

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**ЛИПИН ДАНИИЛ ЕВГЕНЬЕВИЧ**  
**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЯГКИХ**  
**ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, СОДЕРЖАЩИХ ФИТОЭКДИСТЕРОИДЫ**  
**SERRATULA CORONATA L.**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических наук

Молохова Е. И.

Научный консультант:  
доктор биологических наук

Володин В. В.

Пермь – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ	Стр.
Список основных сокращений.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1. Растительные источники выделения экидистероидов.....	13
1.2. Фитоэкидистероиды: химический состав, биологическая активность .....	20
1.3. Технологические аспекты получения фитопрепаратов в виде мягких лекарственных форм регенерирующего и противовоспалительного действия.....	32
Выводы по главе 1.....	40
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Объект исследования.....	42
2.2. Вспомогательные вещества .....	44
2.3. Приборы и оборудование.....	47
2.4. Методы исследования .....	48
2.4.1. Определение стабильности мягких лекарственных форм серпистена .....	48
2.4.1.1. Определение коллоидной стабильности лекарственных форм серпистена....	48
2.4.1.2. Определение термической стабильности лекарственных форм серпистена... 48	
2.4.1.3. Определение водородного показателя лекарственных форм серпистена .....	48
2.4.2. Качественное и количественное определение серпистена в лекарственных формах .....	48
2.4.3. Биофармацевтические исследования лекарственных форм серпистена	49
2.4.4. Определение структурно-механических свойств лекарственных форм серпистена.....	50
2.4.5. Определение осмотической активности мягких лекарственных форм серпистена.....	51
2.4.6. Определение кислотного числа.....	51
2.4.7. Определение индекса окисления лецитина и липосом.....	52

2.4.8. Метод получения липосом с серпистеном.....	52
2.4.9. Методы анализа липосомальных дисперсий .....	53
2.4.10. Определение остаточных растворителей в липосомальной суспензии.....	55
2.4.11. Определение степени включения серпистена в липосомы .....	56
2.4.12. Изучение ядерного магнитного резонанса лецитина и тонкой липидной пленки с серпистеном .....	57
2.5. Биологические методы с использованием животных.....	57
2.5.1. Биологические модели .....	58
2.5.2. Оценка регенерирующей активности исследуемых лекарственных форм серпистена на модели линейных асептических ран кожи .....	58
2.5.3. Изучение регенерирующей активности исследуемых лекарственных форм серпистена на модели ожоговых ран кожи.....	59
2.6. Математическое планирование эксперимента .....	60
2.7. Статистическая обработка результатов.....	61
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗИ С СЕРПИСТЕНОМ.....	62
3.1. Подбор способа введения субстанции и типа мазевой основы в мягкой лекарственной форме с серпистеном .....	62
3.2. Исследование реологических свойств мазей серпистена.....	64
3.3. Изучение высвобождения серпистена из мазевых композиций.....	66
3.4. Оптимизация состава мази серпистена .....	68
3.5. Разработка технологической схемы получения мази серпистена .....	77
3.6. Качественное и количественное определение серпистена в субстанции и в лекарственной форме .....	81
3.7. Стабильность мази серпистена .....	90
Выводы по главе 3.....	93
ГЛАВА 4. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ СЕРПИСТЕНА .....	94

4.1.	Оценка качества исходного сырья лецитина-стандарта по показателю «степень окисления» .....	95
4.2.	Выбор состава «пустых» липосом .....	96
4.3.	Ультразвуковая обработка «пустых» липосомальных композиций .....	101
4.4.	Выбор состава больших мультиламеллярных липосом с серпистеном .....	103
4.5.	Определение концентрации остаточных растворителей .....	104
4.6.	Изучение параметров гомогенизации липосом серпистена .....	105
4.7.	Исследование степени включения серпистена в липосомы и его «утечки» при хранении .....	107
4.8.	Изучение стабильности липосом в составе геля .....	110
4.9.	Оценка применимости фотометрического показателя дисперсности в технологическом контроле липосомальных суспензий .....	111
4.10.	Изучение структуры липосом с серпистеном .....	115
4.11.	Выбор состава липосомального геля .....	116
4.12.	Разработка технологической схемы получения липосомального геля серпистена .....	120
4.13.	Стабильность геля серпистена .....	124
	Выводы по главе 4 .....	125
	<b>ГЛАВА 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С СЕРПИСТЕНОМ .....</b>	<b>126</b>
5.1.	Исследование раздражающего действия серпистена при нанесении на кожу кроликам .....	126
5.2.	Оценка местно-раздражающего действия мягких лекарственных форм с серпистеном .....	126
5.3.	Изучение репаративной активности лекарственных форм с серпистеном ...	127
5.3.1.	Исследование репаративной активности лекарственных форм серпистена на модели линейной асептической раны .....	128

5.3.2. Оценка регенерирующей активности лекарственных форм серпистена на модели ожоговой раны .....	130
Выводы по главе 5.....	135
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ .....	137
БЛАГОДАРНОСТИ .....	139
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	140
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	159

### **Список основных сокращений**

- БАВ – биологически активное вещество
- БАД – биологически активная добавка
- БМЛ – большие мультиламеллярные липосомы
- ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс
- КП – контролируемые параметры
- МГД – моноглицериды дистиллированные
- МЛФ – мягкая лекарственная форма
- МОЛ – малые однослойные липосомы
- НД – нормативная документация
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПЭО – полиэтиленоксид
- ФБР – фосфатный буферный раствор
- ФПД – фотометрический показатель дисперсности
- ФС – фармакопейная статья

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Одним из интенсивно исследуемых классов биологически активных веществ (далее БАВ) являются гормоны линьки насекомых – экдистероиды – благодаря своему широкому спектру фармакологического действия, высокой активности и отсутствию токсического действия. Фитоэкдистероиды (ФЭ) представляют собой группу природных соединений, родственных по структуре и физиологическому действию гормону линьки насекомых экдизону [11, 140, 168].

Установлено, что экдистероиды обладают противовоспалительным [104, 153] и противомикробным действием [146, 148], что дает основание полагать наличие у них репаративных свойств. Известны составы мазей на основе индивидуальных фитоэкдистероидов, а также суммарных фитопрепаратов на их основе, получаемых в частности из растений родов *Silene* и *Ajuga*. Так, в 1994 году M. Detmar с соавторами опубликовал данные, доказывающие влияние фитоэкдистероидов на дифференциацию кератиноцитов человека *in vitro* [120].

В. Н. Дармограем разработаны составы мазей для применения в дерматологии и стоматологии [49, 50, 52, 53], в которых фитоэкдистероиды вводились в адсорбционные основы (смесь вазелина и ланолина в соотношении 4 : 1) в виде спиртовой настойки.

А. Меубек с соавторами, показал, что включение экдистероидов в структуру липосом приводит к усилению ранозаживляющего действия, а также к снижению частоты образования келлоидных рубцов [154]. В своей работе ученые использовали экдизон – экдистероид с наиболее низкой фармакологической активностью. Е. А. Пшунетлевой [63] предпринята попытка включить сложные эфиры 20-гидроксиэкдизона, основного экдистероида серпистена в липосомы, но оказалось, что они плохо переходят во внутреннее пространство липосом, эффективность включения составила 6%. Разработки липосом с эфирами 20-гидроксиэкдизона ведутся и за рубежом. В исследовании А. Martins представлено, что использование фосфолипида, придающего отрицательный заряд мембране липосом, и холестерина

позволяет добиться эффективности включения неполярного производного 20-гидроксиэкдизона – 20-гидроксиэкдизона 2,3;20,22-диацетонида в пределах 43-50 % [117]. Исследования последних лет показывают, что между фосфолипидом, образующим липосомы, и некоторыми БАВ растительного происхождения образуется водородная связь. В работах показано, что фитосомы обладают более высокой биологической доступностью и стабильностью, нежели липосомы [100].

В Академии наук Республики Узбекистан созданы лекарственные препараты на основе эндемика Средней Азии – *Ajuga turkestanica*, накапливающего редкие и биологически высокоактивные фитоэкдистероиды, которые обладают противодиабетической, анаболической и стресс-протективной активностью [1, 93]. Группа исследователей, которую возглавляет М. Dumas, выполнила большой объем работ по разработке косметических средств на базе сухого экстракта корней живучки туркестанской [56]. Но тот факт, что живучка туркестанская внесена в Красную книгу Республики Узбекистан и не образует продуктивных зарослей, существенно ограничивает ее использование в качестве источника фитоэкдистероидов.

В Республике Казахстан ведутся научно-исследовательские работы по созданию лекарственных форм на основе *Serratula coronata* L., данное растение введено в официальную медицину Казахстана, как лекарственное средство, обладающее адаптогенным, анаболическим, и тонизирующим действием [72, 162].

На территории РФ зарегистрированы два лекарственных препарата на основе фитоэкдистероидов – «Экдистена» таблетки 0,005 и левзеи экстракт жидкий, получаемые из корневищ *Rhaponticum carthamoides* [69].

Институтом биологии Коми научного центра Российской Академии наук ведется комплексная работа по изучению фитоэкдистероидов – природных соединений, обладающих активностью экдистероидов и содержащихся в некоторых растениях. В ходе исследований выявлено, что листья *Serratula coronata* L. накапливают 7 индивидуальных фитоэкдистероидов, основным из которых является

20-гидроксиэкдизон. Результатом многолетних исследований ученых является интродукция в Республике Коми растения *Serratula coronata* L. (серпуха венценосная), которая накапливает в условиях северных широт около 2% фитоэкдистероидов (в пересчете на сухое сырье) и выделение по запатентованной технологии фитоэкдистероидной фракции под названием серпистен, содержащей не менее 75 % 20-гидроксиэкдизона и не менее 10 % 25S-инокостерона [52]. На основе серпистена зарегистрирован ряд БАД, для которых установлено противодиабетическое, адаптогенное, гастропротекторное, термопротекторное и антигипоксическое действие [54, 55, 61, 62].

В доступных научных источниках практически отсутствует информация о технологических исследованиях и методах стандартизации мягких лекарственных форм (далее МЛФ) с экдистероидами.

Таким образом, расширение номенклатуры лекарственных препаратов, содержащих в качестве действующего вещества серпистен, делает актуальным разработку технологий и стандартизацию МЛФ на его основе, в том числе липосомальных, и оценку ранозаживляющего действия лекарственных форм серпистена на лабораторных животных.

**Цель работы.** Разработка составов, технологий и стандартизация мази и липосомального геля серпистена, обладающих регенерирующим действием.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие задачи:

1. исследовать физико-химические, реологические, технологические и биофармацевтические свойства предложенных лекарственных форм – мази и липосомального геля серпистена;
2. экспериментально обосновать составы и разработать технологии мази и липосомального геля серпистена;
3. разработать и провалидировать методику количественного определения серпистена в мази;

4. провести биологические исследования по определению специфической активности лекарственных форм серпистена для наружного применения;
5. разработать нормативную документацию и провести апробацию мягких лекарственных форм серпистена.

### **Научная новизна.**

Впервые в технологии МЛФ использована фармакологически активная субстанция серпистен, представляющая собой сумму фитоэкдистероидов, получаемую из листьев серпухи венценосной. Разработана технология мази серпистена, обладающая удовлетворительными реологическими параметрами, наилучшим профилем высвобождения и эффективностью в испытаниях *in vivo*. Установлены основные условия проведения спектрофотометрии в УФ-области для определения серпистена в составе МЛФ.

Впервые получен липосомальный гель серпистена. Установлены показатели контроля технологического процесса и качества липосомальной суспензии: однородность и средний диаметр липосом, дзета-потенциал, фотометрический показатель дисперсности (ФПД), эффективность включения серпистена в липосомы. Получены гомогенные стабильные липосомальные дисперсии с высоким включением серпистена (88 %), со средним диаметром частиц 70-90 нм, дзета-потенциал которых составлял минус 37 мВ.

При помощи ЯМР  $^{31}\text{P}$  спектроскопии доказано образование фитосом с серпистеном.

### **Практическое значение работы.**

На основании проведенных и экспериментальных исследований:

- Разработаны рациональные технологии мази дифильной природы и липосомального геля серпистена;
- Разработана и валидирована методика количественного определения серпистена в мази. Разработан проект ФСП на мазь серпистена 0,02 %;
- Предложен способ контроля технологического процесса получения липосомальных суспензий серпистена с использованием фотометрического показателя дисперсности (ФПД);

- МЛФ с серпистеном представляют интерес в качестве потенциального лекарственного средства для местного применения с регенерирующим действием;
- Результаты научной работы использованы при составлении нормативной документации и апробированы на базе ОАО «Татхимфармпрепараты» (акт внедрения от 24 марта 2015 года);
- Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России на факультете очного обучения при изучении тем «Мягкие лекарственные формы» и «Нанотехнологии в производстве лекарств».

**Апробация.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на международной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации» (г. Пермь, 2011); VII Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (г. Сыктывкар, 2011); XVI Международном съезде «Фитофарм – 2012» (г. Санкт-Петербург, 2012); Международной научно-методической конференции «Сандеровские чтения» (г. Санкт-Петербург, 2012); III Международной научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2013); финальном туре VIII Студенческого краевого конкурса научных проектов по программе «УМНИК» (г. Пермь, 2013); межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Современная фармация: образование, наука, бизнес» (г. Тюмень, 2014); научно-практической конференции памяти проф. А. В. Казьянина (г. Пермь, 2014).

**Публикации.** Основное содержание диссертации представлено в 10 публикациях, включая 3 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработка составов и технологий мази и липосомального геля серпистена;
2. Результаты контроля физико-химических, технологических и биофармацевтических свойств лекарственных форм с серпистеном;
3. Стандартизация мази серпистена и валидация методики количественного определения;
4. Оценка регенерирующего действия МЛФ с серпистеном.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 189 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), изложения собственных результатов (3-5 главы), выводов и приложения. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 42 рисунками. Библиографический указатель включает 180 источников, в том числе 98 отечественных и 82 иностранных авторов. В приложении приведены акт внедрения результатов НИР на базе ОАО «Татхимфармпрепараты» (г. Казань), лабораторный регламент и ФСП на мазь серпицена, акты внедрения в учебный процесс и результаты экспериментальных данных.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3 и 6 паспорта специальности – технология получения лекарств.

**Личный вклад автора.** Все приведенные в диссертации данные были получены лично автором на базе ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, в филиале ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России «Пермское НПО «Биомед», лаборатории биотехнологии растений ФГУН Института Биологии Коми НЦ УрО РАН, Институте экологии и генетики микроорганизмов Пермского НЦ УрО РАН.

**Связь работы с научными программами.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Пермской государственной фармацевтической академии» Минздрава России, номер государственной регистрации – 01.9.50.007417.

Диссертационная работа поддержана программой УМНИК по теме «Разработка липосомального геля, обладающего репаративной активностью» государственный контракт № 1701ГУ1/2014 от 17.03.2014.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Растительные источники выделения экистероидов

Экистероиды – гормоны стероидной структуры, регулирующие процессы линьки, метаморфоза и размножения у членистоногих [169]. Первый экистероид (экизон) был выделен А. Бутенандтом в 1954 г. из коконов тутового шелкопряда [111, 114], но его структура однозначно идентифицирована лишь в 1965 году [134]. Позже экистероиды были обнаружены также в 5-6% видах растений [112] и, как правило, их содержание оказалось гораздо выше, чем у членистоногих. Первый фитоэкистероид (Понастерон А) выделен К. Наканиси в 1966 году из растения *Rodocarpus nakaii* [69]. В то время казалось неправдоподобным родство между гормоном насекомого и растительным веществом. Но биотесты на личинках насекомых и данные рентгеноструктурного анализа подтвердили, что фитоэкистероиды имеют сходную структуру и также активны, как и природный гормон линьки [38]. К настоящему времени установлена структура свыше 150 фитоэкистероидов, выделенных из растений [88].

В ходе анализа семян 1775 видов растений Л. Дайнаном показано, что 98 видов накапливают фитоэкистероиды в количестве, достаточном для их обнаружения методом иммуноферментного анализа. Среди этих растений 39 видов (2,6 % от общего количества исследованных видов) содержат высокие концентрации фитоэкистероидов [111].

При скрининге флоры Западной Монголии на наличие экистероидов, проведенном Н. Мунхжаргалом, установлено, что из 277 видов растений, фитоэкистероиды присутствуют в 17 видах растений из семейств Asteraceae, Caryophyllaceae и Chenopodiaceae, что составило 5,7 %. Автором проведен анализ данных семейств на встречаемость исходных соединений. Установлено, что фитоэкистероиды встречаются у 6 % видов семейства Asteraceae, у 40 % видов семейства Caryophyllaceae и 25 % - у Chenopodiaceae. В семействе Caryophyllaceae экистероиды выявлены в 10 видах, относящихся к родам *Melandrium*, *Elisanthe* и

*Silene*. В семействе *Asteraceae* они обнаружены только у представителей рода *Serratula* (4 вида). В семействе *Chenopodiaceae* обнаружены искомые соединения в 3 видах из родов *Chenopodium* и *Axyris* [42].

