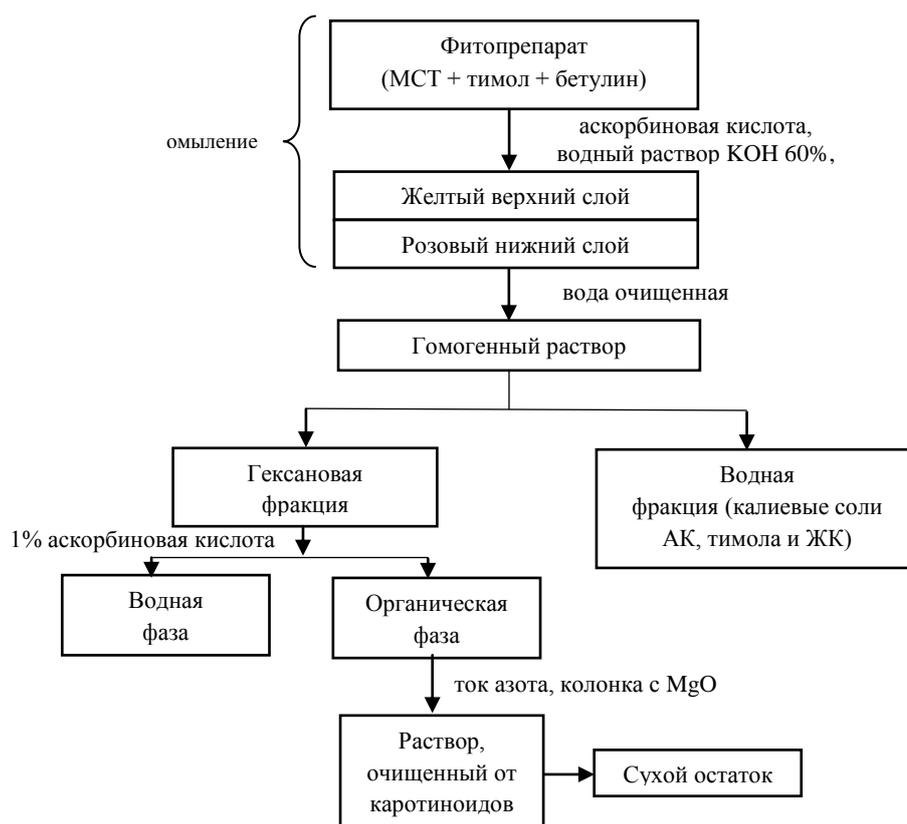
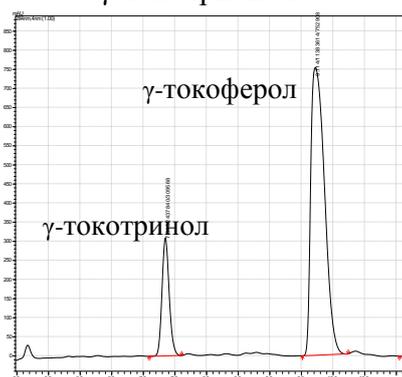


Схема 3.2. Пробоподготовка образцов фитопрепарата для ОФ-ВЭЖХ анализа токолов, фитостеролов и бетулина

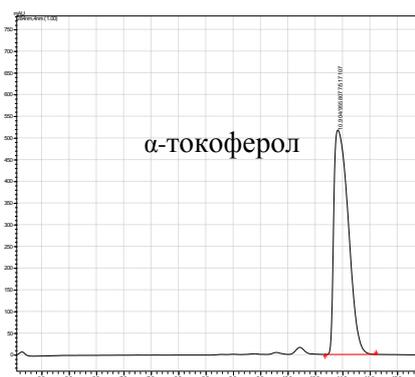
На рисунке 3.15 в, г приведены ВЭЖ-хроматограммы токолов в препарате после омыления жировой фракции в течение 30 и 60 минут в присутствии смеси тимола и аскорбиновой кислоты.

В ходе эксперимента варьировали не только количество антиоксидантов и их соотношение, но также изменяли время омыления фитопрепарата. Целью было достичь полного гидролиза жировой фракции препарата, сохранив при этом в неизменном виде неомыляемые компоненты. В ходе этих экспериментов было доказано, что время оказывает большое влияние на качественный состав и количественное содержание токоферолов и токотриенолов, а, именно, соотношение токолов. После омыления в течение 30 минут токолы были представлены основными тремя компонентами: α -токоферолом ($\tau = 11.47$ мин), γ -токоферолом ($\tau = 9.71$ мин) и γ -токотриенолом ($\tau = 7.34$ мин). Соотнесение пиков α - и γ -токоферолов выполняли с использованием их стандартных образцов (Рисунок 3.15 а, б), а время выхода γ -токотриенола в анализируемых условиях соотносили в соответствии с литературными данными, где анализ проводился в сопоставимых условиях [11]. Показано, что после 30-минутного омыления площадь пика γ -токоферола в 6 раз выше, чем α -токоферола, а площадь пика γ -токотриенола существенно больше, чем у α -токоферола (Рисунок 3.15в) . После длительного омыления (60 минут), вероятно, происходит частичный переход γ -токоферола в γ -токотриенол и концентрация γ -токоферола резко уменьшается, при этом соотношение площади пика γ -токоферола к α -токоферолу составляет 1:1.5.

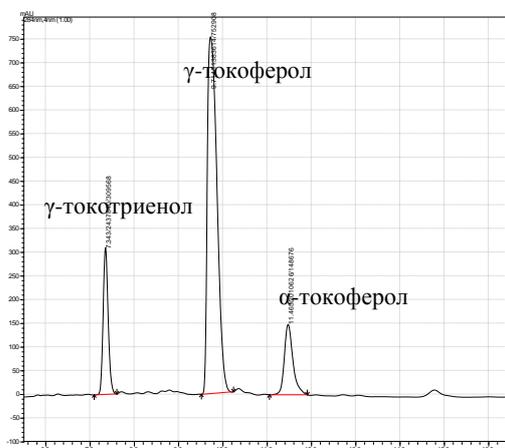
а) стандартный образец смеси γ -токоферола и γ -токоотриенола



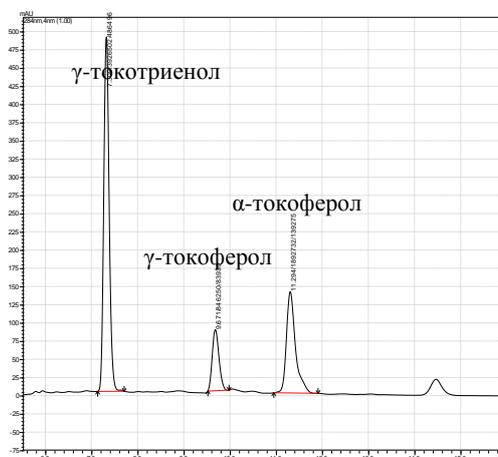
б) стандартный образец α -токоферола



в) фитопрепарат после омыления в течение 30 мин



г) фитопрепарат после омыления в течение 1 часа



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

Рисунок 3.15. ВЭЖ-хроматограммы стандартов токолов и фитопрепарате с различным временем омыления: а) стандарт смеси γ -токоферола и γ -токоотриенола; б) стандарт α -токоферола; в) фитопрепарат после 30 мин омыления и г) фитопрепарат после 1 часа омыления. Элюент – 44:50:6, v/v (ацетонитрил:метанол:дихлорметан), скорость потока 1.0 мл/мин, УФ-детектор (284 нм), 30°C.

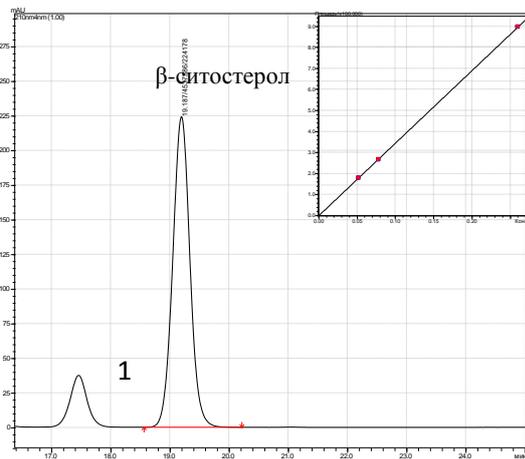
Учитывая этот факт, в дальнейшем омыление проводили в течение 30 минут.

Количество α -токоферола в фитопрепарате составило 7.50 мг%, количество γ -Т составило 5.77 мг%.

Для анализа β -ситостерола в фитопрепарате на основе МСТ был предложен другой режим ОФ-ВЭЖХ-анализа. Выбор режима проводился с учетом подбора элюента, температуры и длины волны детектирования, используя стандарт β -ситостерола и наличия основных минорных компонентов МСТ - кампестерола и стигмастерола. В качестве элюента была выбрана смесь растворителей - ацетонитрил: спирт этиловый 96% (85:15), температура колонки – 40°C, длина волны 210 нм.

На рисунке 3.16 приведена типичная ВЭЖ-хроматограмма препарата после пробоподготовки.

а)



б)

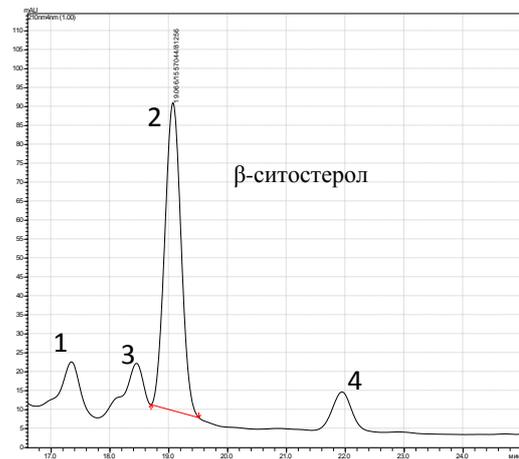


Рисунок 3.16. ВЭЖ-хроматограмма: а) 2 - β -ситостерол; на врезке представлена калибровочная зависимость $A = f(C_{\beta\text{-ст.}})$; 1 – примесь brassикастерола; б) МСТ; 1 – примесь brassикастерола; 2 - β -ситостерол; 3 – кампестерол, 4 - β -D- β -глюкопиранозидная форма ситостерола.

Нами показано, что количественное содержание β -ситостерола в фитопрепарате, определенное по калибровочному графику стандарта β -ситостерола равно 150 ± 10 мг%. Известно, что в большинстве пищевых растительных маслах относительный процент содержания β -ситостерола лежит в

интервале 50-70% от общего количества фитостеролов, что соответствует концентрации β -ситостерола от 100 до 400 мкг%.

Определение бетулина в фитопрепарате. В качестве элюента нами была выбрана смесь растворителей - ацетонитрил: вода (90:10), температура колонки – 40°C, длина волны 210 нм.

На рисунке 3.17 приведена типичная ВЭЖ-хроматограмма бетулина.

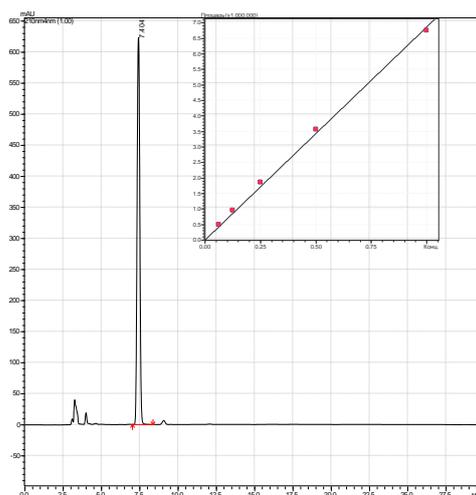


Рисунок 3.17. ВЭЖ-хроматограмма бетулина. На врезке представлена калибровочная зависимость $A = f(C_{\text{бетулина}})$, $Y = aX + b$, где $a = 6867462$, $b = 0.0$, $R^2 = 0.9992550$, $r = 0.9996274$.

Показано, что количественное содержание бетулина в исследуемом фитопрепарате, определенное по калибровочному графику стандарта бетулина, равно 2.13 ± 0.32 г/100 г

Вывод по разделу 3.3

Совместное использование тимола и аскорбиновой кислоты позволяет создать дополнительную антиоксидантную защиту компонентов масла семян тыквы (токолов, фитостеролов). Жесткие условия омыления (концентрированный щелочной раствор и длительное время омыления) способны привести к деструкции соединений, и, как следствие, количественный анализ не даст достоверных результатов, но при использовании смеси аскорбиновая кислота-тимол этого не происходит.

3.4 Контроль качества тимола в фитопрепарате

Тимол в составе фитопрепарата определяли в этанольном экстракте после пропускания через колонку, заполненную оксидом магния, с помощью метода электронной спектроскопии. Колонку диаметром 1.5 см заполняли сорбентом на высоту 10 см. Колоночная хроматография использовалась с целью очистки раствора от окрашенных соединений, присутствующих в масле семян тыквы, - каротиноидов, хлорофиллов. Максимум поглощения регистрировали при длине волны 277 нм. Перед экстракцией к образцу фитопрепарата необходимо добавить щелочной (0.01 М NaOH) раствор NaBH_4 для регенерации хиноидной формы тимола, образовавшейся в процессе хранения фитопрепарата. Окисление тимола до хинона проходит легко под действием окислителей (персульфат аммония, гипохлорит натрия), в УФ-спектре спиртового раствора хинона наблюдается гипсохромный сдвиг.