Наибольшее число видов растений, накапливающих экидистероиды, обнаружено в семействах *Amaranthaceae* (23 вида в 9 родах), *Asteraceae* (23 вида, в основном из родов *Serratula* и *Rhaponticum*), *Caryophyllaceae* (свыше 116 видов, в основном принадлежащие родам *Silene* и *Lychnis*), *Chenopodiaceae* (13 видов из 8 родов), *Lamiaceae* (14 видов, из которых 13 видов принадлежит роду *Ajuga*), *Ranunculaceae* (30 видов) [88, 89].

На территории России фитоэкидистероиды накапливаются в концентрациях, перспективных для препаративного выделения в растениях рода *Rhaponticum* (*R. carthamoides*, *R. serratuloides*), *Silene* (*S. tatarica*, *S. repens*), *Chenopodium* (*Ch. bonus-henricus*), *Serratula* (*S. coronata*) и *Ajuga* (*A. reptans*, *A. turkestanica*) [15].

Одним из наиболее изученных сырьевых источников фитоэкидистероидов является род *Rhaponticum*, который представляет собой многолетние травянистые растения семейства *Asteraceae*. *Rhaponticum carthamoides* (левзея сафлоровидная) является эндемичным видом Южной Сибири. Её основной ареал приходится на климатическую зону субальпийских и альпийских лугов Алтая и Саян. В качестве лекарственного растительного сырья используют корневище с корнями [9]. Растение официально включено в Государственную Фармакопею РФ [85]. На основе данного сырья, разработано и зарегистрировано 2 лекарственных препарата: «левзеи экстракт жидкий» [84] и «таблетки Экидистена 0,005», в котором действующее вещество представляет собой очищенный экстракт корневищ левзеи сафлоровидной [86].

Основными биологически активными веществами левзеи сафлоровидной являются фитоэкидистероиды, выделенные из растения в 1974 г [14]. К настоящему времени в корневищах с корнями *Rhaponticum carthamoides* идентифицирована структура 14 фитоэкидистероидов [7, 76, 116].

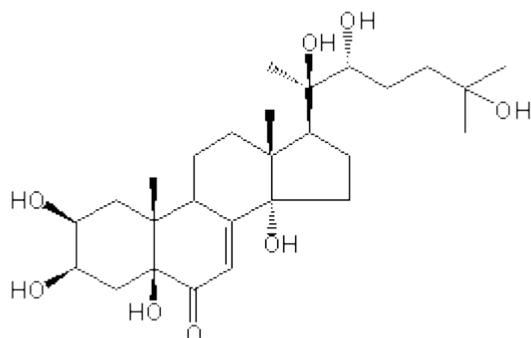
Необходимость поиска новых растительных источников фитоэкдистероидов связана с тем, что их содержание в корневищах с корнями левзеи сафлоровидной относительно невелико (порядка 0,2 %), а использование подземных органов растений в качестве сырья не является оптимальным с точки зрения истощения запасов этого вида в природных популяциях и необходимости возобновления плантаций каждые три года. К тому же технология переработки подземных органов более трудоемка, чем переработка надземных частей растений. Перечисленные выше проблемы делают актуальным поиск других растений с высоким содержанием действующих веществ [83].

Высокое содержание фитоэкдистероидов отмечено для другого представителя рода *Rhaponticum* – *Rhaponticum serratuloides* (большеголовник серпуховидный). Данное растение произрастает на границе Румынии с Молдовой; в Средней Азии, Краснодарском крае, южной части Западной Сибири и на Северном Кавказе. По сравнению с левзеей сафлоровидной большоголовник серпуховидный характеризуется более высоким содержанием экдистероидов (до 1,4 %), в то же время вид крайне редок и практически не изучен [31, 96].

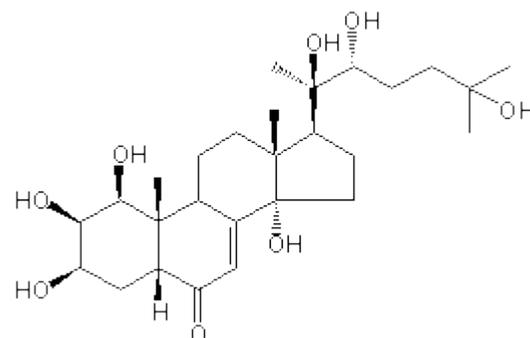
Сверхпродуценты фитоэкдистероидов более широко распространены в семействе *Caryophyllaceae* (Гвоздичные). В этом семействе фитоэкдистероиды накапливаются в роде *Silene*, данный род насчитывает более 400 видов в северных и умеренных областях Северного полушария, в основном в Средиземноморье. На территории России и сопредельных стран род представлен примерно 150 видами, из них в Западной Сибири встречается 22 вида и 15 – на Алтае [88].

Из данного рода наиболее перспективным видом является *Silene tatarica* (смолевка татарская), которая произрастает на Северо-Востоке европейской части России, а также на всей территории Европы [22]. В растении обнаружено 3 фитоэкдистероида, содержание которых в надземной части в фазе бутонизации – начала цветения достигает 2% и более [96].

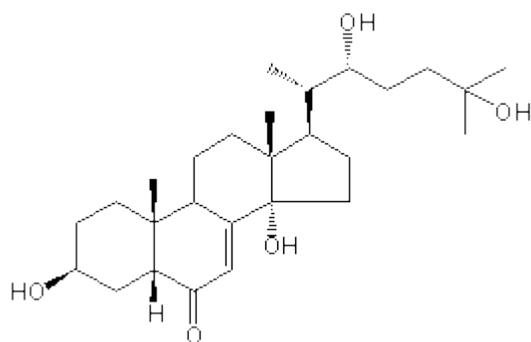
Вторым представителем данного семейства с высоким содержанием фитостероидов является *Silene геренс* Patr. (смолевка ползучая), которая представлена во флоре Европы, Малой и Средней Азии, Кавказа, Гималаев, Монголии, Японии, Северной Америки и Северной Африки. Растение содержит до 1% фитостероидов [96], которые были впервые выделены из растения в 1988 году [64]. К настоящему моменту идентифицировано 5 фитостероидов [28, 146, 148], основные представители показаны на рис. 1.



Полиподин В, М. м. 496.



Интегристерон А, М. м. 496.

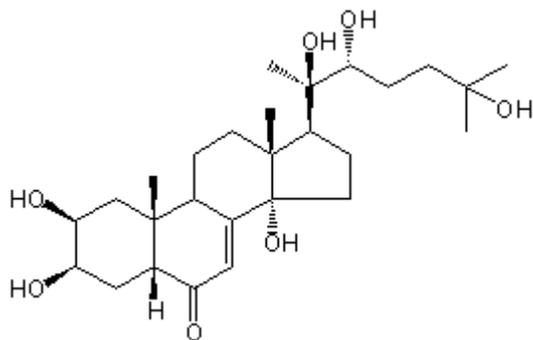


2-дезоксизекдизон, М. м. 448.

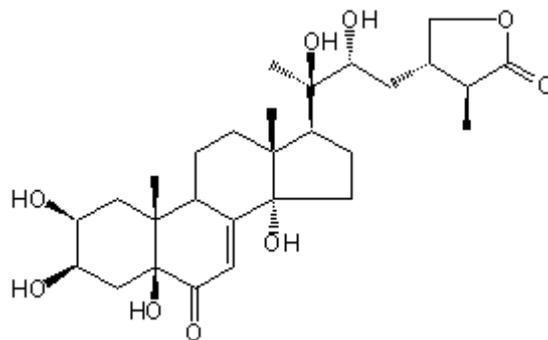
Рис. 1. Основные фитостероиды рода *Silene*.

Основными БАВ фитостероиды являются в семействе *Lamiaceae*. Одним из основных родов семейства, накапливающие данный класс соединений, является род *Ajuga*. Это многолетние или однолетние травы с супротивными листьями. В мире насчитывается 40–45 видов, почти по всему земному шару. На территории России произрастает 14 видов. Интерес у исследователей вызывает *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая), т. к. она содержит редко встречающиеся фитостероиды. Ареал живучки ползучей охватывает практически всю Европу, включая

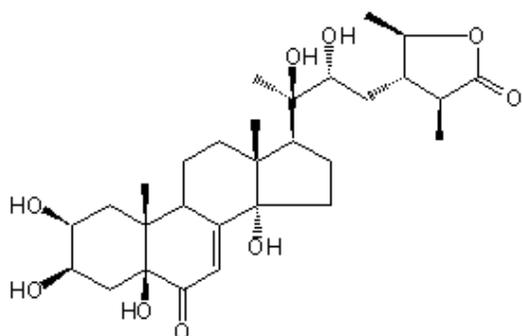
европейскую часть России и Кавказ. *Ajuga reptans* также встречается в Иране и Турции, а из стран Северной Африки – в Алжире и Тунисе. Состав фитостероидов живучки ползучей крайне разнообразный, растение продуцирует фитостероиды, относящиеся к трем различным типам углеродного скелета:  $C_{27}$ ,  $C_{28}$ , и  $C_{29}$  (рис. 2).



20-гидроксиэкдизон, М. м. 480, 27 атомов углерода.



29-норсенгостерон, М. м. 522, 28 атомов углерода.



Сенгостерон, М. м. 536, 29 атомов углерода.

Рис. 2. Представители основных классов фитостероидов *Ajuga reptans* L.

С момента открытия данных соединений в 1985 г. учеными удалось идентифицировать свыше 14 индивидуальных фитостероидов [88, 94, 99].

В качестве источника фитостероидов широко используют живучку туркестанскую (*Ajuga turkestanica*), которая является эндемиком Западного Тянь-Шаня и Гиссаро-Алая и произрастает на территории Узбекистана и Таджикистана. К настоящему моменту выделено и идентифицировано 14 фитостероидов [177]. Основным фитостероидом данного растения является выделенный в 1975 г.

туркестерон, который по фармакологической активности намного превышает экдистерон [47, 82].

Институтом химии растительных веществ им. Юнусова Академии наук Республики Узбекистан разработаны и зарегистрированы: лекарственный препарат для перорального применения таблетки «Аюстан 0,1», содержащий фитоэкдистероиды и иридоиды Живучки туркестанской в виде очищенного экстракта, и БАД «Эксумид» [77, 180]. Этим же Институтом разработана технология экдистероидсодержащей субстанции «Жистенин» – исходного компонента для косметических средств фирмы Christian Dior (Франция).

Использование вышеуказанных растений в качестве продуцентов фитоэкдистероидов в промышленных масштабах ограничивается двумя основными причинами. Основным негативным фактором является то, что два вида растений (*R. serratuloides* и *A. turkestanica*) включены в Красные книги России и Узбекистана. В дикорастущем виде большинство растений произрастают рассеянно или одиночно в труднодоступных местах. При этом их интродукция, в абсолютном большинстве случаев, представляет серьезные трудности. Другая причина заключается в относительно низком накоплении фитоэкдистероидов растениями [24].

С целью расширения сырьевой базы источников фитоэкдистероидов с 90-х гг. активно изучаются культуры растительных клеток и тканей. Впервые накопление фитоэкдистероидов в культуре клеток показано в гаметофитах *Pteridium aquilinum*, культивируемых в жидкой среде [149]. К настоящему моменту получены культуры тканей у родов *Ajuga*, *Polypodium*, *Pteridium*, *Rhaponticum* и *Serratula* [24, 65].

Сравнительным изучением суспензионных и каллусных культур спор папоротника *Pteridium aquilinum* показано, что в суспензионных культурах концентрация фитоэкдистероидов выше их содержания в интактном растении в 20 раз, тогда как каллусные культуры характеризуются более низкой способностью синтезировать фитоэкдистероиды [145, 167].

Аналогичные закономерности выявлены для каллусных и суспензионных культур *Ajuga turkestanika* [95]. Культивируемые таллусы и проталлусы папоротника *Polipodium vulgare* продуцировали фитоэкидстероиды в количестве 0,8% от сухой массы, что в 2 раза превышает их концентрацию в интактном растении [115].

Получение вторичных метаболитов (в частности фитоэкидстероидов) в условиях *in vitro* является перспективным направлением биотехнологии, т. к. позволяет контролировать условия и среду выращивания культуры тканей, свести к минимуму влияние окружающей среды на накопление действующих веществ. Несмотря на это, ученые сталкиваются с большими проблемами использования данной технологии в культивировании растительных источников фитоэкидстероидов, таких как нестабильность культуры тканей при длительной культивации и низкие выходы целевых продуктов [175].

Преодолеть эти трудности ученые смогли благодаря культуре трансформированных корней (бородчатых корней) [88, 131, 175], образующихся в результате инокулирования стерильных проростков штаммами *Agrobacterium rhizogenes*.

По данной технологии получены культуры бородчатых корней растения *Serratula tinctoria*, в которых содержание фитоэкидстероидов было стабильным и поддерживалось на уровне 0,2% от сухой биомассы [135]. Культуры трансформированных корней получены и для ряда других растений – продуцентов фитоэкидстероидов: *Ajuga reptans*, *Achyranthes fauriei*, *Pfaffia iresinoides* и *Vitex strickeri* [88].

В большинстве своем, содержание фитоэкидстероидов в культуре клеток и тканей намного ниже их количества в материнском растении. Например, в каллусных культурах рапontiкума сафлоровидного количество фитоэкидстероидов не превышало 0,001% в пересчёте на сухое вещество, что в 200 раз меньше, чем интактном растении [65, 88]. При использовании технологии трансформированных

корней рапонткума сафлоровидного фитоэктистероиды накапливаются в концентрации до 0,03%, что в 6 раз ниже содержания в подземных органах [60].

В середине 90-х гг. были получены каллусные культуры серпухи венценосной [174]. В. В. Володиным установлено, что культура тканей серпухи венценосной продуцирует фитоэктистероиды в количестве от 0,03% до 0,34%, что в 7 раз меньше чем в интактном растении [88].

К настоящему моменту дикорастущие сырьевые источники и введение в культуру ткани фитоэктистероидов не могут удовлетворить потребности фармацевтической промышленности. Логическим и рациональным выходом из данной проблемы является интродукция части перспективных видов растений. Перспективным источником получения эктистероидов, в частности 20-гидроксиэктизона, учитывая ресурсосберегающий фактор, является трава серпухи венценосной [152].

Учеными лаборатории биохимии и биотехнологии растений Института биологии Коми научного центра Российской Академии наук успешно интродуцирована серпуха венценосная, которая накапливает до 2 % фитоэктистероидов в пересчете на сухую массу – столько же, сколько она содержит в местах своего изначального произрастания [88].

## 1.2. Фитоэктистероиды: химический состав, биологическая активность

Современными исследователями выделяются следующие общие элементы в структуре фитоэктистероидов (рис. 3):

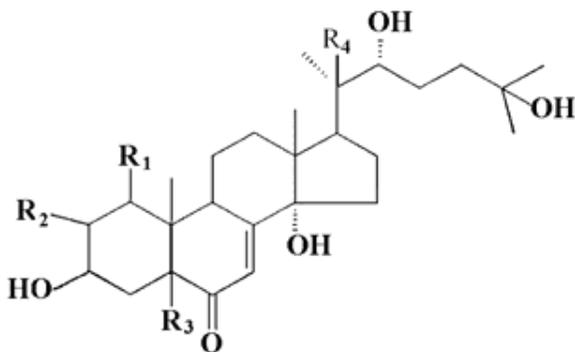


Рис. 3. Общая структура фитоэктистероидов.

1. общее число атомов углерода может варьировать от 27 до 30 у соединений с полной боковой цепью или от 19 до 24 – у соединений, имеющих разрыв боковой цепи;
2. наличие нескольких гидроксильных групп в стероидном ядре в положениях C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>19</sub>;
3. наличие нескольких гидроксильных групп у соединений с боковой цепью;
4. конъюгирование в положениях C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> или C<sub>25</sub> с неорганическими кислотами (серная кислота), органическими кислотами (уксусная, пальмитиновая, бензойная кислоты), сахарами (галактоза, глюкоза, ксилоза);
5. наличие нескольких кратных связей [88].

Наличие 5-6 гидроксильных групп в структуре фитостероидов обуславливает их относительно высокую реакционную способность, при этом активность гидроксогрупп увеличивается в следующем порядке: C<sub>14</sub> << C<sub>20</sub> < C<sub>25</sub> < C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>22</sub>. Экдистероиды с триэтиламинсульфатом образуют смесь моно- и дисульфатов. В случае необходимости получения индивидуальных эфиров серной кислоты используют ацетатную либо изопропилиденовую защиты [59].

Во многих природных объектах экдистероиды встречаются в виде конъюгатов с высшими жирными кислотами. Чаще всего конъюгирование происходит по гидроксильной группе у атома углерода в 22 положении, что говорит о ее наибольшей реакционной способности среди остальных гидроксильных групп. В свою очередь, гидроксильная группа у атома углерода во 2 положении находится в незатрудненной экваториальной конформации и легко вступает в химические реакции [59, 92]. По этим гидроксилам экдистероиды могут соединяться с молекулами фосфолипида, образуя фитосомы.

Институтом нефтехимии и катализа Российской Академии наук (г. Уфа) ведется последовательная работа по химической трансформации фитостероидов. Учеными установлены условия гидридного восстановления

фитоэкдистероидов. В частности, при использовании в качестве восстановителя алюмогидрата лития в среде тетрагидрофурана образуются 7,8-дигидроаналоги фитоэкдистероидов, а при замене реактива на борат натрия происходит восстановление кетогруппы до эпимерных  $6\alpha$ - и  $6\beta$ -гидроксогрупп [81]. Теми же учеными выявлена необычная трансформация фитоэкдистероидов в присутствии некоторых восстановителей. Так, при взаимодействии 20-гидроксиэкдизона с литием в присутствии жидкого аммиака вместо ожидаемого восстановления кетогруппы образуются  $14\alpha$ -гидропероксиды и  $9\alpha,14\alpha$ -оксапроизводные [44].

В первых научных исследованиях показана способность экдистероидов стимулировать биосинтез белка у млекопитающих и птиц. На моделях принудительного бега и плавания показано, что пероральный или внутривнутрибрюшинный прием фитоэкдистероидов приводит к повышению работоспособности, увеличению мышечной массы и силы, увеличению содержания белка в мышцах [69, 130]. В настоящее время считают, что активность экдистероидов следует рассматривать как неспецифическое фармакологическое действие, а не гормональные эффекты [79].

Установлено также, что экдистероиды обладают гипохолестеринемическим эффектом, который лучше всего объясняется превращением холестерина в желчные кислоты [112]. Это свойство экдистероидов напоминает эффект оксистероинов (близкого по структуре класса природных соединений) [173]. Введение в рацион фитоэкдистероидов приводит к стимуляции отделения желчи у лабораторных животных. При этом улучшается химический состав желчи, который проявляется в повышении уровня желчных кислот и билирубина и снижении холестерина [105].

Введение экдистероидов до проведения аллоксанового теста либо последующим введением глюкагона снижает уровень глюкозы в крови у крыс и мышей почти вдвое [47]. В то же время, фитоэкдистероиды не влияют на уровень глюкозы у здоровых животных. При приеме 20-гидроксиэкдизона у мышей стимулируется включение глюкозы в гликоген и белок [118], а также более полная

утилизация глюкозы в тканях [107]. При комбинированной терапии аллоксаного диабета манилином и экстрактом *Ajuga turkestanica* установлено, что у животных повышается содержание альвеолярных макрофагов, количество сегментоядерных нейтрофилов при этом снижается. Также выявлено, что с восстановлением фагоцитарной активности макрофагов, повышается их способность к лизису бактерий [151].

А. Г. Куркумовым показано положительное действие фитостероидов на модели индуцированной аритмии у крыс [36]. В более поздних работах доказано антиаритмическое действие экстракта левзеи сафлоровидной на модели адреналиновой аритмии у животных [39].

Фитостероиды проявляют антиоксидантные и антирадикальные свойства [97, 159], данный эффект схож с действием витамина D<sub>3</sub> [121]. Показано, что 20-гидроксистерон ингибирует липидное окисление с такой же эффективностью, как и широко применяющийся антиоксидант тетраэтилендиамин [138].

Имеются данные о способности фитостероидов замедлять рост саркомы и других видов рака [148]. Л. Н. Зибаревой установлено, что стероидсодержащий экстракт растения *Silene viridiflora* оказывал противораковое действие *in vivo* [25]. Фитостероиды, выделенные из растений рода *Ajuga*, проявили противораковую активность на модели двухступенчатого канцерогенеза [106]. Однако ранее другими учеными сообщалось, что 20-гидроксистерон неэффективен в замедлении роста опухоли мышей, наоборот, он способствует росту карциномы молочной железы [141]. Н. З. Мамадалиевой показано, что ацилированные фитостероиды оказывают умеренную активность в отношении некоторых линий раковых клеток [159]. Ввиду того, что учеными исследуются различные модели опухолей и фитостероиды, по их результатам сложно сделать какой-то однозначный вывод о влиянии фитостероидов на канцерогенез. Благодаря структурному сходству стероидов половым гормонам млекопитающих, они могут связываться с

рецепторами половых гормонов и стимулировать рост гормонозависимых опухолей [148].

Н. З. Мамадалиевой отмечается, что экстракты растений рода смолевка, содержащие фитоэкдистероиды, обладают противомикробной активностью по отношению к патогенным микроорганизмам [147]. В то же время в более ранних исследованиях другими учеными опубликованы сведения об отсутствии противомикробного действия 20-гидроксиэкдизона по отношению к стандартным микробным культурам [3, 102]. Введение ацетильной группы в молекулу 20-гидроксиэкдизона значительно увеличивает антибактериальную активность фитоэкдистероида по отношению к патогенным штаммам микроорганизмов [3].

В настоящее время при изготовлении лекарственных препаратов и БАД используются около 10 видов растений [17, 49, 50, 139]. К настоящему моменту производится свыше 150 лекарственных средств и БАД, содержащих фитоэкдистероиды, для орального применения. Условно их можно разделить на две большие группы: препараты на основе растительных экстрактов и препараты на основе индивидуальных фитоэкдистероидов, а также их смесей. На основе растений рода *Pfaffia* выпускается 49 препаратов и БАД, 38 позиций на основе *Rhaponticum*, 24 – на основе *Cyanotis*, 8 – на основе *Polypodium*, по 4 позиции на основе растений рода – *Ajuga* и *Silene*. Препаратов с фитоэкдистероидами растений рода *Serratula* зарегистрировано 4 позиции, еще у 40 препаратов не указано растение – источник фитоэкдистероидов [139].

Фитоэкдистероиды при местном применении оказывают благотворное влияние на кожные покровы. Так, аналоги гормона линьки насекомых при нанесении на кожу проявляют ингибирующую активность в отношении псориаза, которую можно отнести за счет усиления дифференциации кератиноцитов [139].

В основе репаративных свойств экдистероидов лежит стимуляция пролиферации клеток позвоночных, при этом увеличивается синтез белка в тканях [78], дифференциация человеческих кератиноцитов в условиях *in vitro*. Последний

эффект оценен по активности трансклутаминазы (фермента, участвующего в соединении белков через образование изопептидной связи) [120]. Все эти эффекты способствует быстрому рубцеванию ран и трофических язв.

Большая научно-исследовательская работа по разработке лекарственных форм с фитоэкдистероидами проводится в Республике Казахстан и Российской Федерации.

В Республике Казахстан серпуха венценосная является официальным растением. Карагандинским фармацевтическим заводом оформлена временная фармакопейная статья (далее ФС) на траву серпухи венценосной [17]. На основе сухого экстракта выпускается суммарный препарат таблетки «Экдифита», содержащий в качестве действующих веществ фитоэкдистероиды и флавоноиды и обладающий адаптогенным, анаболическим и тонизирующим действием [72,80].

Исследователями Института биологии Коми научного центра Российской академии наук, под руководством доктора биологических наук В. В. Володина, ведется комплексная работа по изучению серпухи венценосной.

Основными действующими веществами серпухи венценосной являются фитоэкдистероиды, обнаруженные в растении в 1981 году [43]. К настоящему моменту из серпухи венценосной выделено и идентифицировано 7 фитоэкдистероидов [88]. Их физические константы и структурные формулы приведены в табл. 1 и рис. 4.

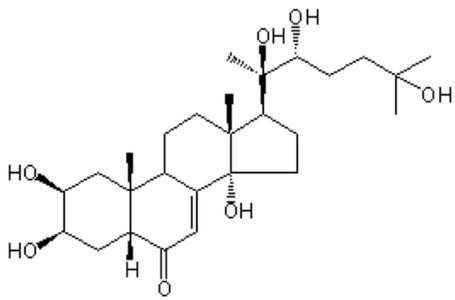
Помимо фитоэкдистероидов в листьях серпухи венценосной обнаружены флавоноиды апигенин, лютеолин и кверцетин. Флавоноиды найдены во всех частях растения. Листья серпухи венценосной также содержат гидроксикоричные кислоты (феруловая и хлорогеновая кислоты), каротиноиды, витамины К и С, аминокислоты (лизин, цистеин, аспарагиновая, глутаминовая и аминоксусная кислоты) [28, 30].

Исследователями установлено, что большинство растений, накапливающих в высоких концентрациях фитоэкдистероиды, используются традиционной медицине различных народов.

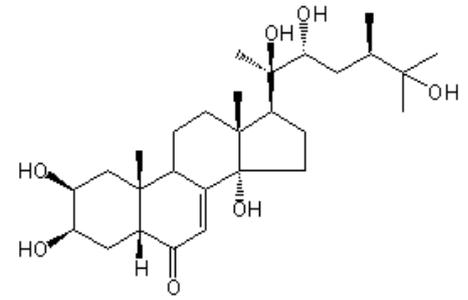
Так, в народной медицине отвары и настои травы серпухи рекомендуют применять как вяжущее, желчегонное, противовоспалительное, противолихорадочное, противорвотное и седативное средство. В народной медицине Сибири настой травы серпухи используется как внутреннее средство при желтухе и поносах, а отвар корневищ или настой травы употребляют для полоскания полости рта и глотки при ангинах, ларингитах, фарингитах, тонзиллитах. Настой травы вместе с цветочными корзинками рекомендуют при анемии, лихорадке, рвоте, желтухе, грыжах, геморрое, злокачественных опухолях. Настоем травы поят больных эпилепсией, а также назначают при неврозах, параличах, психических заболеваниях. Отвар корневищ серпухи принимают внутрь при поносах, гастралгии, гонорее. Настой травы в качестве ранозаживляющего средства используют местно в виде примочек при порезах, ссадинах, гноящихся ранах [30].

Физические константы основных фитостероидов, содержащихся в *Serratula coronata* L. [88, 133]

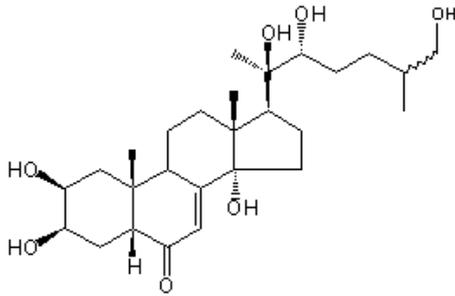
№ п/п	Название	М.м	t <sub>пл.</sub> , °С	$\nu_{\max}$ (cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\max}$ , нм	log $\epsilon$	$[\alpha]_D^{20}$
1	20- гидроксиэкдизон	480,63	241-243	3500 (ОН), 1645 (cyclohexenone)	240	4,103	+61,8
2	25S-инокостерон	480,63	254-256	3400 (ОН), 1645 (cyclohexenone)	243	4.084	+59,4
3	Аюгастерон С	480,63	197-199	3400 (ОН), 1655 (cyclohexenone)	243	4.014	+37 ( в метаноле
4	Дакрихайнанстерон	462	199-201	Нет данных	298, 235	4.152, 3.806	Нет данных
5	Макистерон А	494	263-265	3420, 1655, 1630	243	4.09	+ 60,3
6	Макистерон С	508	258-259	3400-3470 (ОН), 1643-1650 (cyclohexenone)	243- 244	4.146	Нет данных
7	Экдизон	464	237-239	3333 (ОН), 1657 (cyclohexenone)	242	4.093	+ 64,7



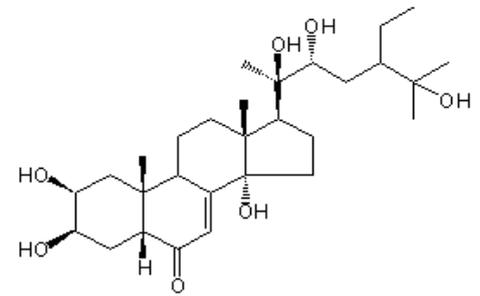
20-гидроксиэкдизон



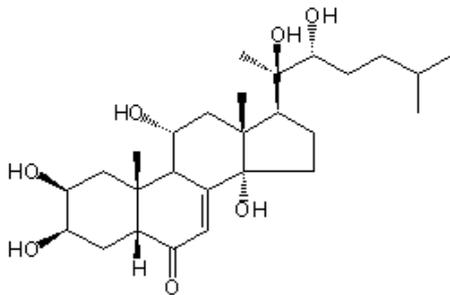
Макистерон А



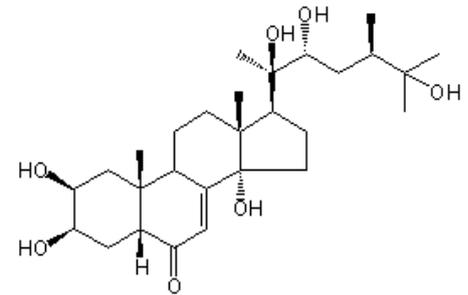
25S-инокостерон



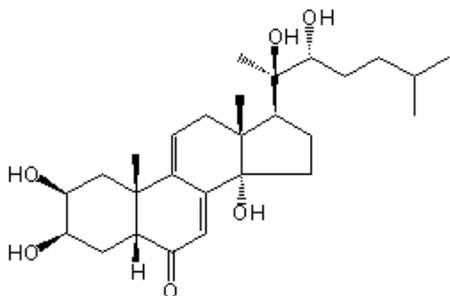
Макистерон С



Аюгастерон С



Экдизон



Дакрихайнанстерон

Рис. 4. Фитоэкдистероиды *Serratula coronata* L.

Авторами предлагается в качестве сырья использовать всю надземную часть серпухи венценосной, т.к. она накапливает до 2% фитостероидов в пересчете на сухую массу. Получаемый из серпухи серпистен представляет собой смесь фитостероидов (20-гидроксиэкизон, экизон, и другие минорные фитостероиды). 20-гидроксиэкизон является главным компонентом серпистена, и его содержание колеблется в пределах 75-80%, содержание 25S-инокостерона составляет 11-15%, экизона – 3-7% [52].

Технологический процесс получения серпистена состоит из нескольких стадий (рис. 5):

1. Измельчение. Траву серпухи венценосной измельчают на мельнице эксцельсиор до основной массы частиц размером 3–5 мм.
2. Приготовление экстрагента. Экстрагентом служит вода очищенная.
3. Экстракция. Траву серпухи загружают в экстрактор. Используют метод мацерации. Сначала сырьё послойно загружают, заливают экстрагентом и настаивают 2 часа. Затем добавляют экстрагент до соотношения сырьё: экстрагент - 1:10. Экстракцию проводят при температуре 50 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Водную вытяжку сгущают в вакуум-выпарном аппарате.
4. Первичная очистка. Водный маточник, содержащий фитостероиды, подвергают трехкратной экстракции жидкость-жидкость, используя в качестве экстрагента смесь четырёх частей этилацетата и одной части метанола. Растворитель отгоняют в вакуум-выпарном аппарате до сухого остатка.
5. Вторичная очистка. Сухой остаток переносится на колонку с оксидом алюминия. Колонку промывают хлороформом, в результате чего происходит десорбция балластных веществ. Десорбцию фитостероидов проводят смесью, состоящей из хлороформа и метанола в соотношении 1 : 3. Контроль полноты десорбции осуществляют смешиванием части элюата с петролейным эфиром. Элюат, содержащий фитостероиды, упаривают досуха в вакуум-выпарном аппарате. Сухой остаток перекристаллизовывают в смеси этилацетат-метанол в соотношении 9 : 1.