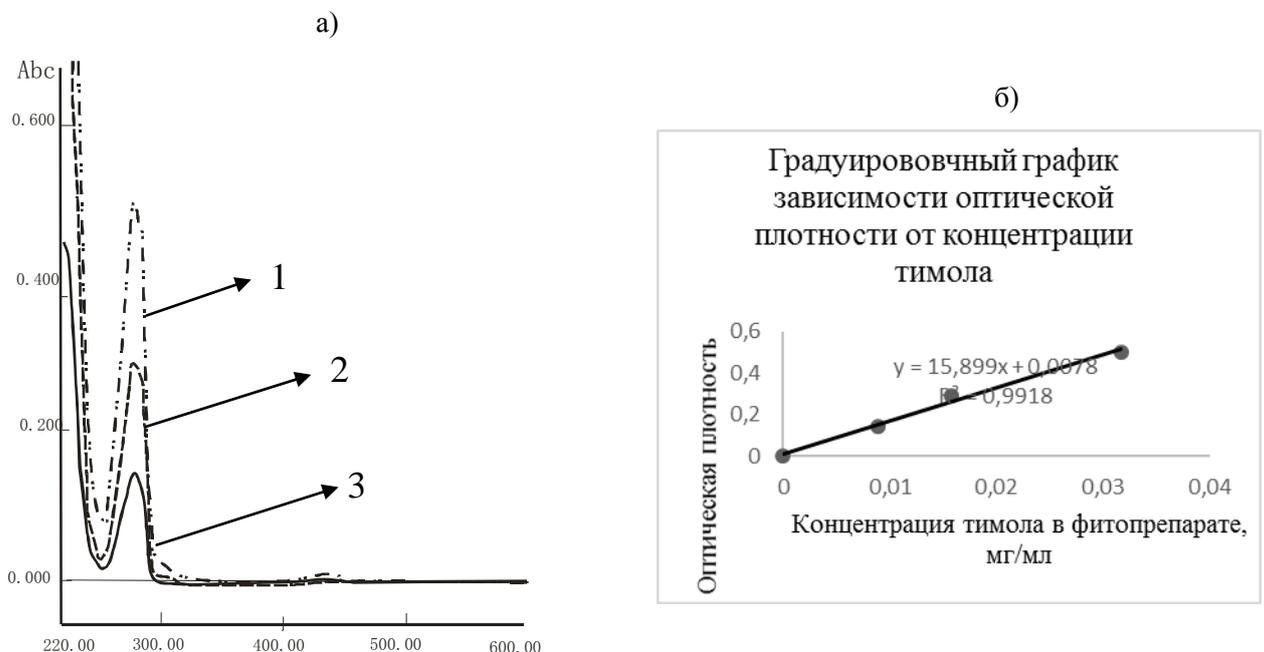


Рис. 3.18. Электронный спектр этанольного экстракта фитопрепарата: 1 – 0.508 мг/мл; 2 - 0.266 мг/мл; 3 - 0.156 мг/мл (а); и градуировочный график для определения содержания тимола в фитопрепарате (б)

После испарения растворителя из спиртового экстракта сухой остаток анализировался методом ИК-спектроскопии (Рисунок 3.19).

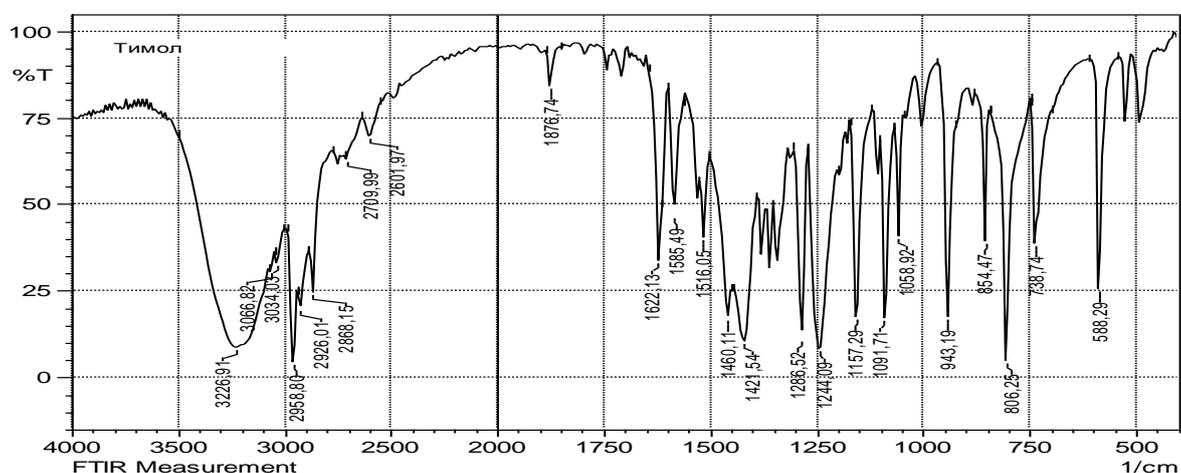


Рисунок 3.19. ИК-спектр тимолола

На ИК спектре наблюдались характерные полосы в области 3280 см^{-1} , соответствующие группировке -OH ; 1091 см^{-1} – соответствующие группировке -C-O ; 806 см^{-1} – соответствующие группировке =CH_2 .

3.5 Определение срока годности фитопрепарата

Установление срока годности фитопрепарата бетулина и тимолола на основе масла семян тыквы проводили в соответствии с ОФС 42-0075-07 ГФ XII, ч.1 «Сроки годности лекарственных средств». Для испытания стабильности фитопрепарата использовали метод «ускоренного старения».

Температурный режим для установления сроков годности фитопрепарата был выбран нами с учетом возможности деструкции (окисления) некоторых его компонентов – токолов, каротиноидов, фитостеролов – при высоких температурах. Величины температур эксперимента соответствовали 36 и 41°C .

Испытания проводили в термощкафу. Коэффициенты соответствия были равны 4.0 и 6.3.

Исследовали 3 серии фитопрепарата, изготовленного в лабораторных условиях со следующим составом: бетулин - 2.1; тимол - 6.4; масло семян тыквы - до 100.0.

Качество изучаемых образцов контролировали с помощью разработанных методик определения количественного содержания каротиноидов (метод электронной спектроскопии), токолов, фитостеролов и бетулина (метод ОФ-ВЭЖХ).

Сроки экспериментального хранения составляли 182 и 116 суток соответственно. По требованиям фармакопейной статьи качество изучаемых образцов контролировали через промежуток времени, соответствующий 6 месяцам хранения при нормальных значениях температуры и влажности воздуха (21⁰С, 45%). Эти промежутки составляли 45.5; 91; 136.5; 182 суток для 36⁰С и 29; 58; 87; 116 суток для 41⁰С.

Данные по контролю качества фитопрепарата в течение срока хранения при заданных условиях приведены в приложении 5 (Таблицы 1-4).

Проведенные исследования подтверждают сохранение качественного и количественного состава фитопрепарата в предложенных условиях «ускоренного старения», соответствующих заявленному сроку хранения в 2 года.

ГЛАВА 4. Разработка проекта фармакопейной статьи на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы

В результате проведенных исследований был разработан проект фармакопейной статьи (приложение 1) на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы, нормы качества на который, а также статистические данные результатов по каждому разделу представлены ниже.

4.1 Нормы качества фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Мелкодисперсная суспензия темно-зеленого цвета с характерным запахом тимола
Подлинность	1. Газовая хроматография 2. ИК-спектроскопия 3. ВЭЖХ 4. УФ-спектроскопия 5. УФ-спектроскопия	1. Времена удерживания пиков метиловых эфиров жирных кислот (олеиновая, линолевая, линоленовая), полученных после метилирования фитопрепарата, должны соответствовать временам удерживания пиков соответствующих метиловых эфиров стандартной смеси. 2. Реперные полосы на ИК-спектре фитопрепарата должны соответствовать полосам на ИК-спектре стандартной смеси бетулин:тимол, взятых в мольном соотношении 1:1. 3. Времена удерживания пиков биологически активных компонентов фитопрепарата (α -, γ -токоферолы, β -ситостерол, бетулин), полученные после соответствующей пробоподготовки при указанных условиях, должны соответствовать временам удерживания пиков стандартных растворов. 4. УФ-спектр гексанового раствора фитопрепарата должен иметь 2 максимума поглощения при длинах волн 424 и 434 нм. 5. УФ-спектр спиртового раствора фитопрепарата после проведения

		восстановления щелочным раствором NaBH ₄ должен иметь максимум поглощения при длине волны 277 нм.
Масса содержащегося	НД	От 9.5 до 10,5 г
Количественное определение:		
каротиноиды	Спектрофотометрия	от 0.035 до 0.058 мг (на 100 г фитопрепарата).
α-токоферол	ВЭЖХ	от 5.63 до 9.38 мг (на 100 г фитопрепарата)
γ- токоферолы	ВЭЖХ	от 4.33 до 7.22 мг (на 100 г фитопрепарата)
β-ситостерол	ВЭЖХ	от 112.5 до 187.5 мг (на 100 г фитопрепарата)
бетулин	ВЭЖХ	от 1.9 до 2.1 г (на 100 г фитопрепарата)
тимол	Спектрофотометрия	6.0 – 6.8 г (на 100 г фитопрепарата)
Микробиологическая чистота	ГФ XII, изд. №1, с. 160	Категория 2
Упаковка	НД	По 10 г в стеклянных флаконах.
Маркировка	НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	НД	В прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.
Срок годности	2 года	

4.2 Валидация методик анализа фитопрепарата.

Валидация методики количественного определения каротиноидов в фитопрепарате. Калибровочные графики зависимостей интенсивностей поглощения А при 424 и 434 нм от концентрации МСТ имеют линейный характер. Уравнение линейной зависимости выглядело следующим образом: $y = 0.4800x + 0.0016$ ($R^2=0.9998$), на основании этого рассчитан $E_{1\text{см}}^{1\%}$, равный 2515.

Суммарное содержание каротинов (в мг) на 100 г фитопрепарата, рассчитанное по формуле 2.1, равно 0.0483 ± 0.0013 мг% (48.3 мкг%). Валидационные характеристики по показателям линейности, сходимости, правильности представлены в таблицах 4.1, 4.2.

Таблица 4.1.

Определение сходимости методики количественного определения суммы каротиноидов в фитопрепарате по модельным смесям

Показатели	Повторность								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Каротиноиды, мкг%	24.0	24.3	23.8	47.9	48.1	47.5	96.4	95.6	95.8
X _{ср.}	24.01			47.80			95.93		
RSD, %	1.06			0.64			0.44		

Таблица 4.2.

Результаты установления правильности методики количественного определения каротиноидов в фитопрепарате методом добавок.

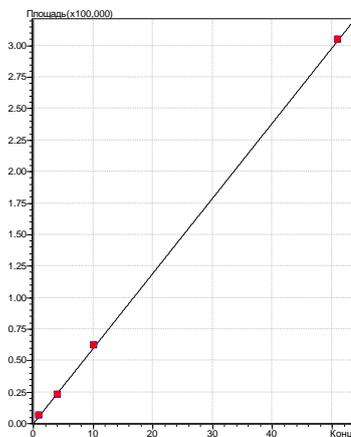
С каротиноидов, мкг%	Добавлено СО каротина, мкг%	Рассчитано, мкг%	Найдено, мкг%	Выход, %
24	10	34	32.3	95.0
24	10	34	31.8	93.5
24	10	34	33.4	98.2
48	20	68	67.8	99.7
48	20	68	65.3	96.0
48	20	68	66.4	97.7
96	30	126	125.7	99.8
96	30	126	126.1	100.1
96	30	126	126.5	100.4
X _{ср.} = 97.81%				

Методика валидирована по показателям правильности, линейности, сходимости.

Валидация методики количественного определения α - и γ -токоферолов в фитопрепарате.

Определение *линейности* проводили на 4 уровнях концентраций от ожидаемого содержания α - и γ -токоферолов в фитопрепарате, аналогично определению каротиноидов. Уравнения линейной регрессии и значения коэффициентов корреляции характеризуют приемлемость данной методики по показателю линейности (Рисунок 4.1 а, б).

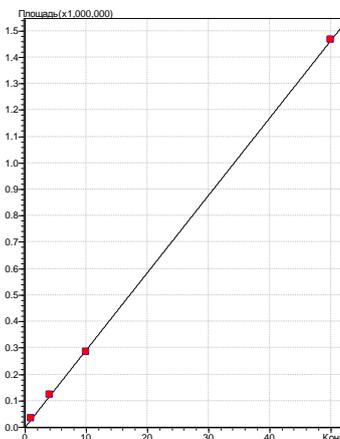
а)

 $S_{\alpha-T}$, мг/л

$$Y = aX + b, \text{ где } a = 5969.58, b = 0.0,$$

$$R^2 = 0.9999506, r = 0.9999753$$

б)

 $S_{\gamma-T}$, мг/л

$$Y = aX + b, \text{ где } a = 29267.57, b = 0.0$$

$$R^2 = 0.9999097, r = 0.9999548$$

Рисунок 4.1. Калибровочные графики зависимости площади пика токолов от концентрации по хроматограммам образцов фитопрепарата после гидролиза; внешними стандартами выступали СО токолов а) α -токоферол; б) γ -токоферол.

Методика соответствует критерию *сходимости* по величине RSD, %, равному 1.68% для α -токоферола и 3.84% для γ -токоферола (Таблица 4.3).

Таблица 4.3.

Определение сходимости методики количественного определения токоферолов в фитопрепарате на примере модельных смесей

Показатели	Повторность								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_{\alpha-T}$, мг%	4.5	4.7	4.6	7.3	7.6	7.5	12.3	12.5	12.4
$C_{\gamma-T}$, мг%	2.9	2.7	3.1	5.8	5.9	5.6	11.3	11.7	11.5
$X_{\text{ср } \alpha-T}$, мг%	4.60			7.48			12.4		
$X_{\text{ср } \gamma-T}$, мг%	2.90			5.77			11.5		
$RSD_{\alpha-T}$, %	2.17			2.05			0.81		
$RSD_{\gamma-T}$, %	6.9			2.88			1.73		

Правильность методики устанавливали методом добавок «введено-найденно» путем измерения количественного содержания α - и γ - токоферолов в растворах при добавлении определенного количества стандартов к исследуемому раствору. Отношение количества введенного токола к найденному ($X_{\text{ср}}$) в % соответствовало 98.75 % (α -токоферол) и 99.13 % (γ -токоферол), что характеризует разработанную методику как правильную (Таблица 4.4).

Таблица 4.4.

Результаты установления правильности методики количественного определения α - и γ - токоферолов в фитопрепарате методом добавок

$C_{\text{исх}}$, мг%		Добавлено CO , мг%		Найдено, мг%		Выход $\alpha-T$, %	Выход $\gamma-T$, %
$\alpha-T$	$\gamma-T$	$\alpha-T$	$\gamma-T$	$\alpha-T$	$\gamma-T$		
4.5	2.9	10		14.2	12.7	97.93	98.45
4.5	2.9	10		14.3	12.6	98.64	97.67
4.5	2.9	10		14.3	12.9	98.64	100.0
7.5	5.8	20		27.3	25.5	99.30	98.84
7.5	5.8	20		26.4	25.3	96.00	98.06
7.5	5.8	20		27.2	25.9	98.91	100.39
12.5	11.6	30		42.3	41.4	99.53	99.52
12.5	11.6	30		42.6	41.1	100.24	98.80
12.5	11.6	30		42.3	41.8	99.53	100.48

На практике были определены *пределы обнаружения*, как соотношение сигнал/шум, равное 3/2, и *предел количественного определения*, как соотношение сигнал/шум 10/1.

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

Валидация методики количественного определения β -ситостерола в фитопрепарате.

Линейность определяли на 3 концентрациях β -ситостерола. Уравнение линейной регрессии имело вид: $y = 3449375x$. Значение коэффициента корреляции составило 0.999.

Сходимость методики оценивали по величине относительного стандартного отклонения RSD%, которое составляло 3.56 %. *Правильность* методики устанавливали путем измерения количественного содержания β -ситостерола в растворах, полученных путем добавления определенного количества стандарта к исследуемому раствору. $X_{\text{ср}}$ находился в пределах от 95,5 до 101,4 %, его средняя величина составила 97,65 %. Таким образом, методика определения β -ситостерола удовлетворяет требованиям по линейности, сходимости, правильности.

Методика имеет предел обнаружения равный 0.0075 ± 0.0002 г/мл, предел количественного определения равный 0.050 ± 0.003 г/мл.

Валидация методики количественного определения бетулина в фитопрепарате.

Линейность определяли при 5 концентрациях бетулина. Уравнение линейной регрессии имело вид: $y = 6867462x$. Значение коэффициента корреляции составило 0.9993. *Сходимость* методики оценивали величине RSD%, которая составляла 2.8 %. *Правильность* методики устанавливали путем измерения количественного содержания бетулина в растворах, полученных путем добавления определенного количества стандарта к исследуемому раствору. $X_{\text{ср}}$ находилось в пределах от 96.15 до 101.42 %, его средняя величина составила 98.31 %.

Методика имеет предел обнаружения равный 0.0075 ± 0.0017 г/мл, предел количественного определения равный 0.0500 ± 0.0011 г/мл.

Таким образом, все разработанные методики отвечали требованиям валидации по проанализированным показателям.

ГЛАВА 5. Лекарственные формы на основе бетулина в масле семян тыквы

5.1 Разработка лекарственных форм на основе фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

Выбор лекарственной формы в дерматологии зависит от ряда факторов: причины заболевания, стадии воспалительного процесса, места нанесения препарата и т.д.

В работе показана возможность получения различных ЛФ с использованием комбинации бетулина и тимола в масле семян тыквы в следующем соотношении фармакологически активных компонентов (масс.%): бетулин 2.1; тимол 6.4; МСТ до 100.0.

В качестве ранозаживляющей лекарственной формы, активной в отношении ожогов, нами предложен крем на эмульсионной основе, имеющий следующий состав:

Компонент	Содержание, масс. %
Бетулин	0.2
Тимол	1.0
Масло семян тыквы	12.0
Аллантоин	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

В водной фазе растворяли аллантоин, нипагин и глицерин. Аллантоин вводили в лекарственную форму как дополнительный увлажняющий и регенерирующий компонент. Нипагин использовали в качестве консерванта.

Аскорбилпальмитат, цетилстеариловый спирт, стеариновая кислота, цетеарет-25 и глицерил стеарат составляли жировую фазу крема, которую гомогенизировали при нагревании до 60°C (гомогенизатор HG-15D-Set-B цифровой, ротор 25 мм).

Аскорбилпальмитат в лекарственной форме выполнял роль антиоксиданта. Цетеарет-25 – экспериментально подобранный эмульгатор, оптимальный для данной системы.

Суспензию действующих веществ (бетулин и тимол в масле семян тыквы) подготавливали следующим образом: бетулин с тимолом растирали в присутствии спирта этилового 96% в коллоидной мельнице шарового типа (МВМ-100) до испарения растворителя. В полученную сухую смесь бетулина и тимола вводили необходимое количество масла семян тыквы и перемешивали до получения суспензионной массы.

Водную фазу нагревали до температуры, равной жировой – 60⁰С, а затем жировую фазу при перемешивании вводили в водную. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры и вводили в нее подготовленную суспензию бетулина и тимола в масле семян тыквы. Готовый крем гомогенизировали при 10 тыс. об./мин в течение 5 мин (гомогенизатор HG-15D-Set-B цифровой, ротор 25 мм).

Крем на эмульсионной основе может применяться для лечения дерматозов в острой и подострой воспалительных фазах, регулирует гидрофильно-липофильный баланс в коже, сравнительно быстро высвобождает действующие компоненты формы.

На основе разработанного состава фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы может быть получена липофильная мазь следующего состава:

Компонент	Содержание, масс.%
Бетулин	0.1
Тимол	0.2
Масло семян тыквы	3.0
Ланолин б/в	7.0
Нафталанская нефть	20.0
Вазелин	до 100.0

Суспензию бетулина и тимола в масле семян тыквы, подготовленную способом, указанным для крема, вводили в жировую основу, состоящую из

безводного ланолина, нафталанской нефти и вазелина. Полученную массу гомогенизировали со скоростью 10 тыс. об./мин в течение 5 минут (гомогенизатор HG-15D-Set-B цифровой, ротор 25 мм).

Нафталанская нефть в составе полученной лекарственной формы проявляет противовоспалительный, регенерирующий и антиаллергенный эффекты.

В отличие от крема, эффект от применения липофильной мази проявляется медленнее, но фармакологически активные компоненты проникают глубже и действуют продолжительнее. Такая особенность связана с образованием на поверхности кожи пленки, препятствующей испарению влаги.

Таким образом, фармакологически активные компоненты - бетулин и тимол в масле семян тыквы – могут быть введены в состав таких лекарственных форм, как крем или мазь.

Также в эксперименте была получена коллагеновая губка на основе бетулина в масле семян тыквы, имеющая следующий состав:

Компонент	Содержание, масс. %
Бетулин	0.1
Тимол	0.2
Масло семян тыквы	3.0
Аллантоин	0.1
Лед. уксусная кислота	1.4
Коллаген 6%	6.3
Вода	до 100.0

Суспензия действующих веществ технологически была получена аналогично эмульсионному крему и липофильной мази.

Коллагеновую основу получали следующим образом: в воде растворяли аллантоин, вводили ледяную уксусную кислоту, а после этого - сухую коллагеновую массу. Для получения однородного коллагенового геля смесь оставляли при комнатной температуре на сутки для набухания.

В полученный коллагеновый гель вводили суспензию бетулина в масле семян тыквы и гомогенизировали в течение 5 минут при 10 тыс. об./мин (гомогенизатор HG-15D-Set-B цифровой, ротор 25 мм).

Эмульсию подвергали сублимационной сушке при температуре от минус 40°C до плюс 38°C в течение 36 часов (сублимационная установка FD-100).

Лекарственная форма в виде коллагеновой губки способна впитывать экссудат, высвобождая при этом в рану фармакологически активные вещества, может применяться для лечения дерматозов, сопровождающихся выделением экссудата.

5.2 Исследование ранозаживляющего действия крема с бетулином на основе масла семян тыквы

Термическое воздействие кипятком (20% п.т., экспозиция 4 сек) вызывало у крыс развитие коагуляционного некроза, распространяющегося на поверхностные слои кожи. Ожоговая рана формировалась на 2-е сутки от начала опыта. У крыс, которым не применяли никакого лечения (1-я серия экспериментов) уже с третьих суток начиналось размягчение центральной части грубого толстого струпа, при надавливании из-под него выделялся гнойно-серозный экссудат. На 7-е сутки в контрольной группе наряду с появляющимися участками краевой эпителизации ран также обнаруживались очаги деструкции и лизиса вновь образующегося эпителия. На 10 сутки в зоне поражения сохраняется отёк. Некротические изменения продолжали распространяться на подлежащие ткани, что можно было расценивать как признаки продолжающейся экссудативной фазы воспаления.

При отсутствии лечения большинство животных контрольной серии находились в тяжёлом состоянии: вялые, гиподинамичные, аппетит был снижен, мало подходили к кормушке, отмечались явления кахексии (потеря массы тела на 22%). Клинически у них развивался симптомокомплекс ожоговой болезни: истощение, потеря в весе, слабость, низкая двигательная активность. Этому состоянию сопутствовала отрицательная картина ряда функциональных и лабораторных биохимических показателей. В динамике состояния периферической сосудистой системы отмечались негативные процессы: показатель микроциркуляции был снижен на 47%. Функционирование эндотелиального, нейрогенного и миогенного механизмов контроля микроциркуляции, также носило дезадаптационный разнонаправленный характер.

О тяжести термической травмы свидетельствовали также и некоторые данные биохимических исследований: в крови развивался оксидативный стресс с возрастанием прооксидантной активности плазмы и снижением антиоксидантных резервов.

Применение для местного лечения в контроле мази Левомеколь® приводило к следующему: локально в течение раневого процесса отмечалось ослабление экссудативной фазы воспаления у подопытных животных, что выражалось макроскопически в меньшей приподнятости краев раны и уменьшении серозно-гнойного отделяемого, у животных фиксировались процессы краевой и островковой эпителизации. На 7 сутки эксперимента наблюдались явления краевой эпителизации раневого дефекта. Заживление ожоговых ран у крыс, которых лечили Левомеколем®, шло, как правило, под некротическим струпом по поверхности очага поражения. К 10-м суткам наблюдения у животных контрольной группы с поверхностными ожогами произошла частичная эпителизация ожоговых ран.

Применение для местного лечения крема с бетулином на основе МСТ приводило к следующему: локально в течении раневого процесса отмечалось ослабление экссудативной фазы воспаления у подопытных животных, что выражалось макроскопически в значительно меньшей приподнятости краев раны и отсутствии серозно-гнойного отделяемого, у подопытных животных наблюдали процессы активной эпителизации под сухим некротическим струпом.

К 10-м суткам наблюдения у части испытуемых животных с поверхностными ожогами в опытной серии произошла значительная по площади эпителизация ожоговых ран, однако объективизировать точно площади заживших ран не представлялось возможным, поскольку эпителизация происходила под сухими неотделившимися струпами некрозов (Рисунок 5.1).



Рисунок 5.1. Внешний вид животных с ожоговыми ранами, получавших в течение 10 дней местное лечение кремом с бетулином на основе МСТ.

Внешний вид животных, их общее состояние, заметно отличались от контрольных: более физически активны, подвижны, не отмечалось потери в весе, чаще пили воду и ели. У всех наблюдалась позитивная динамика по показателю микроциркуляции в зоне поражения, биохимических параметров со стороны крови.

Изменение площади ожоговой поверхности у животных контрольной и основной группы в процессе местного лечения поверхностных термических ожогов с применением традиционного лечения (Левомеколь®) и использованием крема с бетулином на основе МСТ отражено в данных таблицы 5.1.

Таблица 5.1.

Изменение площади ожоговой поверхности у крыс при лечении Левомеколем® и кремом с бетулином на основе МСТ, 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 Б-Т в МСТ)	45	100	89±2	87±2	80±3	78±3	76±2	72±4

Из данных, приведённых в таблице, следует, что площадь раневой поверхности у животных основной группы сокращалась в процессе лечения с большей скоростью, чем в контроле.

Подтверждением позитивного влияния на процессы репарации в ожоговой ране местного применения крема с бетулином на основе МСТ служили функциональные изменения микроциркуляции в зоне повреждения кожных покровов (Таблица 5.2).

Таблица 5.2.

Регистрируемые и расчетные параметры микроциркуляции крови в организме крыс при лечении термического ожога экспериментальным кремом с бетулином на основе МСТ

Группа	ПМ	Э	Н	М	Д	С	ПШ
Интактные животные, (n=40)	13,63±1,60	14,92±1,34	13,46±1,46	9,37±1,16	5,68±1,13	6,06±0,68	1,68±0,23
10 сутки							
Левомеколь®. Контроль 2 N=8	8,28±0,73*	8,01±1,04*	9,88±0,79*	12,79±1,26*	11,58±1,16*	9,86±1,32*	0,79±0,10
Крем с бетулином на основе МСТ n=10	10,6±1,08	10,2±1,12*	9,5±1,52	14,04±1,66*	8,9±1,47*	3,3±0,48	1,01±0,37*

Примечание: ПМ – показатель микроциркуляции; Э – эндотелиальный компонент регуляции, Н – нейрогенный компонент, М – миогенный компонент, Д – дыхательный компонент, С – сердечный компонент; ПШ – показатель шунтирования; * – статистическая значимость различий по отношению к уровню интактных животных $p < 0,05$

В опытной группе - крем с бетулином на основе МСТ - в конце срока наблюдения (10 сутки) показатель микроциркуляции составлял 10,6±1,08 усл.ед - 78% от уровня здоровых животных). Показатель микроциркуляции в контрольной

группе животных, у которых применялся Левомеколь® составлял 61 % от исходного уровня ($8,28 \pm 0,73$; $p < 0,05$). Основные факторы активной регуляции микрокровотока (эндотелиальный, миогенный) были на 27, 10 % выше, чем в контроле. Менее значимо было участие в регуляции микроциркуляции на этом этапе нейрогенного компонента и, что особенно заметно – в меньшей степени были задействованы дыхательный и сердечный компоненты. В организме подопытных животных после нанесения термической травмы развивался оксидативный стресс с усилением прооксидантного потенциала и истощением антиоксидантных резервов.