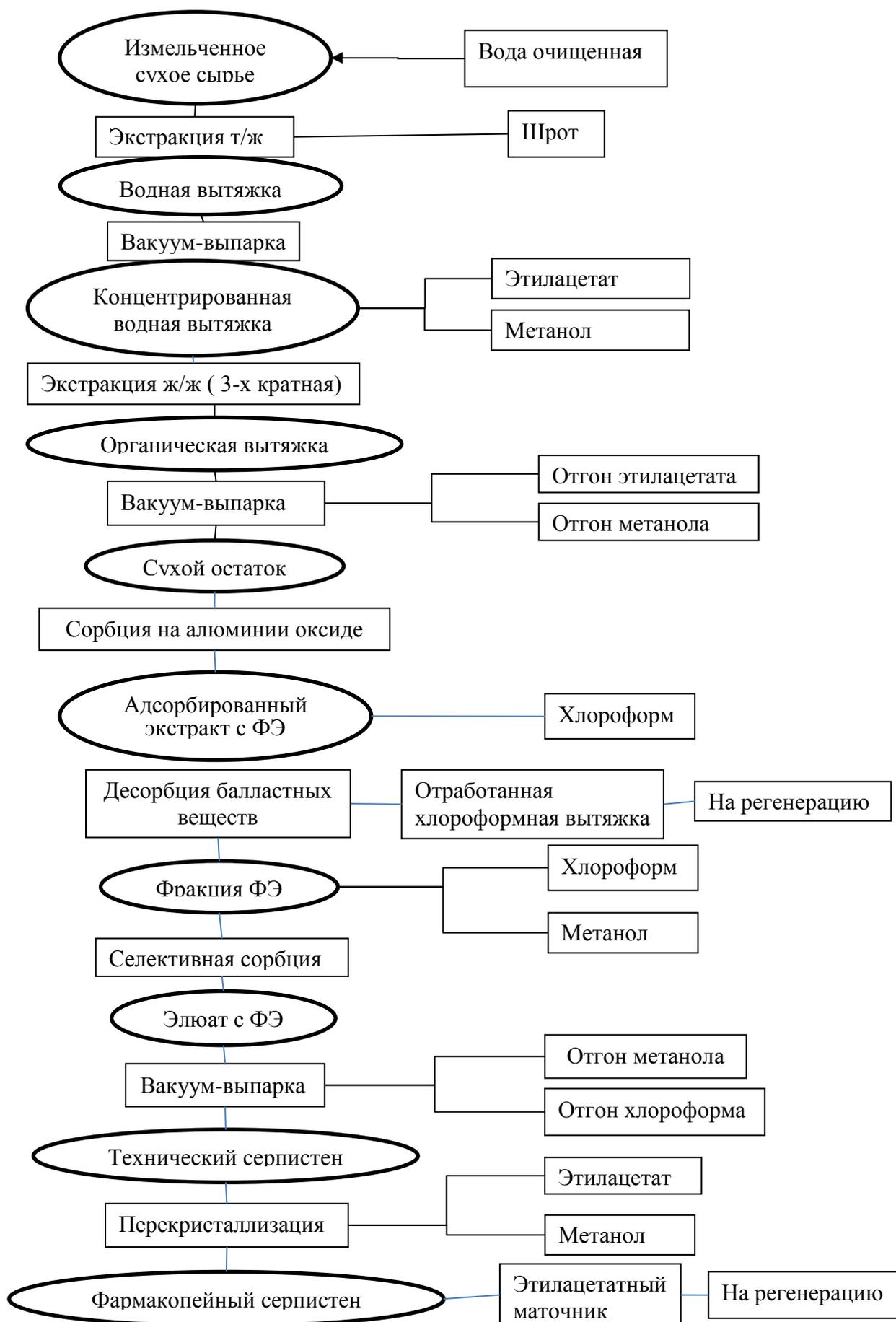


Рис. 5. Процессуальная схема получения серпистена.

Согласно литературным данным при внутривенном введении 20-гидроксиэктона мышам  $LD_{50}$  составляет 6,4 г/кг, а при пероральном применении  $LD_{50}$  равна 7,6 г/кг. Для 25S-инокостерона эти значения соответственно 7,8 и 9,0 г/кг [69]. Для серпистена исследована острая и хроническая токсичность. В результате исследования установлено, что в диапазоне доз от 5 до 3000 мг/кг субстанция не проявляет токсических эффектов. Во время эксперимента на хроническую токсичность выявлено, что внутренние органы подопытных животных не подвергаются патологическим изменениям, относительная масса печени и селезенки соответствует норме.

Субстанция серпистен обладает гематопротекторной активностью, т. к. повышает устойчивость клеточных стенок печени и эритроцитов при хроническом облучении рентгеновскими лучами [83]. При приеме внутрь усиливает физическую работоспособность спортсменов [74] и улучшает когнитивные функции у лиц, страдающих поражениями сосудов головного мозга различной степени тяжести [10]. Адаптогенное действие серпистена доказано в ходе нескольких фармакологических исследований [2, 11, 13, 15, 57]. Исследования различных моделей стресса на животных и людях показали, что серпистен активизирует механизмы синтеза защитных белков организма [12].

Итогом проделанной работы явилось разработка и государственная регистрация эктостероидсодержащей субстанции серпистен и трех капсулированных форм БАД на ее основе – «Кардистен» противоишемического и гиполипидемического, «Диастен» – противодиабетического и «Адастен» – иммуностимулирующего и адаптогенного действия.

Высокая эффективность оральных форм серпистена делает перспективным дальнейшие исследования субстанции, а также разработку МЛФ наружного применения, обладающей, в частности, регенерирующей активностью.

### **1.3. Технологические аспекты получения фитопрепаратов в виде мягких лекарственных форм регенерирующего и противовоспалительного действия**

Одним из направлений развития фармацевтической технологии является постоянное совершенствование производства МЛФ для наружного применения, номенклатура которых постоянно обновляется и совершенствуется благодаря разработке и внедрению в производство новых вспомогательных веществ синтетического и природного происхождения [23].

Благодаря масштабным биофармацевтическим исследованиям, номенклатура вспомогательных веществ, применяемых в технологии лекарственных средств, постоянно увеличивается, что позволяет применять широкий спектр их комбинаций и соотношений при разработке различных лекарственных форм [16].

Существенной проблемой в технологии МЛФ наружного применения является плохая растворимость БАВ в фармакологически индифферентных растворителях (в воде, глицерине). Поэтому их вводят в лекарственную форму в виде тонкой суспензии, при этом не всегда достигается желаемая биодоступность и, соответственно, терапевтическая эффективность. Преодолевают эту трудность подбором смеси растворителей, обладающей большей растворяющей способностью, чем индивидуальные растворители по отдельности [73].

С этой точки зрения фитостероиды выгодно отличаются от других классов БАВ растительного происхождения своей хорошей растворимостью в полярных растворителях. Растворимость 20-гидроксиэкдизона в воде очищенной составляет 4 мг/мл, однако фитостероиды могут образовывать хелатные комплексы (т. н. «комплексы включения») с некоторыми веществами, например, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстраном, в результате растворимость 20-гидроксиэкдизона повышается до 70 мг/мл. Фитостероиды лучше растворяются в спиртах, в частности в метиловом спирте (10 мг/мл и выше) [58].

Суммарные растительные препараты содержат комплекс БАВ с различной полярностью, поэтому для достижения максимальной терапевтической

эффективности применяют более сложные мазевые основы эмульсионного типа. К примеру, в мази «Дермалик» мазевая основа является эмульсией м/в и состоит из масляной фазы (воск прополисный и масло кукурузное), гидрофильной фазы (пропиленгликоль и вода очищенная) и эмульгатора № 1 [98].

Исследователями во главе с S. Pattanayak исследованы несколько композиций гидрофильного и гидрофобного характеров. В результате испытаний *in vivo* установлено, что крем, состоящий из метанольного экстракта травы *Sajanus carabaeoides* L., жировой фазы (вазелин и вазелиновое масло), гидрофильной фазы (ПЭО-6000), эмульгатора цетостеарилового спирта и консерванта метилпарабена, оказывает наиболее выраженную противоожоговую активность, по сравнению с гелевыми композициями на основе полипропиленгликоля. Авторами отмечается, что эмульгатор не только стабилизирует мазевую композицию, но и повышает биодоступность, за счет солюбилизации. Солюбилизация ПАВ дает повышенное всасывание действующего вещества за счет достижения высокой дисперсности БАВ и за счет своих свойств активаторов всасывания [125].

З. Д. Хаджиевой проведены биофармацевтические испытания мази, содержащей сухой экстракт солодки и густой экстракт «Сальвин». В результате комплексного исследования установлено, что лучше всего липофильные вещества «Сальвина» и водорастворимые соединения солодки высвобождает основа, состоящая из ПЭО-400, вазелина медицинского, парафина и смеси эмульгаторов твина-80 с цетиловым спиртом. Высокий гидрофильно-липофильный баланс обоих эмульгаторов позволяет добиться удовлетворительной стабильности и наилучшего профиля высвобождения БАВ из мазевой композиции [91].

Широкое распространение в технологии МЛФ с растительными экстрактами находит форма геля благодаря своему быстрому всасыванию [68].

Ученые под руководством О. В. Базаркиной при разработке МЛФ с сухим экстрактом арники, обладающей ранозаживляющей и противовоспалительной активностью, растворяли действующее вещество в смеси полиэтиленоксид-400

(далее ПЭО-400) -вода в соотношении 1:3 и вносили полученный раствор в основу, состоящую из геля карбопола марки 940 Р [6].

С середины 90-х годов растет число разработок на базе гелей карбополов, что обусловлено достижением высокой биодоступностью лекарственных веществ и пролонгацией их эффекта, проявлением высокой биоадгезии и микробиологической устойчивости, отсутствием раздражающего действия [70]. М. В. Слепневым показано, что, применяя цинковую пасту (цинка оксид в количестве 25 % на вазелиновой основе) и гель цинка оксида 10 % с концентрацией карбопола 0,5 %, достигается одинаковый терапевтический эффект [71]. Одним из преимуществ гелей карбопола является возможность их стерилизации [179]. Так, в работе А. Malik показано, что стерилизация геля на основе карбопола 940 при температуре 121 °С в течение 15 мин не приводит к изменению структуры [158]. Анализ литературы выявил привлекательность использования в качестве гелеобразователя карбопола 940.

Таким образом, разработка современных МЛФ наружного применения невозможна без учета физико-химических параметров вспомогательных веществ, их влияния на терапевтическую эффективность, стабильность и фармакокинетический профиль действующих веществ [16].

Разработки МЛФ с фитостероидами ведутся отечественными и зарубежными исследователями.

Исследовательской группой, возглавляемой д.фарм.н., проф. Рязанского медицинского университета им. И. П. Павлова В. Н. Дармограем, запатентована технология мазей «Виспосил», «Валеодонт» и «Висподент», применяемых при заболеваниях пародонта, и мази «Витадерм», обладающей ранозаживляющим действием (табл. 2).

Препараты фитоэкдистероидов для наружного применения [49, 50, 52, 53]

Название препарата	Сырьевой источник растительного сырья	Фармакологически активный ингредиент	Фармакологическое действие
Валеодонт	Herba Silene tataricae; Herba Viscariae vulgaris; Flores Calendulae; Fructus Schisandrae; Semen Schisandrae;	Сложная настойка на спирте 40%	анаболическое, противовоспалительное, спазмолитическое, иммуностимулирующее, обезболивающее
Висподент	Herba Silene tataricae; Herba Viscariae vulgaris; Flores Calendulae; Gemmae Populus nigrae; Herba Millefolii.	Сложная настойка на спирте 40%	репаративное, обезболивающее, противовоспалительное, иммуностимулирующее
Виспосил	Herba Silene tataricae; Herba Viscariae vulgaris; Flores Calendulae; Gemmae Populus nigrae.	Сложная настойка на спирте 40%	ранозаживляющее, обезболивающее, противовоспалительное, анаболическое
Витадерм	Herba Silene tataricae; Herba Viscariae vulgaris; др. растения родов волдырник, коронария, лихнис	Сложная настойка на спирте 40%	ранозаживляющее, обезболивающее, противовоспалительное, анаболическое

При получении одонтотропных препаратов действующие вещества (фитоэкдистероиды из смолевки татарской и обыкновенной, полифенольные соединения из цветков Ноготков лекарственных и почек Тополя обыкновенного) вводились в пропись в виде сложных настоек, полученных на 70% этаноле [49]. В качестве мазевой основы в препарате «Висподент» применяется мазь оксида цинка [53], в препаратах «Виспосил», «Валеодонт» и «Витадерм» – смесь

вазелина и ланолина в соотношении 4 : 1. Предложенные гидрофобные основы образует защитную пленку, что является преимуществом в регенерирующих мазях, но и имеет ряд недостатков, связанных с большим содержанием в составе вазелина. В частности такие мази плохо высвобождают лекарственные средства, нарушают газообмен в месте нанесения и обладают низкой осмотической и адсорбционной активностью [87].

В течение последних лет в сфере улучшения фармацевтических свойств лекарственных препаратов произошли серьезные изменения. Разработаны подходы, которые позволяют принципиально изменить свойства лекарственных средств, а именно: влиять на режим дозирования, придать им адресную доставку, усилить фармакологическое действие, снизив при этом частоту неблагоприятных побочных реакций [29, 144]. Разработчики добиваются этих свойств с помощью направленной трансдермальной доставки в необходимые ткани посредством липосом и нановезикул [29, 122]. Круг веществ, включаемых в липосомы, необычайно широк – от неорганических веществ и низкомолекулярных органических соединений, крупных белков и нуклеиновых кислот до широкого круга фармакологически активных веществ: гормонов, иммуномодуляторов, ферментов, цитостатиков, антибиотиков, противовирусных и противогрибковых препаратов, витаминов, вакцин и генетического материала [143].

Группа исследователей, возглавляемая А. Мейбеком [154] разработала липосомальную композицию с фитоэкдистероидами, обладающую ранозаживляющей активностью. Образовавшийся комплекс оказывал более выраженный ранозаживляющий эффект, чем гель с экдистероидами. Выразалось это в укорочении времени рубцевания, кроме того, в случае применения липосом, образуется меньше келоидных рубцов, чем в случае применения геля. Усиление ранозаживляющего эффекта объясняется тем, что при включении активного вещества в липосомы, они начинают играть роль депо. Это приводит к тому, что концентрация действующего вещества непосредственно в коже выше, чем в случае применения МЛФ в виде мазей и гелей [127].

Упрощенная технологическая схема получения липосом состоит из трех основных стадий. На 1-ой стадии получают большие мультиламеллярные липосомы (далее БМЛ), используя методы ручного встряхивания, выпаривания в обращенной фазе, дегидратации/регидратации, этанольной инъекции, спонтанной везикуляции липидов и замораживания-оттаивания [26].

Стадия гомогенизации проводится для получения малых однослойных липосом (далее МОЛ) из БМЛ. МОЛ обладают меньшими размерами, узким распределением размеров и большей стабильностью при хранении, чем БМЛ. МОЛ после завершения стадии гомогенизации подвергаются технологическому контролю по следующим параметрам: средний диаметр липосом, индекс полидисперсности, эффективность включения фармакологически активной субстанции в липосомы.

Полученные на 2-ой стадии МОЛ используют для получения лекарственной формы.

Анализ литературных источников показывает, что в технологии липосомальных препаратов используется комбинация получения первичной липосомальной суспензии и стадии гомогенизации. Так обращение фаз и ультразвуковая обработка применены для включения в липосомы азелаиновой кислоты [124], а для инкапсулирования метанольного экстракта *Chlorella rupeoidosa* использована комбинация методов дегидратации/регидратации и воздействие ультразвука [110]. Эти примеры указывают на то, что для получения липосомальных препаратов с заданными параметрами необходима тщательная разработка технологии, объединяющей несколько методов с учетом особенностей включаемого в липосомы вещества.

Основными параметрами, изучаемыми в процессе создания липосомальной лекарственной формы, являются метод получения БМЛ, природа фосфолипида, природа вспомогательных веществ, соотношение фосфолипид-действующее вещество, природа органического растворителя, природа водного буфера, режим гомогенизации.

При разработке липосом в качестве фосфолипидов в большинстве случаев ученые используют яичный [166] или соевый лецитин [128, 142], который обладает низкой стоимостью относительно других фосфолипидов, нейтральным зарядом молекулы и химической инертностью [87]. Применяются и производные фосфатидилхолина – основного фосфолипида лецитина – дипальмитоилфосфатидилхолин [163, 164] и др. [87, 165]. Вспомогательные вещества в состав липосом вводят с целью придания электрического заряда на мембране везикулы [171], для уплотнения стенки липосом, для того чтобы снизить «утечку» действующего из внутреннего ядра липосом, а также для замедления перекисного окисления фосфолипидов.

Уплотнители стенки липосом, к которым относятся холестерол,  $\beta$ -ситостерин, стигмастерол и эргостерол, уплотняют мембрану в фазе жидких кристаллов и делают ее рыхлой в фазе геля. При изменении структуры стенки липосом изменяется ее проницаемость для водорастворимых соединений. Уплотнители стенки липосом, не влияя на температуру фазового перехода фосфолипидов, снижают энтальпию перехода, что дополнительно повышает стабильность мембраны при изменении температур [87].