Применение для местного лечения стандартного мазевого покрытия - мази Левомеколь® не обеспечивало купирования дезадаптивных явлений со стороны про- и антиоксидантных систем. В опытной группе животных, у которых лечение ожоговых ран проводилось кремом с бетулином на основе МСТ на 10 сутки отмечался выраженный антиоксидантный эффект – увеличение более чем в 2,2 раза ($0,987 \pm 0,08^*$) по сравнению с исходным уровнем. Параметры суммарной антиоксидантной активности в опытной группе были существенно выше показателей контрольной группы животных (Таблица 5.3).

Таблица 5.3.

Биохимические параметры крови крыс на фоне лечения ожога кремом с бетулином на основе МСТ и Левомеколем®

Параметр	Интактные крысы	Контроль ожога	
		Левомеколь® (10 суток)	Крем с бетулином на основе МСТ (10 суток)
S (светосумма ХЛ)	$10,5 \pm 1,1$	$17,7 \pm 1,8^*$	$13,43 \pm 1,2$
tg 2α (АОА)	$0,44 \pm 0,09$	$0,234 \pm 0,04^*$	$0,987 \pm 0,08^*$
ПРЭ	$8,05 \pm 0,9$	$6,21 \pm 0,4$	$7,63 \pm 0,72^*$

В целом, следует отметить, что использование для местного лечения покрытий, содержащих бетулин в МСТ, способствует 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.

Таким образом, в зависимости от назначения препарата (стадии заболевания, остроты воспалительного процесса) могут применяться различные лекарственные формы с бетулином в масле семян тыквы. Высокая фармакологическая активность крема с бетулином на основе МСТ, доказана в эксперименте на животных: лекарственная форма проявляет хороший регенерирующий и антиоксидантный эффекты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами разработаны состав и методики контроля качества противовоспалительного фитопрепарата 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 бетулина и тимола в масле семян тыквы с широким спектром фармакологического воздействия и исследовании их медико-биологических свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абек, Д. Болезни кожи у детей. Диагностика и лечение [Текст] / Д.Абек, В.Бургдорф, Х.Кремер. - М.: Мед. лит., 2007. – 160 с.
2. Адамс, Н.К. Физика и химия поверхностей. [Текст] / Н.К.Адамс. – М.: ОГИЗ, 1947. – 568 с.
3. Адамян, А.А. Лечение гнойных ран Гелевином и биологически активными дренирующими сорбентами на их основе [Текст] / А.А.Адамян, С.В.Добыш, С.П.Глянец // Хирургия. - 1998. - № 3. - С. 28-30.
4. Айзятулов, Р.Ф. Значение факторов риска в возникновении и течении псориазической болезни [Текст] / Р.Ф.Айзятулов, В.В.Юхименко // Вестник дерматологии и венерологии. - 2001. - № 1. - С. 41-43.
5. Алексеев, А.А. Актуальные вопросы организации и состояние медицинской помощи пострадавшим от ожогов [Текст] / А.А.Алексеев, В.А.Лавров // Комбустиология: электронный журнал. — 2008. № 35.
6. Аравийская, Е.Р. Руководство по дерматокосметологии [Текст] / Е.Р. Аравийская, Е.В. Соколовский. - СПб: ООО "Издательство Фолиант", 2008. - 632 с.: ил.
7. Бакулев, А.Л. Современные подходы к классификации топических глюкокортикостероидов в России и за рубежом [Текст] / А.Л.Бакулев, А.Н.Платонова // Вестн. дерматол. и венерол. - 2010. - № 3. - С. 67-69.
8. Батыршина, С.В. Концепция местной терапии больных атопическим дерматитом [Текст] / С.В.Батыршина, Л.А.Хаертдинова // Практическая медицина. - 2009. - №3 (35). - С. 41-45.
9. Бауманн, Л. Косметическая дерматология. Принципы и практика [Текст] / Лесли Л. Бауманн ; пер. с англ. ; под ред. докт. мед. наук, проф. Н.Н.Потекаева. – М. : МЕДпресс-информ, 2012. – 688 с. : ил. 48.
10. Белоусова, Т.А. Алгоритм наружной терапии дерматозов сочетанной этиологии [Текст] / Т.А.Белоусова, М.В.Горячкина // Вестник дерматологии и венерологии. - 2011. - № 5. - С. 138–144.

11. Болотная, Л.А. Место антигистаминных препаратов в терапии зудящих дерматозов аллергического генеза [Текст] / Л.А.Болотная // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. - 2010. - № 2 (37). - С. 29-34.
12. Болотная, Л.А. Рациональный выбор средств наружной терапии осложненных дерматозов [Текст] / Л.А.Болотная // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. - 2010. - № 3. - С. 98—101.
13. Борисова, О.Е. Клиническая фармакология парентеральных форм глюкокортикостероидов [Текст] / О.Е. Борисова // Лечебное дело. - 2007. - № 3. - С. 17-24.
14. Бутко, Я.А. Ожоги кожных покровов: классификация и методы лечения [Текст] / Я.А.Бутко, О.В.Ткачева // Провизор. - 2008. - N № 2. - С. 23-28.
15. Геннис, Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции [Текст] / Р.Геннис. - М.: Мир, 1997. - 624с.
16. Гладышев, М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека [Текст] / М.И.Гладышев // Journal of Siberian Federal University. Biology. - 2012. - № 4. - С. 352-386.
17. ГОСТ 31665-2012 Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот [Текст] . - М.: Стандартинформ, 2013. - 11 с.
18. ГОСТ 51483-99 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме [Текст] . - М.: Стандартинформ, 2005. - 11 с.
19. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII. М.: Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2010. Ч. 2. – 502 с.
20. Гришкoveц, В.И. Синтез сульфатов тритерпеноидов с использованием комплекса SO₃-диметилсульфоксид [Текст] / В.И.Гришкoveц // Химия природных соединений. - 1999. - № 1. - С. 91-93.
21. Гудвин, Т. Сравнительная биохимия каротиноидов [Текст] / Т.Гудвин, пер. с англ. - М.: ИЛ, 1954. - 396 с.
22. Данилова, А.А. Результаты исследования клинической эффективности и безопасности препарата Цинокап крем [Текст] / А.А.Данилова, И.М.Косорукова // Вестник дерматологии и венерологии. - 2010. - № 6. - С. 107–113.

23. Децина, А.Н. Теория мягких косметологических воздействий. [Текст] Современная косметология: монография / А.Н.Децина.. - Новосибирск, 2001. – 505 с.
24. Дурнев, А.Д. Изучение противоаллергенного действия экстракта бересты сухого с содержанием бетулина не менее 70% [Текст] / А.Д.Дурнев, А.Н.Чистяков, В.С.Кудрин, Л.П.Коваленко, П.М.Клодт, Г.А.Преснова, В.В.Балакшин, Е.В.Шипаева // Химико-фармацевтический журнал. - 2009. - № 2. - С.43-47.
25. Ердакова, В.П. Теоретические и практические основы конструирования современных космецевтических средств, обладающих трансдермальной активностью [Текст]: монография / В.П. Ердакова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2008. – 326 с.
26. Знаменская, Л.Ф. Нарушение эпидермального барьера и пути его коррекции [Текст] / Л.Ф.Знаменская, С.В.Яковлева // Вестник дерматологии и венерологии. - 2009. - № 4. - С. 85–87.
27. Истранов, Л.П. Местные гемостатические средства на основе коллагена [Текст] / Л.П.Истранов, Р.К.Абоянц, Е.В.Истранова // ФАРМиндекс-Практик. - 2006. - № 10. - С. 56-59.
28. Камараса, Дж.Г. Глюкокортикоиды местные [Текст] / В кн.: Европейское руководство по лечению дерматологических заболеваний / Дж.Г. Камараса, А.Гименез-Арнау; под ред. А.Д. Кацамбаса, Т.М. Лотти. — М.: МЕДпресс-информ. 2009. — С. 638-651.
29. Карлина, М.В. Изучение противовоспалительных свойств суспензии бетулина [Текст] / М.В.Карлина, А.В.Вавилова // Мат. науч.-практ. конф. сотрудников и студентов СПбГМА им. И.И. Мечникова, посвящ. 60-летию победы в ВОВ. 20-30 апреля- 2005. – С. 36-37.
30. Кислицын, А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение (обзор) [Текст] / А.Н.Кислицын // Химия древесины. - 1994. - № 3. - С. 3–28.
31. Кочергин, Н.Г. Современный взгляд на проблему выбора лекарственной формы средств наружной терапии [Текст] / Н.Г.Кочергин, Д.Д.Петрунин // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. - 2012. - № 4 (47). - С. 59-67.
32. Кузнецова, С.А. Изучение состава и антиоксидантных свойств гексанового и этанольного экстрактов бересты [Текст] / С.А.Кузнецова,

Н.М.Титова, Г.С.Калачева и др. // Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки. - 2005. - № 2. - С.113-118.

33. Кузнецова, С.А. Противоопухольевый эффект бетулина и его композитов [Текст] / С.А.Кузнецова, М.А.Михайленко, Т.П.Шахтштейдер, Ю.Н.Маляр, О.Ф.Веселова, Т.Н.Замай, В.В.Болдырев // Сборник статей «Научно-практические аспекты модернизации онкологической службы регионального уровня» : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междуна. участием. — Красноярск. -, 2012. - С. 99-105.

34. Кунгуров, Н.В. Разработка нового средства топической проактивной терапии для больных хроническими дерматозами [Текст] / Н.В. Кунгуров, Н.В. Зильбергберг, М.М. Кохан // Клиническая дерматология и венерология. – 2013. - № 6.-С.76-81.

35. Курегян, А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов [Текст] / А.Г.Курегян // Фундаментальные исследования. - 2015. - № 2-23. - С. 5166-5172.

36. Кутасевич, Я.Ф. Место системных ретиноидов в лечении розацеа [Текст] / Я.Ф.Кутасевич, И.А.Маштакова, И.А.Олейник // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. - 2013. - № 1 (48). - С. 113-117.

37. Литвиненко, А.В. Общие принципы системной глюкокортикостероидной терапии [Текст] / А.В.Литвиненко // Украинский пульмонологический журнал. - 2014. - № 1. - С. 60-64.

38. Ломакина, Е.А. Роль барьерной функции кожи в патогенезе некоторых дерматозов [Текст] / Е.А.Ломакина // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. - 2009. - № 2. - С. 87–90.

39. Ломоносов, К.М. Топические стероиды в лечение дерматозов с выраженным гиперкератозом [Текст] / К.М.Ломоносов, Д.В.Игнатъев // Consilium medicum, приложение Дерматология. - 2009. - № 2. - С. 3-8.

40. Маляр, Ю. Н. Улучшение растворимости тритерпеноидов коры березы с использованием механохимической активации [Электронный ресурс] / Ю.Н.Маляр // Молодежь и наука: сборник материалов IX Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, посвященной 385-летию со дня основания г. Красноярск [Электронный ресурс]. — Красноярск: Сибирский федеральный ун-т. –, 2013. — Режим доступа: <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2013/section041.html>.

41. Матушевская, Е.В. Антибактериальные препараты в форме аэрозолей в топической терапии пиодермий и дерматозов, осложненных вторичной инфекцией [Текст] / Е.В.Матушевская // Вестник дерматологии и венерологии. - 2014. - № 2. - С. 60-63.

42. Михайленко, М.А. Влияние механической обработки на свойства бетулина, диацетатабетулина и их смеси с водорастворимыми полимерами [Текст] / М.А.Михайленко, Т.П.Шахтшнейдер, В.А.Дребушак, Г.П.Скворцова, С.А.Кузнецова, В.В.Болдырев // Химия природных соединений. - 2011. - № 2. - С. 211–214.

43. Наканиси, К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений [Текст] Практическое руководство./ К.Наканиси / Изд. Мир, - М. 1965. - С. 36-37

44. Нифталиев, С.И. Газохроматографическое определение жирнокислотного состава заменителей молочного жира и других специализированных жиров [Текст] / С.И.Нифталиев, Е.И.Мельникова, А.А.Селиванова // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2009. - Т. 9. - Вып. 4(183). - С. 574-581.

45. Огородова, Л.М. Роль нарушений структурно-функционального статуса поверхностной липидной пленки в патогенезе атонического дерматита у детей [Текст] / Л.М.Огородова, Т.А.Нагаева, Л.В.Ходкевич, Д.Л.Чухнова // Аллергология. - 2003. - № 2. - С. 17—20.

46. Парамонов, Б.А. Современные аэрозоли для лечения ран и ожогов [Текст] / Б.А.Парамонов // Terra Medica. - 2004. - № 1(33). - С. 23-26.