В настоящее время липосомы по наличию химической связи между фосфолипидом и действующим веществом делят на собственно липосомы (отсутствуют химические связи) и фитосомы (имеют химические связи) [137]. Способность некоторых групп веществ образовывать связи с фосфолипидом открыта в 1989 году [109]. За прошедшее время установлено, что фитосомы могут получаться в основном случае полифенольных соединений [137]: флаволигнанов расторопши пятнистой (основной компонент - силибинин) [157], гинкгозидов гинкго двулопастного [114], катехинов зеленого чая и косточек винограда, куркумина [108], кверцетина [123]. В то же время учеными показана возможность образование фитосом с панаксозидами женьшеня, которых относят к тетрациклическим сапонином с двумя или тремя гидроксильными группами алифатического ряда, с глицерритиновой кислотой – основным агликоном

солодки голой и солодки уральской, с эхинакозидами эхинацеи узколистной [103].

Наиболее изучены фитосомы со стандартизованным экстрактом *Silybum marianum*. В 1990 году опубликованы результаты испытаний фитосом с силибином на добровольцах. Результаты показали, что при приеме внутрь фитосом с силибином, концентрация последнего в крови повышается в 7 раз по сравнению с концентрацией силибина после приема такой же дозы немодифицированной ЛФ [157, 160]. Повышенная концентрация действующих веществ *Silybum marianum* при приеме фитосом приводит к усилению их специфической активности и удлинению терапевтического эффекта по сравнению с приемом аналогичной дозы непродолжительной формы [101], а также приводит к более быстрому возврату показателей работы печени к норме. Так, после 2 месяцев приема фитосом с силимарином в дозе 240 мг, на 36 % снижается концентрация малонового диальдегида (маркера перекисного окисления жиров и оксидативного стресса) и на 15 % увеличивается способность печени утилизировать галактозу по сравнению с коммерческой формой силимарина [178].

Кроме оральных ЛФ с фитосомами разработаны и составы для нанесения на кожные покровы. Так, фосфолипидный комплекс глицерритиновой кислоты обладает противовоспалительной активностью благодаря структурной схожести глицерритиновой кислоты с кортизолом. Аналогичный комплекс сапонинов женьшеня при местном применении приводит к увеличению эластичности кожи, улучшается ее внешний вид [100].

Структурное сходство сапонинов и фитоэкдистероидов позволяет сделать предположение о возможности образования водородных связей между молекулами фитоэкдистероидов и фосфолипидов, и, как результат этого, получения фитосом с фитоэкдистероидами.

Технология липосом и фитосом имеет одни и те же стадии, но это две различные технологии. В табл. 3 отражены основные отличия в технологии липосом и фитосом.

Основные отличия между технологией липосом и фитосом [160, 172]

Технология фитосом	Технология липосом
Образование фитосом отмечается в том случае, когда соотношение между БАВ и фосфолипидом находится в пределах 1 : 1 – 1 : 2.	Соотношение между количеством лекарственного вещества и фосфолипида может быть 1 : 100, иногда до 1 : 1000.
Комплекс БАВ с фосфолипидом, формирует мембрану однослойной, либо многослойной мицеллы.	Лекарственное средство в липосомах находится во внутреннем пространстве, заполненным водным раствором.
Фитосомы суспендируют как в водных растворах, так и в органических растворителях, таких как ацетон, диоксан, метилхлорид, гексан, этилацетат	Липосомы диспергируют либо в воде, либо в буферных растворах.

Таким образом, фитосомы являются перспективными носителями доставки БАВ растительного происхождения для повышения их стабильности и биодоступности [161].

В литературных источниках широко представлены разработки регенерирующих мягких лекарственных форм на основе веществ растительного происхождения. Это подтверждает перспективность научно-исследовательских работ по разработке состава и технологии лекарственных форм фитоэкидстероидов серпухи венценосной для наружного применения.

### Выводы по главе 1

1. Флора Российской Федерации богата видами, накапливающими растительные экидстероиды – фитоэкидстероиды, но лишь немногие из них накапливают фитоэкидстероиды в достаточных количествах. При этом некоторые виды занесены в Красную книгу (*R. serratuloides* и *A. turkestanica*), многие не образуют продуктивных зарослей, их сложно ввести в культуру. На этом фоне

заметно выделяется серпуха венценосная, которая накапливает до 2 % фитостероидов в пересчете на сухое сырье, образует густые заросли и введена в культуру.

2. Широко изучено фармакологическое действие экидизона и 20-гидроксиэкидизона – основных фитостероидов субстанции серпистен. Доказано наличие у них анаболической, адаптогенной, гипогликемической, гемореологической, противоишемической и др. активности. Показано наличие репаративного действия фитостероидов.

3. Отечественными и зарубежными учеными проводятся исследования по разработке мазей и гелей с растительными экстрактами. Всё большее распространение получают гелевые композиции как на основе полиэтиленоксидов, хитозана, так и современных гелеобразователей (в частности сополимеров акриловой и метакриловой кислот). В то же время часто встречаются разработки мазей и на дифильных основах. Применяемые в них эмульгаторы не только стабилизируют дисперсную систему, но и улучшают растворимость действующих веществ, увеличивая тем самым фармакологическую активность последних.

4. Технология липосом с растительными экстрактами находится в постоянном развитии. В зависимости от растворимости растительных экстрактов в воде используют метод дегидратации/регидратации, обращения фаз и замораживания. Перспективным направлением является получение и изучение фитосом на основе БАВ, содержащих полигидроксилированные соединения. Показано, что эти комплексы обладают высокой стабильностью, биодоступностью.

Исходя из вышеизложенного, представлялось целесообразным разработать технологию наружных лекарственных форм фитостероидов из серпухи венценосной (серпистен), в том числе и на основе липосом, и методы контроля препаратов на их основе.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект исследования

Серпистен – стандартный очищенный препарат фитостероидов серпухи венценосной, основным действующим компонентом которого является 20-гидроксиэкдизон (рис. 6).

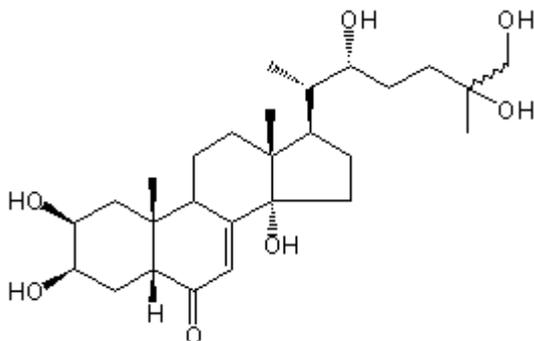


Рис. 6. Структурная формула 20-гидроксиэкдизона.

Серии серпистена наработаны в лаборатории биохимии и биотехнологии растений института биологии Коми НЦ УрО РАН. Согласно требованиям проекта ФСП серпистен должен удовлетворять следующим показателям:

- По внешнему виду серпистен представляет собой белый или белый с кремовым оттенком аморфный порошок, без запаха, слабо горького вкуса;
- Растворимость: серпистен мало растворим в воде, растворим в хлороформе, легко растворим в спирте 70 %.
- Подлинность: Ультрафиолетовый спектр 0,001 % водного раствора серпистена в области от 190 нм до 300 нм имел максимум поглощения при  $250 \pm 2$  нм.
- Прозрачность: Раствор 0,5 г серпистена в 50 мл спирта должен быть прозрачным и по окраске не превышать эталон № 1.

Полученные аналитические данные обобщены в табл. 4. На основании полученных данных установлено, что 3 серии серпистена соответствуют требованиям проекта ФСП на данную субстанцию.

Сводная таблица данных анализа серпистена

№ серии	Описание	Растворимость (в г субстанции на 1 мл раствора)	Подлинность	Град $[\alpha]_D$	Цветность и прозрачность раствора	Число пятен (ТСХ)	Сульфатная зола, %	Тяжелые металлы, %	Количественное содержание в пересчете на 20-гидроксиэксдизон, %
1	Белый аморфный порошок, без запаха, слабо горького вкуса	Спирт этиловый – 0,15; Вода очищенная – 0,01	УФ спектр 0,001 % водного раствора имеет максимум при 250 нм	+59	Бесцветный и прозрачный	3	0,18	0,0008	99,1
2	Белый аморфный порошок, без запаха, слабо горького вкуса	Спирт этиловый – 0,15; Вода очищенная – 0,01	УФ спектр 0,001 % водного раствора имеет максимум при 250 нм	+60	Бесцветный и прозрачный	3	0,17	0,001	100,1
3	Белый аморфный порошок, без запаха, слабо горького вкуса	Спирт этиловый – 0,15; Вода очищенная – 0,01	УФ спектр 0,001 % водного раствора имеет максимум при 250 нм	+58	Бесцветный и прозрачный	3	0,19	0,0009	99,8

## **2.2. Вспомогательные вещества**

### **Аэросил (ТУ 24.1-31695418-002-2003)**

Аэросил – коллоидный диоксид кремния очень легкий микронизированный порошок с выраженными адсорбционными свойствами.

### **Вазелин (ФСП 42-0206-4277-03)**

Вазелин – мазеобразная жидкость без запаха и вкуса. Растворим при нагревании в эфире и хлороформе, на холоде в углеводородах, не растворим в воде и спирте. В работе использовали вазелин ФГУП «Муромский приборостроительный завод».

### **Вода очищенная (ФС 42-0324-09)**

Бесцветная прозрачная жидкость без запаха и запаха.

### **Гель гидроксида алюминия (ФС 42-39-4-ВС-91)**

Представляет собой гомогенную суспензию голубовато-белого или беловатого цвета, разделяющуюся при стоянии на прозрачную жидкость и рыхлый осадок, не дающую при встряхивании неразбивающихся хлопьев и конгломератов и не образующую вязкого налета на стенках сосуда.

### **Карбопол–940 (ТУ 6–02–1118–83)**

Производное полиакриловой кислоты, белый гигроскопичный хлопьевидный порошок со слабокислой реакцией, набухающий в воде и других полярных растворителях после диспергирования и образующий стабильные гели при нейтрализации растворами веществ основного характера. Значение рН 0,5% водной дисперсии равно 2,7–3,5.

### **Лецитина-стандарта яичного спиртовой раствор 10 %**

#### **(ФС 42У-200/20-285-97)**

Сложный эфир аминспирта холина и диглицеридфосфорных кислот; является важнейшим представителем фосфолипидов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозитол. В работе использовали лецитин-стандарт производства ЗАО «Биолек», Украина

### **Масло вазелиновое (ФСП 42-0319-5596-04)**

Вазелиновое масло – бесцветная маслянистая жидкость, смягчающая мазевые основы. Смешивается с жирами и маслами (за исключением касторового). Хорошо растворимо в эфире, хлороформе, бензине, практически нерастворимо в воде, спирте. В экспериментах применяли масло вазелиновое ЗАО «Ярославская фармфабрика».

### **Масло подсолнечное (ГОСТ Р 52465-2005)**

Растительное масло, получаемое из семян подсолнечника, имеет специфичный запах и вкус.

### **Моноглицериды дистиллированные (ТУ 10-1197-95)**

Моноглицериды дистиллированные (МГД) – глицериновые эфиры стеариновой и пальмитиновой кислот. Обладают высокой эмульгирующей способностью.

### **Натрий–карбоксиметилцеллюлоза (ТУ 2385-001-64579383-01)**

Простой эфир натриевой соли целлюлозы и гликолевой кислоты. Молекулярная масса от 75000 до 750000. По внешнему виду белый или слегка желтоватый порошок без запаха. Растворим в холодной и горячей воде. 3 % водный раствор Na – КМЦ готовили по следующей методике: растворяли в воде при нагревании на водяной бане при температуре + (80-85) °С.

### **Поливиниловый спирт (ГОСТ 10779-78)**

Низкомолекулярный синтетический полимер винилацетата (М.м. 10000 - 45000). Представляет собой порошок белого или желтоватого цвета, растворимый в воде при нагревании. 5 % водный раствор поливинилового спирта (далее ПВС) готовили следующим образом: навеску ПВС заливали холодной водой и оставляли для набухания на 24 часа, затем смесь нагревали на водяной бане при температуре + (80-90) °С, периодически помешивая до получения прозрачного раствора.

### **Спирт этиловый (ФС 42-3072-00)**

Бесцветная, прозрачная, подвижная, летучая жидкость с характерным запахом и жгучим вкусом. Температура кипения 78 °С. Легко воспламеняется,

горит синеватым, слабо светящим. Бездымным пламенем. Смешивается во всех отношениях с водой, эфиром, хлороформом, ацетоном и глицерином.

#### **Твин – 80 (ФС 42-2540-88)**

Моноэфир полиоксиэтилированного сорбитана и олеиновой кислоты. Представляет собой жидкое прозрачное вещество желтого цвета. Растворим в воде, органических растворителях, растительных и минеральных маслах. Совместим с большинством фармацевтических препаратов и различными растворителями, стерилизуется без разложения.

#### **Хлороформ (ГОСТ 20015-88)**

Бесцветная, летучая, негорючая жидкость с эфирным запахом и обжигающим приторным вкусом. Практически нерастворим в воде, но смешивается с большинством органических растворителей.

#### **Холестерол**

Органическое соединение, природный жирный (липофильный) спирт, содержащийся в клеточных мембранах всех живых организмов. Нерастворим в воде, растворим в жирах и органических растворителях. В работе использовался холестерол фирмы «Alfa Aesar» (Британия).

#### **Эмульгатор Т-2 (ТУ 18-17/05-75)**

Смесь продуктов этерификации стеариновой кислоты с триглицерином (дистеарат глицерина). По внешнему виду это твердая воскообразная масса желтого или светло-коричневого цвета со специфическим запахом. Температура плавления + (60-65) °С.

#### **β-ситостерин**

Имеет структурное сходство с холестеролом, однако отличается от него дополнительной этиловой группой. Очищенный ситостерин представляет собой белый восковидный порошок с характерным запахом. Ситостерин не растворяется в воде, хорошо растворим в спирте. В работе использовался β-ситостерин фирмы «Acros» (США).

## **Фосфатный буфер**

### **Приготовление исходных растворов**

Раствор А. Отвешивали с погрешностью не более 0,0005 г, предварительно высушенные до постоянного веса 27,218 г калия фосфорнокислого однозамещенного ГОСТ 4198-75 химически чистого. Взвешенный компонент переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доливали 900 воды очищенной. После растворения реактива объем раствора доводили водой очищенной до метки.

Раствор Б. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 200 мл раствора натрия гидроксида с концентрацией 1 моль/л, затем доводили водой очищенной до метки.

### **Приготовление основного раствора**

Помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл 250 мл раствора А и 63 мл раствора Б, затем доводили водой очищенной до метки. рН буферного раствора должно быть 6,4. Буферный раствор пригоден к употреблению в течение 3 месяцев, при хранении в нормальных климатических условиях в хорошо закрытой склянке нейтрального стекла.

### **2.3. Приборы и оборудование**

- Испаритель роторный марки ИР-1МЗ (Россия);
- вакуумно-нагнетательный насос Millipore;
- ультразвуковая ванна Сапфир УЗВ-12 (Россия);
- колориметр фотоэлектрический КФК-2 (Россия);
- спектрофотометр Biochrom WPA Biowave II («Biochrom», Англия);
- верхнеприводная мешалка пропеллерного типа (Россия);
- анализатор размеров, молекулярной массы и дзета-потенциала Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания);
- вискозиметр Реотест – 2.1 (Германия);
- спектрометр ядерного магнитного резонанса Avance-III 500 (Bruker, Германия).

## **2.4. Методы исследования**

### **2.4.1. Определение стабильности мягких лекарственных форм серпистена**

Показателями стабильности разработанных препаратов являлись внешний вид, термическая и коллоидная устойчивость, рН, и количественное определение серпистена в лекарственной форме.

#### **2.4.1.1. Определение коллоидной стабильности лекарственных форм серпистена**

Коллоидную стабильность полученных лекарственных форм серпистена определяли согласно ОСТ 29188.2-91 [46].

#### **2.4.1.2. Определение термической стабильности лекарственных форм серпистена**

Термическую стабильность полученных лекарственных форм определяли согласно ОСТ 29188.2-91 [46] в условиях резко меняющихся температур.

#### **2.4.1.3. Определение водородного показателя лекарственных форм серпистена**

Водородный показатель лекарственных форм определяли в соответствии с ОСТ 29188.2-91 [46] и ОФС 42-0048-07. Для этого 10,0 г мази помещали в химический стакан, добавляли 90 мл воды очищенной, нагревали при перемешивании до температуры  $(80 \pm 2)$  °С до полного разрушения эмульсии (выделения масляного слоя), охлаждали до  $(20 \pm 2)$  °С, отделяли водный слой и измеряли в нем величину рН.

### **2.4.2. Качественное и количественное определение серпистена в лекарственных формах**

#### **Методика спектрофотометрического определения серпистена в мази**

##### Приготовление растворителей:

В качестве растворителей для количественного определения серпистена в мази использованы вода очищенная и спирт этиловый 40% (по объему), т. к. в них серпистен лучше всего растворяется.