47. Пат. 2049462 Российская Федерация, МПК А61К7/035. Пудра-присыпка [Текст] / Некрасова В.Б., Никитина Т.В., Никаноров Е.И., Панасенкова Н.А., Афиногенов Г.Е., Доморад А.А., Бомштейн А.Л.; заявитель и патентообладатель Товарищество с ограниченной ответственностью "Фитолон" - № 93019879/14. заявл. 18.05.1993, опубл. 10.12.1995, Бюл. N. 2-2004.

48. Пат. 2291684 Российская Федерация, МПК А61К8/97, А61К8/92, А61К8/34, А61Q99/00. Активная добавка для косметических средств и способ ее получения [Текст] / Вайнштейн В.А., Масленникова Н.А., Борц М.С., Николаева Е.Г., Лаевский И.С., Белякова А.В.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью Химико-биологическое объединение при РАН "Фирма Вита" - № 2004113333/15. заявл. 29.04.2004, опубл. 20.01.2007.

49. Пат. 2324491 Российская Федерация, МПК А61К36/185, А61Р37/08. Средство против аллергии [Текст] / Коваленко Л.П., Шипаева Е.В., Дурнев А.Д., Балакшин В.В., Чистяков А.Н.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "Березовый мир" - № 2006137674/15. заявл. 25.10.2006, опубл. 20.05.2008.

50. Пат. 2401118 Российская Федерация, МПК А61К36/185, А61К31/015, А61К31/79. Композиция бетулина с биосовместимыми носителями и способ ее получения [Текст] / Михайленко М.А., Шахтшнейдер Т.П., Брезгунова М.Е., Кузнецова С.А., Болдырев В.В.; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет (НГУ) - № 2009114188/15. заявл. 14.04.2009, опубл. 10.10.2010.

51. Пат. 2452475 Российская Федерация, МПК А61К31/015, А61Р17/02. Средство для лечения ран, ожогов и инфекционно-воспалительных заболеваний кожи, придатков кожи и слизистых оболочек [Текст] / Стернин Ю.И., Юрченко И.В., Москалев Е.В., Дьячук Г.И.; заявитель и патентообладатель Закрытое акционерное общество "СНС-Фарма" - № 2010124992/15. заявл. 17.06.2010, опубл. 10.06.2012.

52. Пат. 2519133 Российская Федерация, МПК А61Р31/12, А61Р31/10, А61Р31/04, А61К9/06, А61К31/015. Мазь, содержащая инкапсулированную тритерпеновую кислоту или ее производные [Текст] / Клопотенко Л.Л.; заявитель и патентообладатель Клопотенко Л.Л. – № 2012147869/15. заявл. 09.11.2012, опубл. 10.06.2014.

53. Пелипенко, Т.В. Состав и свойства льняного масла как ингредиента косметических средств [Текст] / Т.В.Пелипенко, А.П.Гюлушанян, Е.А.Калиенко, А.А.Мирзоян // Научный журнал КубГАУ. - 2014 - № 103(09). - С. 1-11.

54. Прохоренков, В.И. Особенности жирнокислотного спектра липидов пораженного эпидермиса у больных псориазом [Текст] / В.И.Прохоренков, С.В.Клеменков, Т.М.Вандышева // Сиб. журн. дерм. и венер. - 2001. - № 1. - С. 36-37.

55. Свирцевская, Е.В. Сравнительный анализ эффективности и безопасности фторированных и хлорированных топических глюкокортикостероидов [Текст] / Е.В.Свирцевская, Е.В.Матушевская // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. - 2010. - № 3. - С. 75–78.

56. Сергеев, Д.В. Ранозаживляющие и противоожоговые свойства бетулинсодержащих мазей [Текст] / Д.В.Сергеев, С.Н.Прошин, Г.И.Дьячук // Медико-биологические и социально-биологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. - 2011. - № 2. - С. 76-79.
57. Сизова, Н. Жирнокислотный состав масла *Camelina sativa* (L.) crantz и выбор оптимального антиоксиданта [Текст] / Н.Сизова, И.Пикулева, Т.Чикунова // Химия растительного сырья. - 2003. - № 2. - С. 27–31.
58. Сизова, Н.В. Определение токоферолов как липидных антиоксидантов в растительных маслах и животных жирах [Текст] / Н.В.Сизова // Химия растительного сырья. - 2013. - № 1. - С. 157-163.
59. Сухарев, А.В. Современные топические глюкокортикостероиды при лечении атопического дерматита [Текст] / А.В.Сухарев, А.В.Патрушев, Р.Н.Назаров, и др. // Consilium Medicum. - 2014. - Т.16. - № 6. - С. 98—100.
60. Толстиков, Г.А. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность [Текст] / Г.А.Толстиков, О.Б.Флехтер, Э.Э.Шульц, Л.А.Балтина, А.Г.Толстиков // Химия в интересах устойчивого развития. - 2005. - № 13. - С. 1—30.
61. Тринеева, О.В. Методы анализа витамина Е (обзор) [Текст] / О.В.Тринеева // Вестник ВГУ. - 2013. - № 1. – С. 212-224.
62. Тюкавкина, Н. Стандартизация и контроль качества лекарственных средств. [Текст] / Н.Тюкавкина. - М.: Медицинское Информационное Агентство (МИА), 2008. - 146-189 с.
63. Филимонкова, Н.Н. Комбинированная топическая терапия хронических дерматозов [Текст] / Н.Н.Филимонкова, Е.А.Бахлыкова // Вестник дерматологии и венерологии. - 2015. - № 3. - С. 147-152.
64. Филимонкова, Н.Н. Наружная терапия больных псориазом [Текст] / Н.Н.Филимонкова, К.А.Чуверова, И.А.Ян // Клиническая дерматология и венерология. - 2009. - № 2. - С. 51-53.
65. Ходкевич Л.В. Структура и функции поверхностной липидной пленки кожи при атопическом дерматите у детей [Текст]: автореферат дис. ... канд. мед. наук : 14.00.09, 14.00.16 / Л.В. Ходкевич ; Сиб.гос. мед. ун-т . - Томск, 2003. - 31 с.
66. Хышиктуев, Б.С. Процессы липопероксидации в эпидермисе больных псориазом [Текст] / Б.С.Хышиктуев, Г.Н.Тарасенко, Е.В.Фалько и др. // Военно-медицинский журнал. - 2000. - Т. СССXXI. - № 7. - С. 40-43.

67. Чуракаев, М.В. Современные подходы к комплексному лечению экземы [Текст] / М.В.Чуракаев // Вестник КРСУ. - 2015. - Т. 15. - № 5. - С. 209-211.
68. Шаповалов, С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии [Текст] / С.Г.Шаповалов // ФАРМиндекс-Практик. - 2005. - № 8. - С. 38-46.
69. Шахтшнейдер, Т.П. Получение нетоксичных композитов бетулина с поливинилпирролидоном и полиэтиленгликолем [Текст] / Т.П.Шахтшнейдер, С.А.Кузнецова, М.А.Михайленко, Ю.Н.Маляр, В.В.Болдырев // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. - 2012. - № 1. - С. 52-60.
70. Шиков, А. Растительные масла и масляные экстракты: технология, стандартизация, свойства [Текст] / А.Шиков, В.Макаров, В.Рыженков.. - М. : Издательский дом «Русский врач». 2004. - 264 с.
71. Шупенько, Н.М. Применение топических глюкокортикостероидных гормонов в дерматологической практике [Текст] / Н.М.Шупенько // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. - 2004. - № 3. - С. 33-35.
72. Aluyor, E.O. Chromatographic analysis of vegetable oils [Текст] / E.O.Aluyor, C.E.Ozigagu, O.I.Oboh, P.Aluyor // Scientific Research and Essay. - 2009. - Vol. 4 (4). - P.191-197.
73. Alvarez, A.M.R. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations [Текст] / A.M.R.Alvarez, M.L.G.Rodriguez Grasas // Grasas y Aceites. - 2000. - Vol. 51. - P.74-96.
74. Ardabili, A. Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*) Grown in Iran [Текст] / A.Ardabili, R.Farhoosh, M.Khodaparast // J. Agr. Sci. Tech. - 2011. - Vol. 13. - P.1053-1063.
75. Azevedo-Meleiro, C. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo* [Текст] / C.Azevedo-Meleiro, D.Rodriguez-Amaya // J. Agric. Food Chem. - 2007. - Vol. 55. - № 10. - P.4027-4033.
76. Baskar, V. Characterization of carotenoids from selected strains of *Streptomyces* sp [Текст] / V.Baskar, P.Madhanraj, K.Kanimozhi, A.Panneerselvam // Annals of Biological Research. - 2010. - № 1 (4). - P.194-200.

77. Bele, C. Tocopherol Content in Vegetable Oils Using a Rapid HPLC Fluorescence Detection Method [Текст] / C.Bele, C.T.Matea, C.Raducu, V.Miresan, O.Negrea // Not Bot Horti Agrobo. - 2013. - № 41(1). - P. 93-96.
78. Carr, T. Cholesterol-lowering phytosterols: factors affecting their use and efficacy [Текст] / T.Carr, M.Ash, A.Brown // Nutrition and Dietary Supplements. - 2010. - Vol. 2. - P.59-72.
79. Carr, T. Food ingredients that reduce cholesterol absorption [Текст] / T.Carr, E.Jesch // Adv. Food Nutr. Res. - 2006. - № 51. - P.165-204.
80. Carretero, M.I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health [Текст] / M.I.Carretero // Applied Clay Science. - 2002. - № 21. - P.155–163.
81. Cenkowski, S. Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil [Текст] / S.Cenkowski, R.Yakimishen, R.Przybylski, W.Muir // Canadian biosystems engineering. - 2006. - Vol. 48. - P.3.9-3.16.
82. Chen, Y.-Z. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / Y.-Z.Chen, S.-Y.Kao, H.-C.Jian, Y.-M.Yu, J.-Y.Li, W.-H.Wang, C.-W.Tsai // Journal of food and drug analysis. - 2015. - № 23. - P.636-644.
83. Chin, S-F. Reduction of DNA damage in older healthy adults by Tri E Tocotrienol supplementation [Текст] / S-F.Chin, N.Hamid, A Latiff. et al. // Nutrition. - 2008. - Vol. 24. - № 1. - P.1–10.
84. Chowdhury, K. Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil [Текст] / K.Chowdhury, L.Banu, S.Khan, A.Latif // Bangladesh J. Sci. Ind. Res. - 2007. - Vol. 42. - № 3. - P.311-316.
85. Cunha, S. Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese Olive Oils Using HPLC with Three Different Detection Systems [Текст] / S.Cunha, J.Amaral, J.O.Fernandes, M.B.P.Oliveira // Agric. Food Chem. - 2006. - № 54. - P.3351–3356.
86. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Analysis of Tocopherols and Tocotrienols [Текст] D1.5.12 Supplement 4 Contributed. / Zhimin Xu // D1.5.1-D1.5.12 by John Wiley & Sons, Inc. – 2002.
87. Czaplicki, S. Characteristics of Biologically-Active Substances of Amaranth Oil Obtained by Various Techniques [Текст] / S.Czaplicki, D.Ogrodowska, R.Zadernowski, D.Derewiaka // Pol. J. Food Nutr. Sci. - 2012. - Vol. 62. - № 4. - P.235-239.

88. Darvin, E. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin [Текст] / E.Darvin, M.C.Meinke, W.Sterry, J.Lademann // J. Biomed. Opt. - 2013. - № 18(6). - P.441–448.
89. Darvin, E. The Role of Carotenoids in Human Skin [Текст] / E.Darvin, W.Sterry, J.Lademann, T.Vergou // Molecules. - 2011. - № 16. - P.10491-10506.
90. Dehelean, C. Physico-chemical and Molecular Analysis of Antitumoral Pentacyclic Triterpenes in Complexation with Gamma-cyclodextrin [Текст] / C.Dehelean, C.Oica, C.Peev, A.Gruia, E.Eclaman // Rev. Chim. - 2008. - № 59(8). - P.887-890.
91. Delia, B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods [Текст] - Brasil: ILSI Press. 2001. - 64 p.
92. Derakhshan-Honarparvar, M. Rice Bran Phytosterols of Three Widespread Iranian Cultivars [Текст] / M.Derakhshan-Honarparvar, M.M.Hamedi., M.Kh.Pirouzifard // J. Agr. Sci. Tech. - 2010. - Vol. 12. - P.167-172.
93. Dutta, D. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids [Текст] / D.Dutta, U.R.Chaudhuri, R.Chakraborty // African Journal of Biotechnology. - 2011. - Vol. 4 (13). - P.1510-1520.
94. Erinç, H. Determination of fatty acid, tocopherol and phytosterol contents of the oils of various poppy (*Papaver somniferum*L.) seeds [Текст] / H.Erinç, A.Tekin, M.M.Özcan // Grasas y aceites. - 2009. - № 60(4). - P.375-381.
95. Fiedor, J. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease [Текст] / J.Fiedor, K.Burda // Nutrients. - 2014. - № 6. - P.466-488.
96. Fruhwirth, G. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities [Текст] / G.Fruhwirth, A.Hermetter // Eur. J. Lipid Sci. Technol. - 2007. - Vol. 109. - № 11. - P.1128–1140.
97. Gianeti, M.D. Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations [Текст] / M.D.Gianeti, L.R.Gaspar, F.B.J.Camargo, M.Campos // Molecules. - 2012. - № 17. - P.2219-2230.
98. Gimeno, E. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversedphase high-performance liquid chromatography [Текст] / E.Gimeno, A.I.Castellote, R.M.Lamuela-Raventos, M.C.Torre, M.C.Lopez-Sabater // Journal of Chromatography A. - 2000. - № 881. - P.251–254.