#### Приготовление раствора рабочего стандартного образца серпистен:

В мерную колбу на 25 мл отвешивали 0,0200 г рабочего стандартного образца серпистена, растворяли и доводили до метки растворителем (раствор А). Отмеряли 1,5 мл раствора А в мерную колбу объемом 100 мл и доводили растворителем до метки.

#### Приготовление калибровочных растворов рабочего стандартного образца серпистена:

В мерную колбу на 100 мл отвешивали 0,025 г рабочего стандартного образца серпистена, растворяли и доводили до метки растворителем (раствор А). Отмеряли 0,5; 1,0; и 2,5 мл раствора А в мерные колбы объемом 25 мл для получения калибровочных растворов серпистена с концентрациями соответственно 5; 10; 25 мкг/мл, доводили растворителем до метки.

Методика анализа представлена в главе 3.

### **2.4.3. Биофармацевтические исследования лекарственных форм серпистена**

Важным критерием качества лекарственной формы является ее биологическая доступность.

#### **Метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану**

Динамику высвобождения серпистена из мазевой композиции определяли методом диффузии через полупроницаемую мембрану (равновесного диализа по Кривчинскому). Точную навеску композиции 0,5 г с помощью шпателя и трафарета наносили ровным слоем на целлофановую пленку, которую затем укрепляли на конце диализной трубки. Диализную трубку с составом вносили в стеклянный сосуд с диализной средой (водой очищенной) в количестве 25 мл и погружали на глубину не более 2 мм. Температуру диализной среды поддерживали на уровне 37 °С. Отбор проб диализата из каждой камеры производили после предварительного перемешивания через 30, 60, 90 минут от начала диализа с обязательным восполнением объема диализной среды.

Оптическая плотность испытуемых растворов диализатов определялась при аналитической длине волны.

### **Метод диффузии в агаровый гель**

Готовили 2 % агаровый гель, приготовленный на стандартном растворителе (8,9 г натрия хлорида, 0,3 г калия хлорида, 0,39 г кальция хлорида, очищенной воды до 1000 мл), разливали в чашки Петри, гелю давали сформироваться в течение 24 ч. Индикатор – 4 мл 10% раствора 2,4-динитрофенилгидразина вводили в процессе приготовления геля. В сформированном геле металлическим цилиндром ( $d=8$  мм) вырезали лунки, в которые помещали исследуемые образцы мазей (0,3 г). Готовую систему оставляли в термостате при температуре 37 °С на одни сутки, после чего определяли размеры окрашенных интенсивно – коричневый цвет зон вокруг каждой выемки соответствующей мази с помощью миллиметровой бумаги.

#### **2.4.4. Определение структурно-механических свойств лекарственных форм серпистена**

Структурно-механические характеристики оказывают заметное влияние на процессы высвобождения и всасывания действующих веществ из МЛФ, а также на их потребительские свойства: намазываемость, адгезию, способность выдавливаться из туб [45].

Для изучения структурно-механических свойств МЛФ, содержащей серпистен, использовали реологические методы исследования, которые проводили с помощью ротационного вискозиметра «Reotest 2» типа RV (Германия). Анализируемый объект в количестве около 0,1 г помещали на плиту. Для каждого образца проводили три измерения с интервалом в 30 мин при температуре 30 °С. Скорость вращения конуса изменяли последовательно от 0,333 до 145,8 об/с (по 12 скоростям вращения) и после достижения максимального для данного прибора касательного напряжения сдвига последовательно уменьшали скорость вращения. Обработку экспериментальных данных проводили по разработанной программе «Reotest» на персональном компьютере.

### 2.4.5. Определение осмотической активности мягких лекарственных форм серпистана

Осмотические свойства МЛФ изучали на упрощенной модели диализа (по Кривчинскому) в приборе, состоящем из стеклянной трубки диаметром 30 мм, один конец которой затянут целлофановой пленкой толщиной 0,45 мм с величиной пор 0,025 мм. Навеску мази массой 0,1 г наносили на внутреннюю поверхность плёнки и взвешивали. Затем помещали в сосуд с раствором натрия хлорида 0,9 % на 2-3 мм и термостатировали при температуре 37°C. Через каждый час вынимали диализную трубку и взвешивали с точностью 0,01 г. Увеличение массы трубки свидетельствовало о количестве поглощённой МЛФ жидкости по сравнению с первоначальной массой. В качестве контроля использовали раствор натрия хлорида 10%. Диализ вели до установления постоянной, неизменяющейся массы исследуемой системы.

Величину осмотической активности выражали в процентах к первоначальной массе МЛФ. Расчет адсорбционной емкости проводили по формуле :

$$X=(m*100)/a, \text{ где}$$

a - навеска мази, г;

m - масса адсорбированной жидкости, г [23, 41].

### 2.4.6. Определение кислотного числа

Около 10 г (точная навеска) мази помещали в колбу вместимостью 250 мл и растворяли в 50 мл смеси равных объемов 95% спирта и эфира, предварительно нейтрализованной по фенолфталеину раствором едкого натра (0,1 моль/л). Прибавляли 1 мл раствора фенолфталеина и титровали при постоянном перемешивании раствором едкого натра (0,1 моль/л) до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Кислотное число ( $K_{\text{ч}}$ ) вычисляют по формуле:

$$K_{\text{ч}} = \frac{V*5,61}{m}, \text{ где}$$

$V$  – количество миллилитров раствора едкого натра (0,1 моль/л), израсходованное на титрование;

$m$  – навеска вещества в граммах;

5,61 – количество миллиграммов едкого кали, соответствующее 1 мл раствора едкого натра (0,1 моль/ л).

#### **2.4.7. Определение индекса окисления лецитина и липосом**

Оценка индекса окисленности Кляйна для яичного лецитина проводилась спектрофотометрически в УФ области спектра на приборе СФ-2000. Методика определения заключалась в измерении оптических плотностей при трех длинах волн 215, 233 и 300 нм [8]. Величину индекса окисленности  $I$  окисл находили по следующей формуле [26, 32, 34]:

$$I_{\text{окисл}} = \frac{D_{233} - D_{300}}{D_{215} - D_{300}}, \text{ где}$$

$D_{300}$  – оптическая плотность раствора при 300 нм

$D_{233}$  – оптическая плотность раствора при 233 нм;

$D_{215}$  – оптическая плотность при 215 нм.

#### **2.4.8. Метод получения липосом с серпистеном**

В своей работе БМЛ получали методом гидратирования тонкой липидной пленки. Гомогенизацию липосом осуществляли с помощью ультразвуковой обработки.

##### **Получение БМЛ методом гидратирования тонкой липидной пленки**

100 мг яичного лецитина, вспомогательные вещества и 20 мг серпистена растворяли в 10 мл смеси хлороформа и этанола в соотношении 9:1 (по объему) и упаривали на ротормном испарителе ИР-1М3 (Россия) при  $(45 \pm 1)$  °С в течение 9 часов при остаточном давлении 30,0 кПа до образования тонкой липидной пленки на внутренней стенке круглодонной колбы [127]. Далее пленку ресуспендировали в течение 60 мин 30 мл соответствующего буферного раствора, подогретого до  $(55 \pm 1)$  °С. Получившиеся БМЛ выдерживали в течение 24 ч при  $(5 \pm 1)$  °С для структурирования.

## **Обработка БМЛ ультразвуком**

БМЛ подвергались ультразвуковой обработке в ультразвуковой ванне «Сапфир – УЗВ 12» (Россия) при частоте ультразвуковых волн 35 кГц и мощности ультразвука 200 Вт. Озвучивание проводилось при комнатной температуре циклами по 5 мин, перерыв между циклами 15 мин. Общее время озвучивания БМЛ составляло 35 мин.

### **2.4.9. Методы анализа липосомальных дисперсий**

#### **Определение диаметра липосом**

Размер липосом определяли на приборе «Zetasizer Nano ZS» фирмы Malvern (Великобритания) на базе Института генетики и экологии микроорганизмов Пермского научного центра Уральского отделения Российской Академии наук под руководством доктора медицинских наук, профессора К. В. Шмагеля. Метод определения размеров частиц основан на анализе спектра рассеянного света. Метод является абсолютным, не требующим пробоподготовки. Исследуемый раствор помещали в кювету из полиметилметакрилата с длиной оптического пути 10 мм. Кювету устанавливали в гнездо прибора и запускали измерение. Размер частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает размер частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости [20, 27]:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R}, \text{ где}$$

$D$  – коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости;

$k_B$  – константа Больцмана;

$T$  - абсолютная температура;

$\eta$  - сдвиговая вязкость среды;

$R$  – радиус частиц.

#### **Определение дзета-потенциала липосомальных мицелл**

Дзета-потенциал определяли на приборе «Zetasizer Nano ZS». Дзета-потенциал – электрический потенциал, который возникает при движении частиц между адсорбционным слоем ионов, располагающимся на поверхности частиц, и диффузионным слоем ионов среды, окружающим частицу. Измерение основано

на электрофоретическом рассеянии частиц в электрическом поле. Исследуемую жидкость помещали в кювету из полиметилметакрилата с длиной оптического пути 10 мм. В кювету погружали электроды и запускали измерение. Липосомальная суспензия считается устойчивой, если значение дзета-потенциала по модулю превышает 30 мВ, умеренно устойчивой, если значение дзета-потенциала находится в интервале 10-30 мВ по модулю и неустойчивой является при дзета-потенциале меньшем 10 мВ по модулю [132].

### **Определение индекса полидисперсности липосом**

Индекс полидисперсности липосом определяли на приборе «Zetasizer Nano ZS» фирмы Malvern (Великобритания). Исследуемый раствор помещали в кювету из полиметилметакрилата с длиной оптического пути 10 мм. Кювету устанавливали в гнездо прибора и запускали измерение.

### **Определение фотометрического показателя дисперсности липосом**

Определение фотометрического показателя дисперсности (далее ФПД) липосомальных дисперсий проводили на приборах КФК-2 (Россия) и Biochrom WPA Biowave II (Англия) в кювете с толщиной рабочего слоя 5 и 10 мм соответственно на фоне фосфатного буферного раствора. С этой целью до начала гомогенизации и после каждого цикла озвучивания осуществляли отбор аликвот липосомальной суспензии, в которых определяли оптическую плотность при длинах волн 400 и 540 нм на обоих приборах, концентрация фосфолипида составляла 3,33 мг/мл. Далее осуществляли разведение аликвоты фосфатным буферным раствором. В итоге получали 4 разведения липосомальной суспензии с содержанием фосфолипида 1,67; 1,11; 0,83 и 0,67 мг/мл, у которых определяли оптическую плотность при длинах волн 400 и 540 нм на обоих приборах. На основании этих данных проводили вычисление ФПД по следующей формуле:

$$\text{ФПД} = \frac{\lg \frac{D_{400}}{D_{540}}}{K}, \text{ где}$$

$D_{400}$  – оптическая плотность при длине волны 400 нм;

$D_{540}$  – оптическая плотность при длине волны 540 нм;

$$K = 0,1303 \left( \lg \frac{540}{400} \right).$$

### 2.4.10. Определение остаточных растворителей в липосомальной суспензии

Исследование концентрации хлороформа и спирта этилового в пробах проводили на базе Института органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук.

В работе использованы:

- газовый хроматограф «GS-2010» с двумя пламенно-ионизационными детекторами;
- колонка ZB-5 длиной 30,0 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной слоя неподвижной фазы 0,25 мкм, заполненная диметилполисилоксаном (95%) и фенилполисилоксаном (5%);
- газы-носители: азот со скоростью потока 30 мл/мин, водород по ГОСТ 3022-80 – 40 мл/мин, воздух – 400 мл/мин.

Условия хроматографирования: температура колонки программируемая, начальная температура – 40 °С, выдержанная в течение 3 мин, затем нагревание со скоростью 10 °С/мин до 280 °С, с последующей выдержкой в течение 30 мин, общее время анализа – 57 мин. Температура испарителя – 250 °С. Температура детектора – 300 °С.

Регистрацию хроматографических данных проводили с помощью программы «Хроматэк Аналитик» (СКБ Хроматэк, Россия).

Площадь пика (S) каждого компонента находили по формуле:

$$S = h * b, \text{ где}$$

h – высота пика, мм;

b – ширина пика на половине его высоты, мм.

Содержание компонента в образце определяли методом абсолютной калибровки по формуле:

$$C = \frac{S_o * K_p * C_{ст}}{S_{ст}}, \text{ где}$$

C – содержание компонента в образце, мг/мл;

C<sub>ст</sub> – содержание компонента в калибровочном образце;

$K_p$  – коэффициент разбавления пробы;

$S_o$ ,  $S_{ct}$  – площади пиков определяемого компонента на хроматограммах определяемого и калибровочного образцов.

#### **2.4.11. Определение степени включения серпистена в липосомы**

Определение проводили методом ВЭЖХ.

Приготовление подвижной фазы. 134,45 мл ацетонитрила и 25,21 мл тетрагидрофурана помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и смешивают с водой очищенной, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. Около 5 мл (примерный объем) суспензии липосом с серпистеном помещают в центрифужную пробирку, центрифугируют при ускорении 15000 g в течение 1 часа. Надосадочную жидкость (супернатант) отделяют от осадка.

Стандартный раствор. Около 0,02 г рабочего стандартного образца серпистена (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

#### Хроматографические условия:

Колонка	150×4 мм с гексадецилсилил силикагелем (C16), 8 мкм;
Подвижная фаза	вода очищенная–ацетонитрил–тетрагидрофуран (100 : 16 : 3);
Скорость потока	1 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 254 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение между пиками 20-гидроксиэкдизона и 25S-инокостерона должно быть не менее 5,0.

Пять раз хроматографируют стандартный раствор. Относительное стандартное отклонение для площади пика 20-гидроксиэкдизона должно быть не более 2,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор и стандартный раствор.

Содержание серпистена (мг/мл) в супернатанте (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_{\text{иссл}} * C_{\text{ст}} * K}{S_{\text{ст}} * V_{\text{аликв}}}, \text{ где}$$

$S_{\text{иссл}}$  – площадь пика 20-гидроксиэкдизона на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{\text{ст}}$  – площадь пика 20-гидроксиэкдизона на хроматограмме стандартного раствора;

$C_{\text{ст}}$  – концентрация стандартного раствора 20-гидроксиэкдизона, мг/мл;

$V_{\text{аликв}}$  – объем вводимой пробы, мл;

K – поправочный коэффициент.

$$K = \frac{100\%}{75\%} = 1,333, \text{ где}$$

75 % - содержание 20-гидроксиэкдизона в серпистене.

На основании полученных данных рассчитывали граммовое содержание серпистена в супернатанте:

$$Г \text{ (мг)} = X \text{ (мг/мл)} * P \text{ (мл)}, \text{ где}$$

P – объем липосомальной суспензии.

#### **2.4.12. Изучение ядерного магнитного резонанса лецитина и тонкой липидной пленки с серпистеном**

Спектры ЯМР  $^{31}\text{P}$  регистрировали с помощью спектрометра ядерного магнитного резонанса Avance-III 500 (Bruker, Германия) при частоте 202,46 МГц в дейтерированном хлороформе и диметилсульфоксиде (ДМСО) на базе Института органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук. Химические сдвиги регистрировали относительно внешнего стандарта – ортофосфорной кислоты ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

#### **2.5. Биологические методы**

Испытание биологической активности осуществлялось в соответствии с требованиями Фармакологического комитета, изложенных в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (г. Москва, 2012 г). В Руководстве указано, что в качестве эталонов сравнения должны

использоваться современные высокоэффективные лекарственные средства преимущественно ранозаживляющего действия (Солкосерил, Актовегин, Декспантенол) [67].

Испытания проводились в ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ на кафедре физиологии и патологии под руководством зав. кафедрой проф. Б.Я. Сыропятова.

### **2.5.1. Биологические модели**

Работа выполнена на беспородных белых крысах массой 180-330 г обоего пола и кроликах-самцах породы "шиншилла" массой 3-3,6 кг. Всего в экспериментах использовались 60 белых крыс и 3 кролика. Животные содержались в типовом виварии с естественным 12-часовым свето-темновым циклом, при температуре воздуха (20-21) °С. Их питание осуществлялось в соответствии с нормами кормов для экспериментальных животных. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 51000.3-96 Общие требования к испытательным лабораториям) и Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP), с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.). Группы для исследования формировались методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя. В день эксперимента кормление животных осуществляли после окончания исследований.

### **2.5.2. Оценка регенерирующей активности исследуемых лекарственных форм серпистена на модели линейных асептических ран кожи**

Влияние на заживление линейных асептических ран кожи изучали ранотензиометрическим методом. Опыты проведены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-250 г.

При исследовании специфической активности лекарственных форм с серпистеном на модели линейной асептической раны все животные были разделены на 7 групп по 8 крыс в каждой группе, из них 6 групп составляли опытные животные и 1 группа – контрольная.