99. Gliszczyńska-Świgło, A. Tocopherol content in edible plant oils [Текст] / A.Gliszczyńska-Świgło, E.Sikorska, I.Khmelinskii, M.Sikorski // Pol. J. Food Nutr. Sci. - 2007. - Vol. 57. - № 4. - P.157-161.
100. Gromadzka, J. Trends in Edible Vegetable Oils Analysis [Текст] / J.Gromadzka, W.Wardencki // Pol. J. Food Nutr. Sci. - 2011. - Vol. 61. - № 2. - P.89-99.
101. Gül, M.K. Changes in Phytosterols in Rapeseed (*Brassica napus* L.) and Their Interaction with Nitrogen Fertilization [Текст] / M.K.Gül, C.Ö.Egesel, Ş.Tayyar, F.Kahriman // Int. J. Agri. Biol. - 2007. - Vol. 9. - № 2. - P.250-253.
102. Heldreth, B. Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the safety assessment of methyl acetate [Текст] / B.Heldreth, W.F.Bergfeld, D.V.Belsito, R.A.Hill, C.D.Klaassen, D.Liebler, J.G.Jr Marks, R.C.Shank, T.J.Slaga, P.W.Snyder, F.A.Andersen // Int. J. Toxicol. - 2012. - № 4. - P.112-136.
103. Hunter, J.A.A. Clinical dermatology [Текст] / J.A.A. Hunter, J.A. Savin, M.V. Dahl.— 3rd ed. — 2008. - p.377
104. Jaaskebainen, P. Betulinol and its utilization [Текст] / P.Jaaskebainen // Pap.ja puu. - 1981. - V.63. - № 10. - P.599-603.
105. Jakubovic, H.R. Structure and function of skin: development morphology and physiology [Текст] / H.R.Jakubovic, A.B.Ackerman // Dermatology. - 1992. - Vol.3. - P.3–87.
106. Kadajji, V.G. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications [Текст] / V.G.Kadajji, G.V.Betageri // Polymers. - 2011. - № 3. - P.1972-2009.
107. Kakade, A.N. HPLC analysis of β -sitosterol in herbal medicine and vegetable oils [Текст] / A.N.Kakade, C.S.Magdum // IJPLS. - 2012. - Vol. 3. - Issue 5. - P.1666-1669.
108. Katchen, B. The Amino Acid Composition of the Horny Layer of the Human Skin [Текст] / B.Katchen, F.Reiss // The Journal of Investigative Dermatology. - 1958. - № 30. - P.159–163.
109. Kemal, M. Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [Текст] / M.Kemal, S.Amar // Journal of Cell and Molecular Biology. - 2006. - № 5. - P.71-79.
110. Kooyenga, D. Antioxidants modulate the course of carotid atherosclerosis: a four-year report [Текст] / D.Kooyenga, T.Watkins, M.Geller, M.Bierenbaum // Micronutrients and health: molecular biological mechanisms. - 2001. - P.366-375.

111. Kritchevsky, D. Red palm oil in experimental atherosclerosis [Текст] / D.Kritchevsky, Sh.A.Tepper, S.Czarnecki, K.Sundram // *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* - 2002. - № 11. - P.433–437.
112. Lagarda, M.J. Analysis of phytosterols in foods [Текст] / M.J.Lagarda, G.García-Llatas, R.Farré // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* - 2006. - № 41. - P.1486–1496.
113. Leon-Camacho, M. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile [Текст] / M.Leon-Camacho, D.Garcia-Gonzalez, R.Aparicio // *Eur. Food Res. Technol.* - 2001. - № 213. - P. 349-355.
114. Li, T. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification [Текст] / T.Li, T.Beveridge, J.Drover // *Food Chemistry.* - 2007. - № 101 (4). - P.1633-1639.
115. Luk, S. Gamma-tocotrienol as an effective agent in targeting prostate cancer stem cell-like population [Текст] / S.Luk, W.Yap, Y.Chiu, D.Lee, S.Ma, T.Lee, M.-T.Ling // *Int. J. Cancer.* - 2011. - Vol. 128. - № 9. - P.2182–2191.
116. Mäeorg, E. Some important aspects of sterol analysis of vegetable oils [Текст] / E.Mäeorg, P.Lääniste, J.Jõudu, U.Mäeorg // *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* - 2007. - № 56(2). - P.59–66.
117. Magnúsdóttir, A. Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs [Текст] / A.Magnúsdóttir, M.Másson, T.Loftsson // *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* - 2002. - № 44. - P.213-218.
118. Murad, S. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid [Текст] / S.Murad, D.Grove, K.A.Lindberg, G.Reynolds, A.Sivarajah, S.R.Pinnell // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1981. - Vol. 78. - № 5. - P.2879-2882.
119. Naveen, K. Dimeric Surfactants: Promising Ingredients of Cosmetics and Toiletries [Текст] / K.Naveen, T.Rashmi // *Cosmetics.* - 2014. - № 1. - P.3-13.
120. Oliveira, M.L.M. Topical Anti-inflammatory Potential of Pumpkin (*Cucurbita Pepo* L.) Seed Oil on Acute and Chronic Skin Inflammation in Mice [Текст] / M.L.M.Oliveira, D.C.S.Nunes-Pinheiro, B.M.O.Bezerra, L.O.Leite, A.R.Tome, V.C.C.Girao // *Acta Scientiae Veterinariae.* - 2013. - № 41. - P.1168.
121. Ostlund, R. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans [Текст] / R.Ostlund, S.Racette, A.Okeke, W.Stenson // *Am. J. Clin. Nutr.* - 2002. - № 75. - P.1000–1004.

122. Parrya, J. Characterization of Cold-Pressed Onion, Parsley, Cardamom, Mullein, Roasted Pumpkin, and Milk Thistle Seed Oils [Текст] / J.Parrya, Z.Haob, M.Luthera, L.Sua, K.Zhoua, Y.Liangli (Lucy) // JAOCs. - 2006. - Vol. 83. - № 10. - P.847-854.
123. Pedrelli, V. Clinical evaluation of photoprotective effect by a topical antioxidants combination (tocopherols and tocotrienols) [Текст] / V.Pedrelli, M.Lauriola, P.Pigatto // J. Europ. Academy Dermatology and Venereology. - 2012. - Vol. 26. - № 11. - P.1449–1453.
124. Qureshi, A. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans [Текст] / A.Qureshi, S.Sami, W.Salser, F.Khan // Atherosclerosis. - 2002. - Vol. 161. - № 1. - P.199–207.
125. Qureshi, A. Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans [Текст] / A.Qureshi, S.Sami, W.Salser, F.Khan // J Nutr Biochem. - 2001. - Vol. 12. - № 6. - P.318–329.
126. Rasool, A. Arterial compliance and vitamin E blood levels with a self emulsifying preparation of tocotrienol rich vitamin E [Текст] / A.Rasool, A.Rahman, K.Yuen, A.Wong // Arch. Pharm. Res. - 2008. - Vol. 31. - № 9. - P.1212-1217.
127. Rex, A. Tocotrienols Regulate Cholesterol Production Mammalian Cells by Post-transcriptional Suppression of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase [Текст] / A.Rex, C.Bradley, W.Ronald et al. // J. Biol. Chem. - 1993. - № 268. - P.11230-11238.
128. Rink, C. Tocotrienol vitamin E protects against preclinical canine ischemic stroke by inducing arteriogenesis [Текст] / C.Rink, G.Christoforidis, S.Khanna et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. - 2011. - Vol. 31. - № 11. - P.2218-2230.
129. Safety Assessment of Phytosterols as Used in Cosmetics [Текст] / Washington DC. - 2013. - Suite 1200.
130. Schoenheimer, R. New contributions in sterol metabolism [Текст] / R.Schoenheimer // Science. - 1931. - № 74. - P.579–584.
131. Sen, C. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols [Текст] / C.Sen, S.Khanna, S.Roy // Life Sci. - 2006. - Vol. 78. - № 18. - P.2088-2098.

132. Serbinova, E. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol [Текст] / E.Serbinova, D.Han, L.Packer // *Free Radic Biol Med.* - 1991. - Vol. 10. - № 5. - P.263-275.
133. Shantanu, K. Anti-inflammatory effect of petroleum ether extract of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb seed kernel in rats using carrageenan-induced paw edema [Текст] / K.Shantanu, G.Gunratna, Ch.Nakul // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* - 2010. - № 2(1). - P.750-752.
134. Soupas, L. Oxidative stability of phytosterols in food models and foods [Текст] / Dissertation. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. - Helsinki. - 2006.
135. Tahan, G. Vitamin E has a dual effect of antiinflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats [Текст] / G.Tahan, E.Aytac, H.Aytekın, F.Gunduz, G.Dogusoy, S.Aydin, H.Uzun // *Canadian J. Surgery.* - 2011. - Vol. 54. - № 5. - P.333–338.
136. Thiele, J. Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology [Текст] / J.Thiele, S.Ekanayake-Mudiyanselage // *Molecular Aspects of Medicine.* - 2007. - № 28. - C.646–667.
137. Tomeo, A. Antioxidant effects of tocotrienols in patients with hyperlipidemia and carotid stenosis [Текст] / A.Tomeo, M. Geller, T.R. Watkins et al. // *Lipids.* - 1995. - Vol. 30. - № 12. - P.1179-1183.
138. Venu, S. Oxidation Reactions of Thymol: A Pulse Radiolysis and Theoretical Study [Текст] / S.Venu, D.B.Naik, S.K.Sarkar, U.K.Aravind, A.Nijamudheen, C.T.Aravindakumar // *J. Phys. Chem. A.* - 2013. - № 117 (2). - P.291–299.
139. Violi, F. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis [Текст] / F.Violi, R.Cangemi // *NEJM.* - 2010. - Vol. 363. - № 12. - P.1185–1186.
140. Weng-Yew, W. Suppression of tumor growth by palm tocotrienols via the attenuation of angiogenesis [Текст] / W.Weng-Yew, K.Selvaduray, C.Ming, K.Nesaretnam // *Nutr. and cancer.* - 2009. - Vol. 61. - № 3. - P.367–373.
141. Zadernowski, R. Tocopherols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berry oil [Текст] / R.Zadernowski, M.Naczka, R.Amarowicz // *Journal of the American Oil Chemists' Society.* - 2003. - Vol.80. - № 1. - P.55-58.

142. Zaiden, N. Gamma-, delta- tocotrienols reduce hepatic triglyceride synthesis and VLDL secretion [Текст] / N.Zaiden, W.Yap, S.Ong, C.Xu // J. Atherosclerosis Thrombosis. - 2010. - № 4911. - P.1019–1032.

143. Zeb, A. Carotenoids Contents from Various Sources and Their Potential [Текст] / A.Zeb, S.Mehmood // J. Nutr. - 2004. - № 3. - P.199-204.

144. Zielińska, A. Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry [Текст] / A.Zielińska, I.Nowak // Chemik. - 2014. - № 68(2). - P.103–110.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Проект фармакопейной статьи на фитопрепарат бетулина и тимола в масле семян тыквы «Бетупам»

БЕТУПАМ

фитопрепарат

Состав (масс.%)

Бетулин	- 2.1
(ТУ 26 3142-003-04740886-2005)	
Тимол	- 6.4
(ФС.2.1.0040.15)	
Масло семян тыквы	- до 100.0
(ФС 42-8110-06)	

Нормы качества фитопрепарата бетулина и тимола в масле семян тыквы

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Мелкодисперсная суспензия темно-зеленого цвета с характерным запахом тимола
Подлинность	1. Газовая хроматография 2. ИК-	1. Времена удерживания пиков метиловых эфиров жирных кислот (олеиновая, линолевая, линоленовая), полученных после метилирования фитопрепарата, должны соответствовать временам удерживания пиков соответствующих метиловых эфиров стандартной смеси. 2. Реперные полосы на ИК-спектре

	<p>спектроскопия</p> <p>3. ВЭЖХ</p> <p>4. УФ-спектроскопия</p> <p>5. УФ-спектроскопия</p>	<p>фитопрепарата должны соответствовать полосам на ИК-спектре стандартной смеси бетулин:тимол, взятых в мольном соотношении 1:1.</p> <p>3. Времена удерживания пиков биологически активных компонентов фитопрепарата (α-, γ-токоферолы, β-ситостерол, бетулин), полученные после соответствующей пробоподготовки при указанных условиях, должны соответствовать временам удерживания пиков стандартных растворов.</p> <p>УФ-спектр гексанового раствора фитопрепарата должен иметь 2 максимума поглощения при длинах волн 424 и 434 нм.</p> <p>УФ-спектр спиртового раствора фитопрепарата должен иметь максимум поглощения при длине волны 277 нм.</p>
Масса содержащегося	НД	От 9.5 до 10,5 г
Количественное определение:		
каротиноиды	Спектрофотометрия	от 0.035 до 0.058 мг (на 100 г фитопрепарата).
α -токоферол	ВЭЖХ	от 5.63 до 9.38 мг (на 100 г фитопрепарата)
γ - токоферолы	ВЭЖХ	от 4.33 до 7.22 мг (на 100 г фитопрепарата)
β -ситостерол	ВЭЖХ	от 112.5 до 187.5 мг (на 100 г)

бетулин	ВЭЖХ	фитопрепарата) от 1.9 до 2.1 г (на 100 г фитопрепарата)
тимол	Спектрофотометрия	6.0 – 6.8 г (на 100 г фитопрепарата)
Микробиологическая чистота	ГФ XII, изд. №1, с. 160	Категория 2
Упаковка	НД	По 10 г в стеклянных флаконах.
Маркировка	НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	НД	В прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.
Срок годности	2 года	

Описание.

Мелкодисперсная масляная суспензия темно-зеленого цвета с характерным запахом тимола

Подлинность.