В асептических условиях под кратковременным эфирным наркозом фиксировали животное, выстригали шерсть, производили 2 разреза кожи до подкожной клетчатки и зашивали раны рядом узловых швов. Раны животных подопытных групп ежедневно обрабатывали исследуемыми образцами лекарственных форм фитоэкдистероидов серпухи венценосной и основой аналогичного состава, но без добавления фитоэкдистероидов серпухи венценосной, в контрольной группе обработку не производили. В качестве препаратов сравнения использовали крем «Актовегин» («Никомед», Дания) и мазь «Бепантен» («Байер», Германия), которые наносились ежедневно на раны в двух группах сравнения.

На 5-е и 7-е сутки после операции определяли силу разрыва рубца в опытных и контрольных группах. Указанные сроки объясняются следующим. В первые дни после операционной травмы преобладают процессы катаболизма, расстройство различных видов обмена, дистрофические изменения в клетках. В первые три дня в ране преобладают воспалительные процессы, происходит рассасывание некротических тканей. В течение 5-7 дней происходит нормализация равновесия между синтезом и распадом белка. Через 5 дней отмечается значительное разрастание фибробластов, образование ретикулиновых волокон и коллагена, а также новообразование капилляров. К седьмому дню в неинфицированной операционной ране воспалительный процесс ликвидируется почти полностью, рана эпителизируется, в это время в рубце накапливается максимальное количество фибробластов и коллагена.

Определение прочности операционного рубца кожи крыс производили с помощью специального прибора, разработанного С. М. Горбуновым и соавт. [18]. О регенерирующем действии мазей судили по изменению прочности послеоперационного рубца на разрыв по сравнению с контролем.

### **2.5.3. Изучение регенерирующей активности исследуемых лекарственных форм серпистена на модели ожоговых ран кожи**

Для оценки противоожогового действия мази и липосомального геля использована модель дозированных по площади и глубине термических ожогов

кожи у крыс. Эксперименты проведены на белых беспородных крысах обоего пола с исходной массой 190-330 г. Применен контактный высокотемпературный способ (устройство на основе электропаяльника). Моделирование ран производили под эфирным наркозом. Ожоги спины IIIA степени вызывали прикладыванием на 8 сек к предварительно депилированной коже разогретой до 200 °С медной пластины размером (2,0×2,0) см<sup>2</sup>. Об общем состоянии животных судили на основании оценки поведенческих реакций, контроля аппетита, массы тела, выживаемости. Наблюдение за процессом заживления ожоговых ран проводили ежедневно в течение 30 суток, величину ожоговых дефектов измеряли через каждые 5 суток на протяжении исследования [38, 48].

Раны животных подопытных групп ежедневно обрабатывали исследуемыми составами. В контрольной группе обработку не производили. В качестве препарата сравнения использовали крем «Актовегин» 5%.

О темпах заживления раневых повреждений у крыс из разных групп судили, периодически снимая выкройки ран на пленку, взвешивая их и определяя площадь раны в условных единицах (миллиграммах). Вычисляли степень заживления раны в процентах по отношению к исходной величине. Оценивали состояние раневой поверхности, сроки отторжения первичного струпа и полного заживления.

Испытуемое средство считали перспективным для использования в качестве ранозаживляющего, если наблюдалась более благоприятная динамика заживления по сравнению с контролем.

## **2.6. Математическое планирование эксперимента**

Оптимизацию состава мазевой композиции проводили по 4 факторам с использованием схемы греко – латинского квадрата. Дисперсионный анализ греко – латинского квадрата проводится по алгоритму расчета трехфакторного латинского квадрата с учетом четвертого фактора. Опыты проводили по греко-латинскому квадрату 4х4 с количеством опытов 16 [5, 21].

## **2.7. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку всех данных осуществляли с применением пакета прикладных программ Excel 2010 с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата ( $M \pm m$ ) и непарного t-критерия Стьюдента, при этом различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗИ С СЕРПИСТЕНОМ

Наличие репаративных свойств у фитоэкдистероидов и отсутствие в доступной литературе исследований по технологическим разработкам мазевых композиций делает актуальным обоснование состава и технологии мази на основе фитоэкдистероидов Серпухи венценосной, включающего выбор способа введения субстанции, типа мазевой основы и поиск вспомогательных веществ для достижения максимальной биологической активности фитоэкдистероидов [23]. Выбор концентрации серпистена 0,02 % основан на данных фармакологических исследований [50].

#### 3.1. Подбор способа введения субстанции и типа мазевой основы в мягкой лекарственной форме с серпистеном

С целью выбора способа введения серпистена в основу мази проведены исследования по растворимости серпистена в фармакологически индифферентных растворителях: воде очищенной и спирте этиловом (табл. 4).

Таблица 4.

Растворимость серпистена в воде и спирте

Растворитель	Объем растворителя, мл	Масса растворившегося серпистена, мг
Вода очищенная	10	20
Спирт этиловый 95%	10	100
Спирт этиловый 40%	10	200

Из табл. 6 видно, что серпистен умеренно растворим в воде, хорошо растворим в спирте этиловом 95%, но лучше всего растворяется в спирте этиловом 40 %. Учитывая физико-химические свойства серпистена, предложено его вводить в основу в виде водно-спиртового раствора в соотношении 1 : 50.

На начальном этапе выбора природы основы мази серпистена нами изучены технологические и биофармацевтические параметры мазевых композиций дифильного (состав 1), гидрофобного (состав 2) и гидрофильного (состав 3) типов с применением вспомогательных веществ, часто используемых в технологии

МЛФ (табл. 5). Для сравнительной оценки результатов состав модельной гидрофобной основы максимально приближен к рецептуре мази «Витадерм».

Таблица 5.

## Составы исследуемых образцов мазей серпистена

Компоненты	Серпистен	Аэросил	Вазелин	Вазелиновое масло	Глицерин	МГД	Ланолин безводный	Na-КМЦ	Спирт этиловый	Вода очищенная
№ состава										
1	0,02	3,0	-	44,0	-	3,0	-	-	1,0	До 100,0
2	0,02	-	79,0	-	-	-	20,0	-	1,0	-
3	0,02	-	-	-	8,0	-	-	3,0	1,0	До 100,0

Все полученные составы изучали по таким параметрам как внешний вид, рН, термическая и коллоидная устойчивость, по методикам, описанным в главе 2

Исследование устойчивости МЛФ серпистена показало, что все составы термически и коллоидно устойчивые.

Значения оценки водородного показателя мазевых композиций и его метрологические характеристики представлены в табл. 6.

Таблица 6.

## Значение водородного показателя мазевых композиций и его метрологические характеристики (n=5)

№ состава	f	pH ( $X_{cp}$ )	$S^2$	S	$Sx_{cp}$	P, %	t (P, f)	$\Delta X$	$\epsilon_{cp}$ , %
1	4	6,22	0,024	0,16	0,09	95	3,18	0,29	4,90
2	4	6,14	0,003	0,05	0,03	95	3,18	0,10	1,55
3	4	7,19	0,016	0,13	0,07	95	3,18	0,23	3,26

Примечание. f – количество степеней свободы;  $X_{cp}$  – выборочное среднее;  $S^2$  – исправленная выборочная дисперсия; S – исправленное выборочное среднее квадратическое отклонение (стандартное отклонение);  $Sx_{cp}$  – исправленное среднее квадратическое отклонение средней выборочной (стандартное отклонение); P, % - доверительная вероятность; t (P, f) – коэффициент Стьюдента;  $\Delta X$  – полуширина доверительного интервала;  $\epsilon_{cp}$ , - относительная погрешность.

Близкое значение к рН кожи (5,5) отмечается у составов 1 и 2. Состав 3 имеет слабощелочную реакцию. Для эффективного заживления водородный показатель ранозаживляющих мазей должен быть в пределах от 5,5 до 7,0 для того, чтобы нормализовать рН раневой поверхности [87]. Из табл. 6 видно, что 2 состава из 3 укладываются в указанные пределы, для этих составов не требуется введения вспомогательных веществ регулирующих рН.

На следующем этапе оценивались реологические показатели модельных композиций.

### **3.2. Исследование реологических свойств мазей серпистена**

В последнее время реологические параметры все чаще используются при разработке новых лекарственных препаратов для наружного применения. К этим параметрам относят: эффективную вязкость (измеряется в Па\*с) и напряжение сдвига (измеряется в Па). Природа вспомогательных веществ, их соотношение, рН растворов, температура и многое др. влияют на внутреннюю структуру МЛФ. В работе изучены реологические характеристики модельных составов 1-3. В качестве препарата сравнения использовали мазь «Бепантен» (ЗАО Байер, Германия).

Исследования проводились на приборе «Реотест 2.1» по методике, описанной в главе 2.

По рассчитанным значениям для каждого состава мази серпистена строили графики зависимости средних значений (не менее 3 повторностей) эффективной вязкости от градиента приложенной скорости. Результаты испытаний представлены на рис. 7.

Как видно из рис. 7 при изучении реологических показателей исследуемых составов наблюдается обратно пропорциональная зависимость значений эффективной вязкости от значений скорости сдвига, что позволяет отнести все составы к структурированным упруго-пластичным телам.

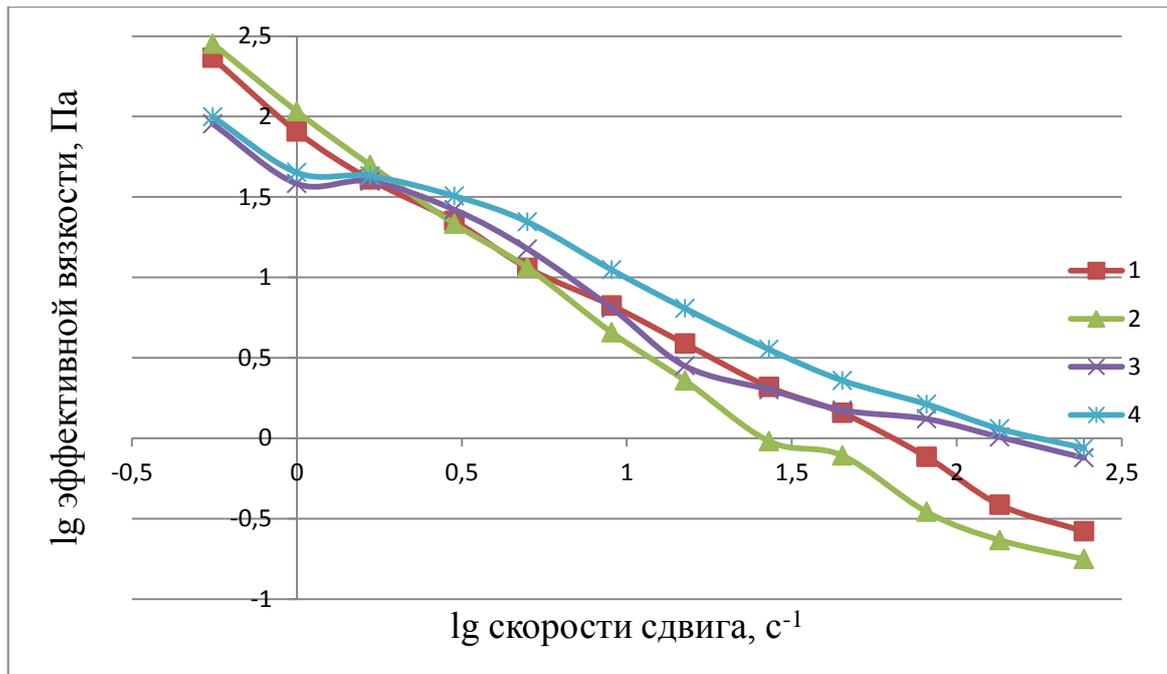


Рис. 7. Зависимость логарифма эффективной вязкости от логарифма скорости сдвига в мазевых композициях серпистена.

- 1 – дифильная модельная мазь серпистена;
- 2 – гидрофобная модельная мазь серпистена;
- 3 – гидрофильная модельная мазь серпистена;
- 4 – лекарственный препарат «Бепантен» («Байер», Германия).

Далее рассчитывали средние значения (не менее трех повторностей) напряжения сдвига и строили график зависимости касательного напряжения сдвига от скорости сдвига (рис. 8). Кривые, полученные в ходе деформации модельных образцов серпистена в координатах «скорость сдвига – напряжение сдвига», описываются восходящими и нисходящими линиями, образуя при этом «петлю гистерезиса».

Наличие «петли гистерезиса» указывает на то, что изучаемые составы серпистена обладают тиксотропностью и характеризуется хорошей намазываемостью и способностью выдавливаться из туб.

Реологический оптимум консистенции в диапазоне скоростей сдвига от 1,5 до 1312 с<sup>-1</sup> характеризуется эффективной вязкостью 0,34–108 Па\*с для мазей гидрофильной природы и 0,32–93,3 Па\*с – для гидрофобной [40]. Модельные композиции гидрофобной и гидрофильной природы не входят в область

реологического оптимума, тогда как дифильная мазь серпистена укладывается в пределах реологического оптимума. Однако более низкое значение напряжения сдвига по сравнению с препаратом сравнения говорит о необходимости внесения в состав композиции загустителей.

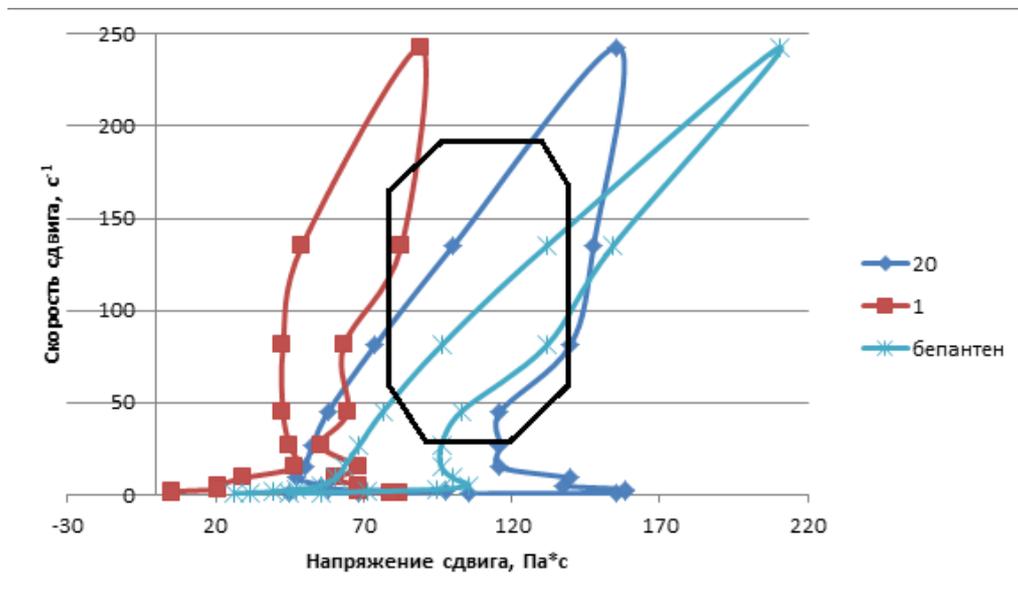


Рис. 8. Реограммы течения мазевых композиций серпистена.

- 1 –дифильная модельная мазь серпистена;
- 2 – гидрофобная модельная мазь серпистена;
- 3 – гидрофильная модельная мазь серпистена;
- 4 – лекарственный препарат «Бепантен» («Байер», Германия).

Таким образом, с точки зрения реологии, предпочтительнее использование дифильной основы.

### 3.3. Изучение высвобождения серпистена из мазевых композиций

Одним из распространенных способов, характеризующих терапевтическую эффективность МЛФ, является анализ профиля высвобождения фармацевтических субстанций из основы. Высвобождение серпистена из изучаемых мазевых композиций проводили методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану.

Количество высвободившегося серпистена определяли с помощью градуировочного графика, представленного в главе 2. Диализ серпистена из модельных мазевых композиций проводили согласно методике, описанной в главе

2. Отбор диализатов осуществляли на 30-й, 60-й, 90-й и 120-й минуте диализа. Результаты изучения высвобождения серпистена из модельных мазевых композиций представлены на рис. 9.

Данные рис. 9 говорят о том, что высвобождение серпистена в значительной степени зависит от природы мазевой основы. В результате исследования установлено, что степень высвобождения серпистена из состава 1, обладающего дифильной природой, больше, чем у остальных композиций.