1. В колбу помещают навеску фитопрепарата массой 0,1 г и добавляют 2 мл гексана, 0,1 мл раствора метилата натрия в метаноле в концентрации 2 моль/дм³. Выдерживают раствор в течение 15 мин, затем в колбу добавляют 2 мл 2% раствора серной кислоты в метаноле и выдерживают еще 15 мин. После охлаждения гексановый экстракт, полученный на делительной воронке, сушат фильтрованием через слой безводного сульфата натрия. Анализируемую смесь с помощью инжектора вводят в хроматограф. Анализ проводится на хроматографе GCMS Shimadzu QP-2010 Plus с колонкой Restek Rt®-2560.

Анализ проводится при следующих параметрах: в качестве газа-носителя используется гелий (расход 40 см³ /мин); температурный режим: температура T₁ колонки 100⁰С (выдержка 1 мин), T₂ от 100 до 180⁰С, скорость 20 град/мин (20 мин), T₃ от 180 до 190⁰С, T₄ от 190 до 240⁰С, скорость 2 град/мин (5,0 мин), T₃ от 210 до 280⁰С, скорость 2 град/мин (2,5 мин). Объем вводимой пробы составлял 1.0 мкл без деления потока.

На хроматограмме испытуемого раствора должны регистрироваться пики метиловых эфиров жирных кислот: олеиновой с временем удерживания около 21 мин, линолевой с временем удерживания около 23.5 мин, линоленовой около 25 и 26 мин (в зависимости от присутствующих изомеров).

2. Реперные полосы ИК-спектра фитопрепарата должны соответствовать положению полос для комплекса включения бетулина и тимола в мольном соотношении 1:1.

3. Времена удерживания пиков на хроматограммах после пробоподготовки (см. Количественное определение п.2, начиная со слов «Около 2.0 г (точная навеска) фитопрепарата...») должны соответствовать временам удерживания пиков растворов стандартов – α -токоферола, γ -токоферола, β -ситостерола и бетулина (при условиях, указанных для каждого конкретного вещества в разделе «Количественное определение»).

4. 2.0 г фитопрепарата помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют 30 мл гексана, растворяют. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Спектр поглощения раствора в ультрафиолетовой области должен иметь 2 максимума поглощения при длинах волн 424 и 434 нм.

5. К 0.5 г фитопрепарата дважды экстрагируют спиртом этиловым 96% порциями по 20 мл, спиртовой экстракт помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят растворителем до метки. Спектр поглощения в ультрафиолетовой области должен иметь максимум поглощения при длине волны 277 нм.

Масса содержимого.

Средняя масса содержимого должна быть от 9,5 до 10,5 г

Определение проводят на трёх упаковках. Взвешивают флакон с содержимым, затем извлекают из флакона содержимое, промывают гексаном, высушивают и вновь взвешивают. По разности находят массу содержимого упаковки.

Количественное определение.

1. Около 1,0 фитопрепарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 10 мл гексана, перемешивают до растворения и доводят объем

раствора тем же растворителем до метки. Пропускают полученный раствор через колонку, заполненную оксидом магния (диаметр колонки 1.5 см, высота колонки 5.0 см), промывают колонку двумя порциями гексана по 25 мл. Объединенные фракции переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят тем же растворителем до метки.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 424 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют гексан.

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

$$m, \text{ мг\% }_{12} = \frac{(A_{\text{набл.}} - b) \cdot V (\text{мл})}{E_{1\text{см}}^{1\%}} \cdot C^{\circ} (\text{мг} / \text{мл})$$

где $A_{\text{набл.}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора МСТ или препарата 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° – концентрация равнялась 10 мг/мл, что соответствует концентрации 1% раствора.

Содержание суммы каротиноидов в фитопрепарате в пересчете на β -каротин должно быть не менее 0.035 мг%.

2. Около 2.0 г (точная навеска) фитопрепарата помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют 0.5 г тимола, 0.2 г аскорбиновой кислоты, при перемешивании добавляют 50 мл спирта этилового 96%; после растворения к смеси добавляют 30 мл 60 масс.% водного раствора КОН, затем образец нагревают с обратным холодильником при 70°C в течение 30 мин, периодически перемешивая. По истечении указанного времени смесь охлаждают при комнатной температуре, количественно переносят в делительную воронку, а затем к ней добавляют 100 мл воды очищенной (при этом смесь гомогенизируется). Экстракцию полученного раствора проводят двумя порциями гексана по 100 мл, на каждом этапе смесь взбалтывают в течение не менее 1 минуты. Гексановые фракции объединяют и обрабатывают 1% раствором аскорбиновой кислоты (100

мл). После этого экстракт промывают водой порциями по 100 мл до отсутствия щелочной реакции промывных вод. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 8 г натрия сульфата безводного, в колбу для отгона. Фильтр промывают дважды гексаном порциями по 10 мл, сливая в ту же колбу. Гексан выпаривают в токе азота до остаточного объема 15 мл, затем это количество пропускают через колонку, заполненную магнезия оксидом для хроматографии, диаметром 1.5 см, высотой 5 см. Колонку промывают двумя порциями гексана по 25 мл и полученную объединенную гексановую фракцию отгоняют в токе азота досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл элюента (метанол/ацетонитрил/дихлорметан 50/44/6). Пробу фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 $\mu\text{м}$.

а) 20 $\mu\text{л}$ полученного испытуемого раствора вводят в жидкостной хроматограф с помощью инжектора с дозирующей петлей. Хроматографирование проводят на приборе Shimadzu с диодно-матричным детектором на колонке Supelco C¹⁸25см \times 4.6 мм с размером частиц 5 $\mu\text{м}$. Элюент: метанол/ацетонитрил/дихлорметан 50:44:6 (v/v/v). Температура термостата 30°C. Длина волны, при которой регистрируется хроматограмма 284 нм. Скорость потока 1 мл/мин.

Параллельно хроматографируют по 20 $\mu\text{л}$ стандартных образцов α -токоферола и γ -токоферола.

Содержание α -токоферола в мг% рассчитывают с учетом калибровочного графика.

Содержание α -токоферола в фитопрепарате должно быть не менее 5.63 мг%

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Содержание γ -токоферола в мг% рассчитывают с учетом калибровочного графика.

Содержание γ -токоферола в фитопрепарате должно быть не менее 4.33 мг%

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление растворов стандартных образцов α - и γ -токоферолов. Около 0,05 г (точная навеска) стандартных образцов α - и γ -токоферолов помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляют по 50 мл смеси метанол:ацетонитрил:дихлорометан (50:44:6), растворяют при перемешивании и доводят тем же растворителем до меток. Отбирают по 5 мл полученных растворов и переносят в мерные колбы вместимостью 50 мл, доводят растворителем до метки. От полученных растворов отбирают пробы для ввода в хроматограф. Растворы используют свежеприготовленными.

2. Проверка пригодности хроматографической системы.

- относительные стандартные отклонения площадей пиков α - и γ -токоферолов на хроматограммах растворов стандартных образцов α - и γ -токоферолов должны быть не более 3%;

- коэффициенты корреляции градуировочных графиков для α - и γ -токоферолов должны быть не менее 0.95;

- факторы асимметрии пиков α - и γ -токоферолов должны быть не более 2.0;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная

по пикам α - и γ -токоферолов должна быть не менее 10000 теоретических тарелок.

б) 20 мкл полученного испытуемого раствора вводят в жидкостной хроматограф с помощью инжектора с дозирующей петлей. Хроматографирование проводят на приборе Shimadzu с диодно-матричным детектором на колонке Supelco C¹⁸ 25см x 4.6 мм с размером частиц 5 μ м. Элюент: спирт этиловый 96%/ацетонитрил 15:85 (v/v). Температура термостата 40°C. Длина волны, при которой регистрируется хроматограмма 210 нм. Скорость потока 1 мл/мин.

Параллельно хроматографируют 20 μ л стандартного образца β -ситостерола.

Содержание β -ситостерола в мг% рассчитывают с учетом калибровочного графика.

Содержание β -ситостерола в фитопрепарате должно быть не менее 112.5 мг%.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление раствора стандартного образца β -ситостерола. Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца β -ситостерола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси спирт этиловый 96%:ацетонитрил (15:85), растворяют при перемешивании и доводят тем же растворителем до метки. Отбирают 10 мл полученного раствора и переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят растворителем до метки. От полученного раствора отбирают пробу для ввода в хроматограф. Раствор используют свежеприготовленным.

2. Проверка пригодности хроматографической системы.

- относительное стандартное отклонение площади пика β -ситостерола на хроматограмме раствора стандартного образца β -ситостерола должно быть не более 3%;

- коэффициент корреляции градуировочного графика для β -ситостерола должен быть не менее 0,95;

- факторы асимметрии пиков α - и γ -токоферолов должны быть не более 2,0;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам α - и γ -токоферолов должна быть не менее 10000 теоретических тарелок.

в) 20 мкл полученного испытуемого раствора вводят в жидкостной хроматограф с помощью инжектора с дозирующей петлей. Хроматографирование проводят на приборе Shimadzu с диодно-матричным детектором на колонке Supelco C¹⁸ 25см^x 4.6 мм с размером частиц 5 μ м. Элюент: ацетонитрил/вода 90:10 (v/v). Температура термостата 40°C. Длина волны, при которой регистрируется хроматограмма 206 нм. Скорость потока 1 мл/мин.

Параллельно хроматографируют 20 μ л стандартного образца бетулина.

Содержание бетулина в мг% рассчитывают с учетом калибровочного графика.

Содержание бетулина в фитопрепарате должно быть не менее 2.13г/100г.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление раствора стандартного образца бетулина.

Около 0,01 г (точная навеска) стандартного

образца бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси ацетонитрил:вода (90:10), растворяют при перемешивании и доводят тем же растворителем до метки. От полученного раствора отбирают пробу для ввода в хроматограф. Раствор используют свежеприготовленным.

2. Проверка пригодности хроматографической системы.

- относительное стандартное отклонение площади пика бетулина на хроматограмме раствора стандартного образца бетулина должно быть не более 3%;

- коэффициент корреляции градуировочного графика для бетулина должен быть не менее 0,95.

3. К 0.5 г фитопрепарата добавляют 2 мл насыщенного раствора NaBH_4 в 0.01M NaOH , затем раствор дважды экстрагируют спиртом этиловым 96% порциями по 20 мл, спиртовой экстракт помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят растворителем до метки.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 96%.

Содержание тимола в фитопрепарате должно быть не менее 6.0 г/100 г фитопрепарата.

Микробиологическая чистота.

Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС 42-0067-07 (категория 2).

Упаковка. По 10 г в стеклянные флаконы темного стекла с навинчивающейся крышкой из полиэтилена. Каждый флакон вместе с инструкцией по применению помещают в пачку.

Вторичная и транспортная тара в соответствии с РД 9301-006-05749470-93.

Маркировка.

На тубе указывают:

- название препарата;
- состав и лекарственную форму;
- способ применения;
- срок годности;
- название фирмы-производителя;
- номер серии;
- срок годности;
- условия отпуска из аптек;
- условия хранения;
- предупредительные надписи.

На пачке указывают:

- торговое название препарата;
- МНН;
- состав и лекарственную форму;
- массу препарата;
- способ применения;
- регистрационный номер;
- название фирмы-производителя, её адрес и логотип фирмы;
- номер серии и дату производства;
- срок годности;
- условия отпуска из аптек;
- условия хранения;

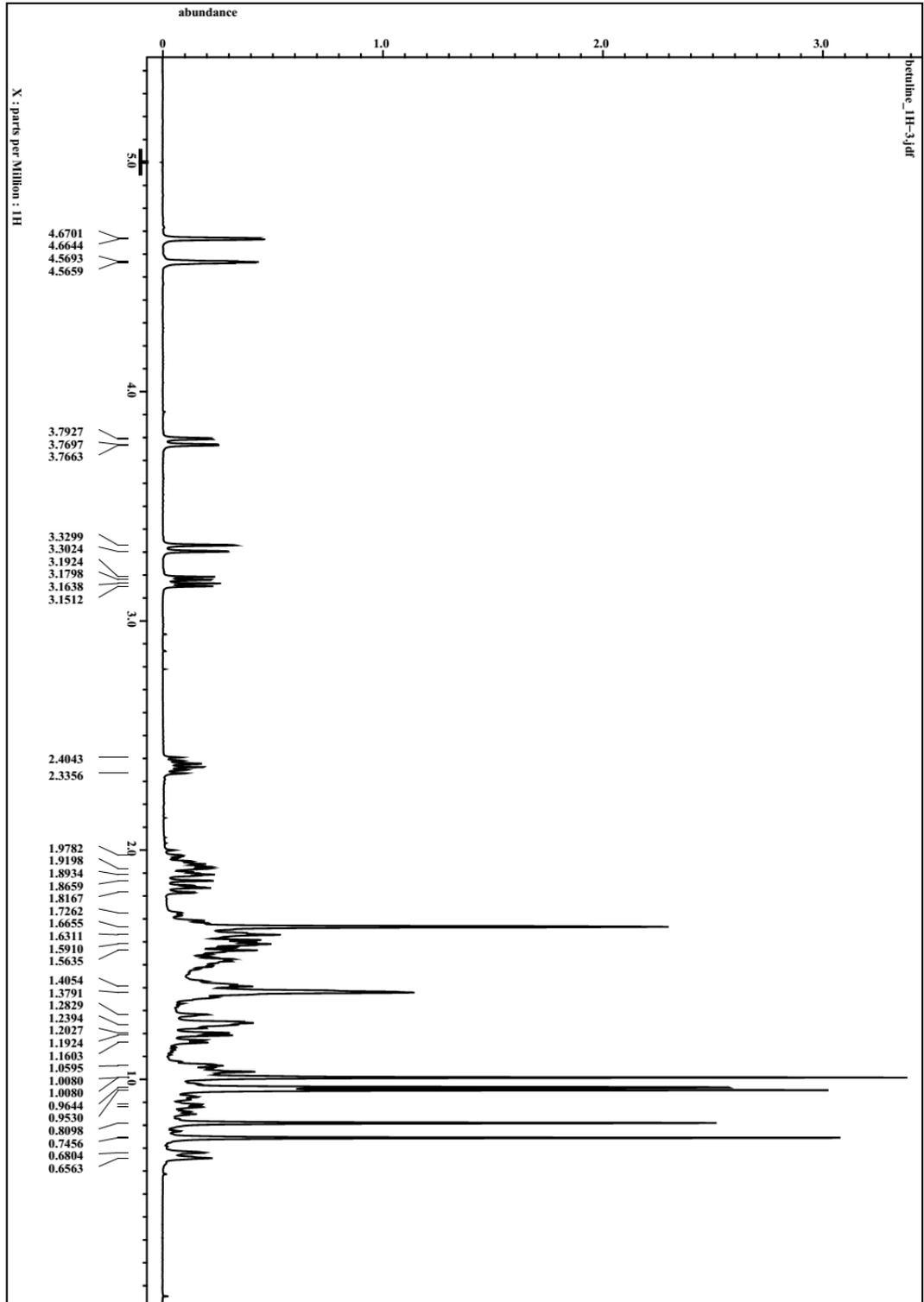
- предупредительные надписи;
- штрих-код.

Транспортирование. В соответствии с РД 9301-006-05749470-93

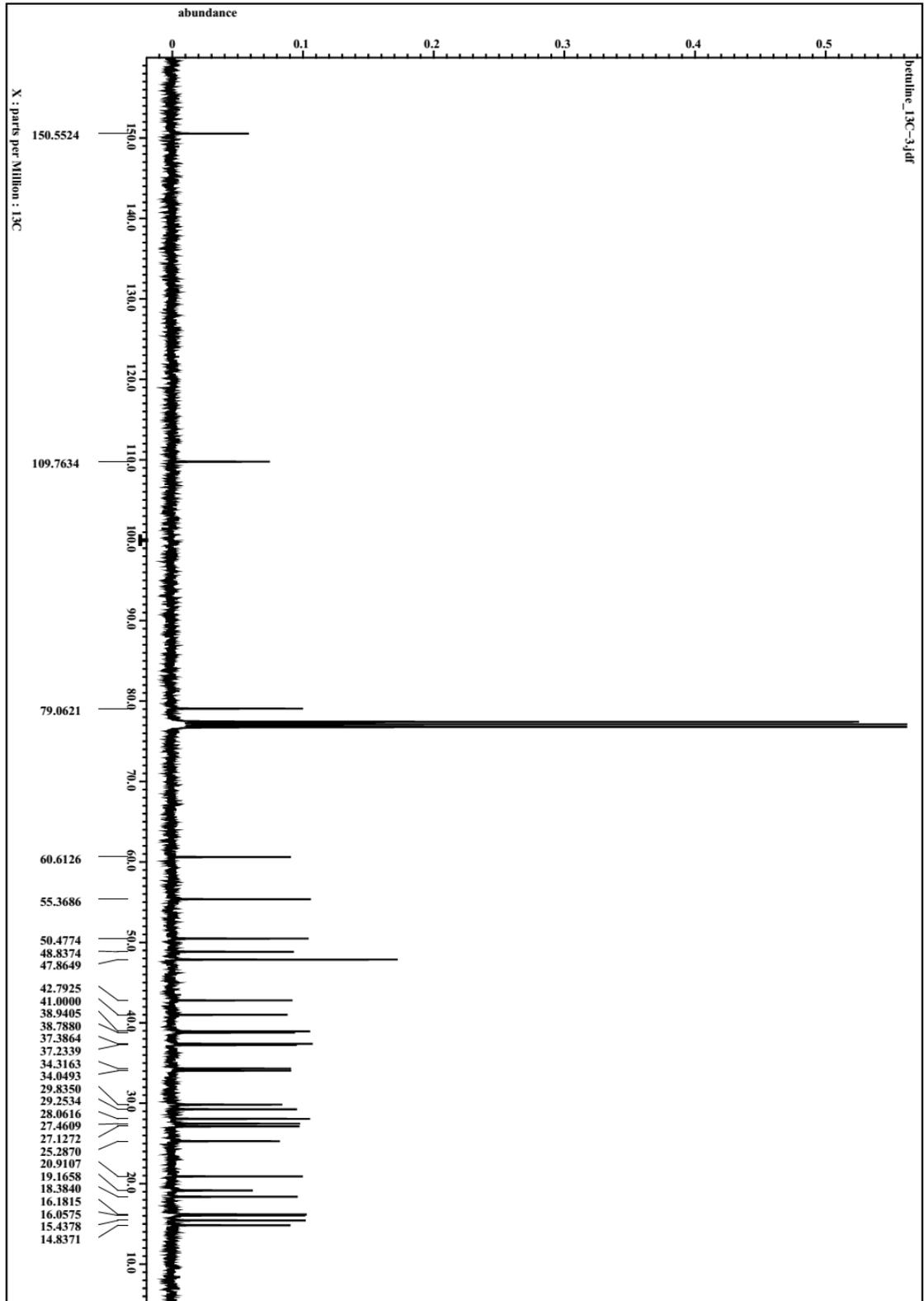
Хранение. В прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10⁰С.

Срок годности. 2 года.

Приложение 2.

 ^1H – ЯМР спектр бетулина

Приложение 3.

 ^{13}C – ЯМР спектр бетулина

Приложение 4.

Выделение и идентификация бетулина

Бетулин получали из бересты березы повислой (бородавчатой) – *Betula Pendula Roth*, которая является отходом производства фанерных фабрик.

200 г абсолютно сухой измельченной бересты нагревали до температуры кипения (~55 °С) с 2 л метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ) и выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Затем смесь фильтровали и экстрагировали МТБЭ (3 × 50 мл), после чего экстракт концентрировали отгонкой МТБЭ на вакуумном испарителе. К полученному остатку добавляли 400 мл 1 %-ного раствора NaOH и нагревали. К щелочному раствору без охлаждения добавляли 600 мл воды и нагревали 1 ч до выпадения осадка. Водный слой сливали, а твердый влажный осадок сушили на воздухе. Получали 48.0 г бетулина – сырца (выход 24 % от массы абсолютно сухой бересты). Затем осуществляли двойную перекристаллизацию из изопропанола. Полученный бетулин был 99.5 %-ной чистоты и имел вид белых игольчатых кристаллов. **T. пл.** 260 – 261 °С, **R_f** 0.17.

Физико-химические характеристики бетулина:

ИК – спектр, ν , см⁻¹, (KBr): 3363 ($\nu_{\text{O-H}}$), 3070 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2941, 2868 ($\nu_{\text{C-H}_{\text{as,s}}}$), 1643 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1028 ($\nu_{\text{CH}_2\text{OH}}$), 881 ($\delta_{\text{C=CH}_2}$).

Масс – спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 442(16) [M]⁺, 411(32), 381(15), 234(34), 207(63), 189(100), 175(43), 147(44), 121(74), 107(81).

Спектр ЯМР ¹³C, (CDCl₃, δ , м.д.):

C1	38.9	C2	27.5	C3	79.1	C4	38.9	C5	55.8	C6	18.4
C7	34.5	C8	40.4	C9	50.7	C10	37.8	C11	20.3	C12	25.7
C13	37.6	C14	42.6	C15	27.0	C16	28.9	C17	47.7	C18	48.1
C19	48.3	C20	150.4	C21	29.2	C22	33.7	C23	28.0	C24	15.6
C25	15.8	C26	16.1	C27	14.4	C28	60.6	C29	109.4	C30	19.2

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.):

0.76 с (3H, 24-CH₃), 0.82 с (3H, 25-CH₃), 0.96 с (3H, 23-CH₃), 0.98 с (3H, 26-CH₃), 1.00 с (3H, 27-CH₃), 1.02 – 1.95 (комплекс, CH, CH₂), 1.67 с (3H, 30-CH₃), 2.48 с (1H, 19-H) 3.18 дд (1H, *J* 5.3 Гц, 3-H), 3.33 д (1H, *J* 10.8 Гц, 28-H); 3.79 д (1H, *J* 10.8 Гц, 28-H); 4.58 с (1H, 29-H); 4.70 с (1H, 29-H).

Приложение 5.

Результаты испытаний при проведении определения срока годности фитопрепарата

Таблица 1.

Результаты количественного определения каротиноидов в препарате в процессе «ускоренного старения»

№ экспериментальной серии фитопрепарата	Количество каротиноидов (мкг%) после указанных промежутков времени при заданной температуре									
	1 сут (36 ⁰ C)	1 сут. (41 ⁰ C)	45.5 сут (36 ⁰ C)	29 сут. (41 ⁰ C)	91 сут (36 ⁰ C)	58 сут. (41 ⁰ C)	136.5 сут (36 ⁰ C)	87 сут. (41 ⁰ C)	182 сут (36 ⁰ C)	116 сут. (41 ⁰ C)
1	42.1	42.1	42.0	42.2	42.0	41.8	42.0	42.2	42.0	42.0
	42.1	42.1	42.3	42.0	41.9	42.0	42.2	42.1	42.1	42.0
	42.1	42.1	42.4	42.0	41.8	41.8	42.0	42.0	42.0	42.1
2	51.3	51.3	51.0	51.4	51.2	51.3	51.3	51.0	51.0	51.2
	51.3	51.3	51.2	51.0	51.0	51.1	51.3	51.0	51.2	51.0
	51.3	51.3	51.2	51.0	51.3	51.3	51.3	51.0	51.2	51.3
3	47.7	47.7	47.9	47.8	47.6	47.5	47.7	47.7	47.5	47.7
	47.7	47.7	47.7	47.8	47.7	47.7	47.5	47.8	47.7	47.7
	47.7	47.7	47.8	47.5	47.6	47.6	47.7	47.8	47.7	47.6

Таблица 2.

Результаты количественного определения токолов в препарате в процессе «ускоренного старения»

№ экспериментальной серии фитопрепарата	Количество суммы токолов (мг%) после указанных промежутков времени при заданной температуре									
	1 сут (36 ⁰ C)	1 сут. (41 ⁰ C)	45.5 сут (36 ⁰ C)	29 сут. (41 ⁰ C)	91 сут (36 ⁰ C)	58 сут. (41 ⁰ C)	136.5 сут (36 ⁰ C)	87 сут. (41 ⁰ C)	182 сут (36 ⁰ C)	116 сут. (41 ⁰ C)
1	12.3	12.3	12.2	12.3	12.3	12.1	12.1	12.3	12.2	12.1
	12.3	12.3	12.1	12.3	12.2	12.1	12.2	12.3	12.3	12.3
	12.3	12.3	12.2	12.2	12.1	12.1	12.2	12.3	12.2	12.3
2	14.1	14.1	14.3	14.2	14.2	14.1	14.1	14.1	14.2	14.2
	14.1	14.1	14.1	14.0	13.9	14.0	14.3	14.0	14.1	14.1
	14.1	14.1	14.0	14.3	14.3	14.2	14.2	14.1	14.1	14.1
3	15.0	15.0	14.8	14.8	15.2	15.0	15.1	15.0	14.9	15.0
	15.0	15.0	14.9	15.2	15.2	14.9	15.0	14.9	15.0	15.0
	15.0	15.0	15.3	15.2	15.0	15.0	14.8	15.0	15.2	15.0

Таблица 3.

Результаты количественного определения β -ситостерола в препарате в процессе «ускоренного старения»

№ экспериментальной серии фитопрепарата	Количество β -ситостерола (мг%) после указанных промежутков времени при заданной температуре									
	1 сут (36°C)	1 сут. (41°C)	45.5 сут (36°C)	29 сут. (41°C)	91 сут (36°C)	58 сут. (41°C)	136.5 сут (36°C)	87 сут. (41°C)	182 сут (36°C)	116 сут. (41°C)
1	120	120	118	121	120	120	119	119	120	121
	120	120	121	121	119	118	119	121	120	120
	120	120	119	118	121	122	121	120	120	119
2	151	151	150	150	152	151	152	150	151	150
	151	151	149	150	151	149	151	151	150	151
	151	151	153	152	152	151	150	148	149	150
3	137	137	135	135	138	135	137	137	136	137
	137	137	135	137	136	136	135	137	135	137
	137	137	135	136	137	135	137	135	137	136

Таблица 4.

Результаты количественного определения бетулина в препарате в процессе «ускоренного старения»

№ экспериментальной серии фитопрепарата	Количество бетулина (мг%) после указанных промежутков времени при заданной температуре									
	1 сут (36°C)	1 сут. (41°C)	45.5 сут (36°C)	29 сут. (41°C)	91 сут (36°C)	58 сут. (41°C)	136.5 сут (36°C)	87 сут. (41°C)	182 сут (36°C)	116 сут. (41°C)
1	1.97	1.95	1.96	1.20	1.96	1.97	1.96	1.97	1.97	1.97
	1.97	1.98	1.98	1.96	1.97	1.97	1.96	1.98	1.98	1.97
	1.97	1.97	1.97	1.96	1.95	1.95	1.96	1.97	1.96	1.97
2	2.03	2.04	2.03	2.01	2.01	2.02	2.02	2.03	2.03	2.02
	2.03	2.01	2.01	2.01	2.03	2.02	2.03	2.03	2.02	2.03
	2.03	2.03	2.04	2.01	2.05	2.04	2.05	2.03	2.04	2.03
3	1.95	1.95	1.97	1.95	1.95	1.96	1.97	1.96	1.95	1.95
	1.95	1.97	1.96	1.96	1.96	1.95	1.95	1.97	1.94	1.96
	1.95	1.97	1.94	1.93	1.96	1.95	1.96	1.95	1.95	1.95