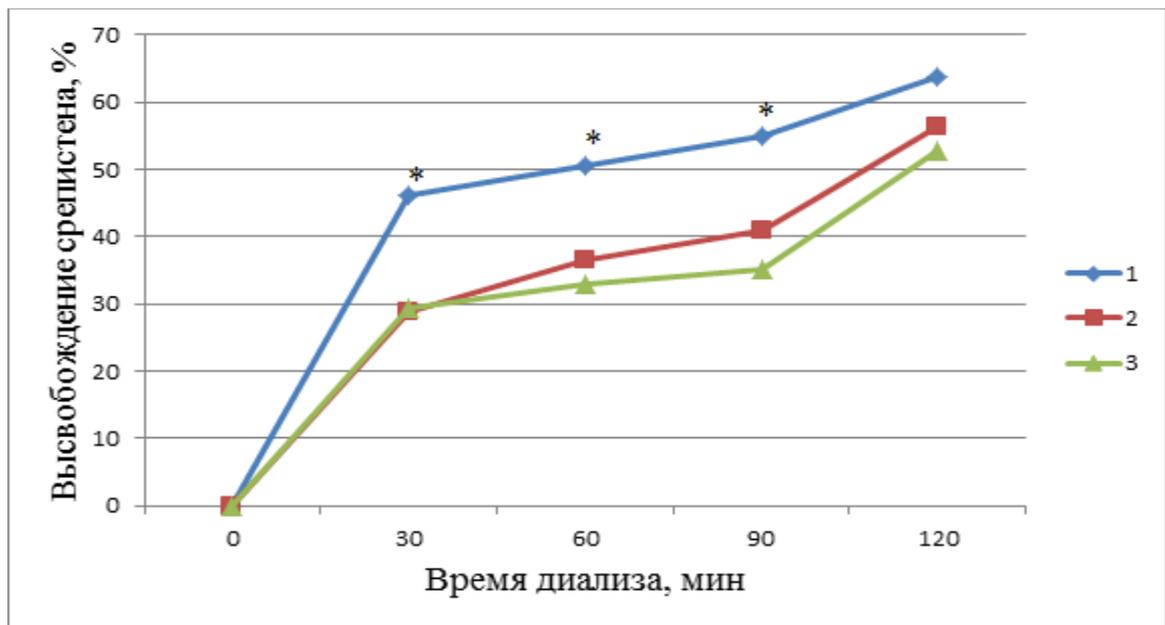


Рис. 9. Динамика высвобождения серпистена из модельных мазевых композиций (табл. 7).

- 1 – дифильная модельная мазь серпистена;
- 2 – гидрофобная модельная мазь серпистена;
- 3 – гидрофильная модельная мазь серпистена;
- \* – различие достоверно при  $p \leq 0,05$ .

Тем самым, оценка высвобождения серпистена из мазевых композиций, полученная методом равновесного диализа, указывает на то, что наиболее предпочтительным составом для лекарственной формы с серпистеном является состав 1, который представляет собой эмульсионную мазь типа вода/масло.

Проведенными экспериментами доказано предпочтительность использования дифильной основы, однако дифильная композиция с фитоэкидестероидами нуждается в оптимизации состава с целью улучшения

реологических параметров, стабилизации pH и подбора рационального соотношения компонентов гидрофобной фазы.

### 3.4. Оптимизация состава мази серпистена

При оптимизации технологии мази серпистена проведено исследование по изучению влияния состава лекарственной формы на стабильность дифильной системы. По данным литературы и предварительными экспериментами отобраны факторы, существенно влияющие на качество мазевых композиций с серпистеном: процент гидрофильной фазы, вид эмульгатора, вид загустителя и природа гидрофобной фазы.

Для обоснования оптимального состава и технологии мази серпистена применяли математический метод планирования эксперимента по типу греко-латинского квадрата (4X4). В работе изучено влияние следующих факторов [5]:

**A** – процент гидрофильной фазы:

A 1 – 10 %

A 2 – 30 %

A 3 – 50 %

A 4 – 75 %

**B** – вид эмульгатора:

B 1 – МГД (3 %)

B 2 – эмульгатор Т-2 (10 %)

B 3 – твин-80 (1 %)

B 4 – смесь эмульгатора Т-2 и МГД (5 %)

**C** – вид загустителя:

C 1 – гель Na – КМЦ (3 %)

C 2 – гель ПВС (5 %)

C 3 – гель гидроксида алюминия (10 %)

C 4 – суспензия аэросила (5 %)

**D** – природа гидрофобной фазы:

D 1 – вазелин

D 2 – вазелиновое масло

D 3 – смесь вазелина и вазелинового масла

D 4 – подсолнечное масло

Параметрами оптимизации служили: стабильность мазевой композиции, скорость высвобождения серпистена из мази в агаровый гель, pH водной вытяжки и кислотное число.

При приготовлении 16 экспериментальных дифильных мазевых композиций, представленных в табл. 7, использовали следующие технологические приемы: эмульгаторы сплавливали с гидрофобной основой, загустители – ПВС, Na-КМЦ, гидроксид алюминия и аэросил – вводили в виде

гелей. Водно-спиртовой раствор серпистана вводили вместе с остальными гидрофильными компонентами в сплав основы и эмульгатора по типу эмульсии.

Полученные мази выдерживались в прохладном месте в течение 24 часов, после чего они исследовались на стабильность, определяли водородный показатель, кислотное число и высвобождение серпистана в агаровый гель.

Из 16 мазевых композиций только 6 имели удовлетворительный внешний вид и представляли собой однородные мази, мягкой консистенции, белые с желтоватым оттенком или бежевого цвета (составы № 4, 5, 6, 8, 13, 15). Остальные 10 мазей (составы № 7, 9-12, 14-19) расслаивались в течение 24 часов хранения.

Составы образцов мазей серпистена

Состав	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Ингредиенты																
Серпистен, г.	0,02															
МГД, г	3,0				3,0				3,0				3,0			
Эмульгатор Т-2, г		10,0				10,0				10,0				10,0		
Твин – 80, г			1,0				1,0				1,0				1,0	
Смесь эмульгатора Т-2 и МГД (1:1), г				5,0				5,0				5,0				5,0
Гель На – КМЦ, г	3,0					3,0					3,0					3,0
Гель ПВС		5,0			5,0							5,0			5,0	
Гель гидроксида алюминия, г			10,0					10,0	10,0					10,0		
Аэросил				5,0			5,0			5,0			5,0			
Вазелин, г	87,0						64,0					66,0		15,0		
Вазелиновое масло, г		80,0						65,0			49,0		15,0			
Смесь вазелина и вазелинового масла (1:1)			89,0		67,0					35,0						20,0
Подсолнечное масло, г				80,0		60,0			47,0						24,0	
Вода очищенная, мл	7,0	5,0		10,0	25,0	27,0	30,0	20,0	40,0	50,0	47,0	24,0	77,0	65,0	70,0	72,0

Результаты определения качества экспериментальных образцов мазей сведены в табл. 8. В таблице приведены данные среднего значения трех опытов.

Таблица 8.

## Функция отклика показателей качества мазей серпистена

№ состава	pH	Кислотное число, мг	Высвобождение фитоэкдистероидов, мм
4	6,59	0,28	6
5	5,69	0,17	6
6	6,35	0,22	13
7	6,20	2,75	6
8	6,51	0,11	6
9	6,55	0,73	6
10	6,36	0,39	6
11	6,60	0,17	6
12	6,29	0,34	6
13	6,14	0,62	6
14	6,49	0,22	14
15	6,39	0,11	6
16	6,26	0,79	6
17	6,08	0,28	6
18	6,35	0,22	15
19	6,65	0,11	6

При определении pH мазевых композиций установлено, что значения находятся от 5,69 до 6,65.

Дисперсионный анализ показателя pH по критерию Фишера (табл. 9), показал, что на водородный показатель водной вытяжки существенное влияние оказывают процент гидрофильной фазы ( $F_{расч.} 5,14 > F_{кр.} 4,76$ ), вид эмульгатора ( $F_{расч.} 8,29 > F_{кр.} 4,76$ ) и загуститель ( $F_{расч.} 8,45 > F_{кр.} 4,76$ ).

Для статистически значимых факторов проведены множественные сравнения с использованием рангового критерия Дункана. Ряды предпочтительности для фактора А имели следующий вид: 10 % гидрофильной фазы > 50 % > 75 % > 30 %, для фактора В: эмульгатор Т-2 > твин-80 > МГД > смесь эмульгатора Т-2 и МГД, а для фактора С: аэросил > ПВС > алюминия гидроксид > Na – КМЦ. При  $p=0,05$  отличия значимы в парах  $A_2-A_1$ ,  $B_4-B_2$ ,  $C_1-C_2$ ,  $C_1-C_4$ .

Таблица 9.

## Дисперсионный анализ результатов определения pH

Источник дисперсии	Число степеней свободы(f)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Фрасч.	F табл.
A	3	0,1797	0,0599	5,13	4,76
B	3	0,2900	0,0967	8,29	4,76
C	3	0,2959	0,0986	8,45	4,76
D	3	0,0476	0,0159	1,36	4,76
Остаток	6	0,0700	0,01167	-	-
Общая сумма	15	0,8832	-	-	-

Таким образом, введение в состав мази Na – КМЦ приводит к ее подщелачиванию, что отрицательно сказывается на значении водородного показателя мазей серпистена.

Результаты дисперсионного анализа показателя кислотное число представлены в табл. 10.

Таблица 10.

## Дисперсионный анализ результатов определения кислотное число

Источник дисперсии	Число степеней свободы (f)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Фрасч.	F табл.
A	3	0,7951	0,2650	1,93	4,76
B	3	0,6031	0,2010	1,46	4,76
C	3	2,4476	0,8159	5,94	4,76
D	3	1,5728	0,5243	3,82	4,76
Ошибка	6	0,8241	0,1374	-	-
Общая сумма	15	6,2427	-	-	-

Показатели F-критерия свидетельствуют о том, что существенное влияние на кислотное число оказывает фактор C (загуститель). Согласно ранговому критерию Дункана получили следующий ряд предпочтительности: аэросил > Na – КМЦ > алюминия гидроксид > ПВС.

Наименьшее значение кислотного числа мази с серпистеном (0,11) наблюдается, когда гидрофильная фаза составляет 50% от массы прописи, в

качестве эмульгатора выступает твин-80, а гидрофобная фаза представлена смесью вазелина и вазелинового масла.

При изучении влияния факторов на высвобождение фитоэкдистероидов. установлено, что в составах 3, 14, 18 высвобождение фитоэкдистероидов достоверно отличается от остальных составов. Результаты дисперсионного анализа отражены в табл. 11.

Таблица 11.

Дисперсионный анализ результатов определения высвобождения  
фитоэкдистероидов

Источник дисперсии	Число степеней свободы(f)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	F расч.	F табл.
A	3	12,5	4,17	2,00	4,76
B	3	108	36,00	17,28	4,76
C	3	12,5	4,17	2,00	4,76
D	3	12,5	4,17	2,00	4,76
Ошибка	6	12,5	2,08	-	-
Общая сумма	15	158	-	-	-

При дисперсионном анализе результатов контроля мази серпистена установлено, что  $F_{расч.} 17,28 > F_{табл.} 4,76$  для фактора В. Ряд предпочтений имеет следующий вид: твин-80 > МГД > эмульгатор Т-2 > смесь эмульгатора Т-2 и МГД. Дополнительные исследования установили, что твин-80 дает ложноположительный результат. Таким образом, метод диффузии в агаровый гель не выявил влияния факторов на высвобождение серпистена из мази.

Для оценки термической устойчивости мазевых основ составы 5, 6, 8 и 15, как наиболее рациональные, подвергались термообработке с целью выявления влияния температуры на стабильность мазевых композиций. Используются рекомендуемые режимы стерилизации для мягких лекарственных форм. Данные представлены в табл. 12. По результатам испытаний оказалось, что составы, содержащие эмульгатор Т-2 и аэросил, являются наиболее термостабильными, т. к. ни при одном из режимов термообработки не наблюдалось резкого скачка рН и значения кислотного числа.

Показатели качества мазей серпистена до и после термообработки

Режим стерилизации	Показатели	№ состава			
		5	6	8	15
До термообработки	Внешний вид	Однородная	Однородная	Однородная	однородная
	pH	5,69	6,35	6,51	6,39
	Кислотное число	0,17	0,22	0,11	0,11
110 °С, 0,5 атм., 30 мин.	Внешний вид	Расслаивающаяся	Однородная	Однородная	расслаивающаяся
	pH	6,55	6,85	7,19	7,15
	Кислотное число	0,11	0,14	0,28	0,14
121 °С, 0,5 атм., 30 мин.	Внешний вид	Расслаивающаяся	расслаивающаяся	Однородная	однородная
	pH	6,70	7,51	7,25	7,30
	Кислотное число	0,14	0,14	0,14	0,28
132 °С, 2 атм., 30 мин.	Внешний вид	Однородная	Однородная	Однородная	однородная
	pH	6,66	7,09	6,95	7,25
	Кислотное число	0,14	0,14	0,14	0,28
180 °С, 30 мин.	Внешний вид	Однородная	Однородная	Расслаивающаяся	расслаивающаяся
	pH	6,50	6,55	6,60	6,46
	Кислотное число	0,17	0,11	0,11	0,17

В результате проведенного комплекса работ по оптимизации дифильной мази с серпистеном установлено, что в рациональной прописи соотношение гидрофобной и гидрофильной фаз должно быть 1 : 1, пропись должна содержать эмульгатор Т-2, аэросил и смесь вазелина и вазелинового масла в пропорции 1 : 1. Согласно этому предложен следующий состав мази:

Состав 20	Серпистен	0,02
	Т-2	3,0
	Аэросил	3,0
	Вазелин	23,0
	Вазелиновое масло	23,0
	Спирт этиловый 40 %	1 мл
	Вода очищенная	До 100,0

По предложенному составу получены 3 серии мази, которые заложены на хранение. Учитывая дифильную природу мази серпистена, предложен температурный режим (12–15) °С. Характеристика полученной мази проведена по следующим параметрам: коллоидная и термическая стабильность, рН водной вытяжки. Предложенный состав оказался стабильным, при хранении не расслаивался и не изменял рН. Значения водородного показателя мазовой композиции и его метрологические характеристики приведены в табл. 13.

Таблица 13.

Значение водородного показателя оптимальной мазовой композиции с серпистеном и его метрологические характеристики

№ состава	F	pH (X <sub>cp</sub> )	S <sup>2</sup>	S	Sx <sub>cp</sub>	a, %	t (a, f)	ΔX	ε <sub>cp</sub> , %
20	3	5,85	0,018	0,13	0,08	95	3,18	0,25	4,21

Оптимизация привела к снижению значения рН с 6,22 у исходного состава до 5,85. Таким образом, водородный показатель полученного состава стал более приемлемым для дерматологических мазей.

Сравнительный анализ эффективной вязкости показал, что предлагаемый состав обладает лучшими реопараметрами, чем состав 1, т. к. у него более

широкая петля гистерезиса и более высокие значения напряжения сдвига. Петля гистерезиса состава 20 максимально приближена к препарату «мазь Бепантен» (рис. 10). Таким образом, оптимизация состава дифильной мази с серпистеном позволила улучшить его реологические показатели.

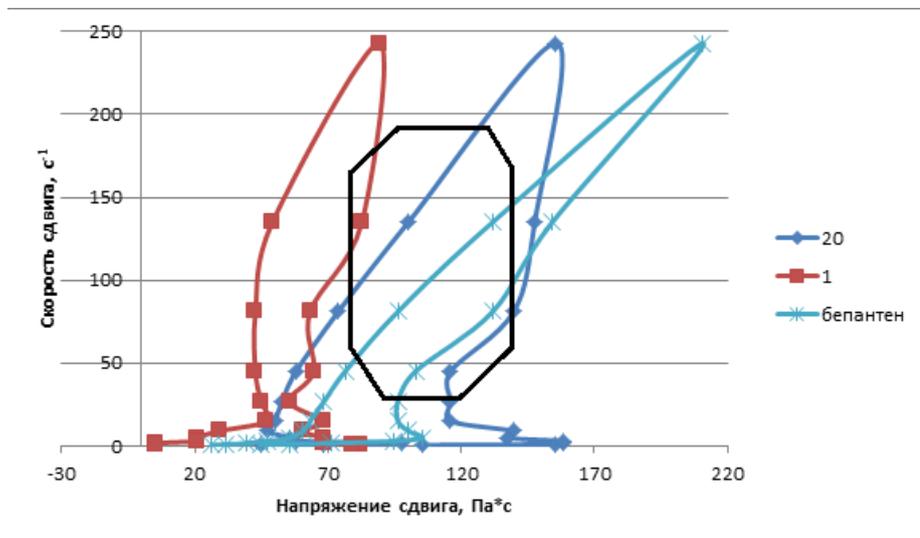


Рис. 10. Реограммы течения мазевых композиций.

Для подтверждения рациональности предложенного состава проведена сравнительная оценка динамики высвобождения серпистена из состава 1 (первоначальная дифильная основа) и состава 20 (оптимизированная композиция). В ходе биофармацевтических исследований установлено, что состав 20 обладает лучшим профилем высвобождения серпистена из МЛФ (рис. 11).

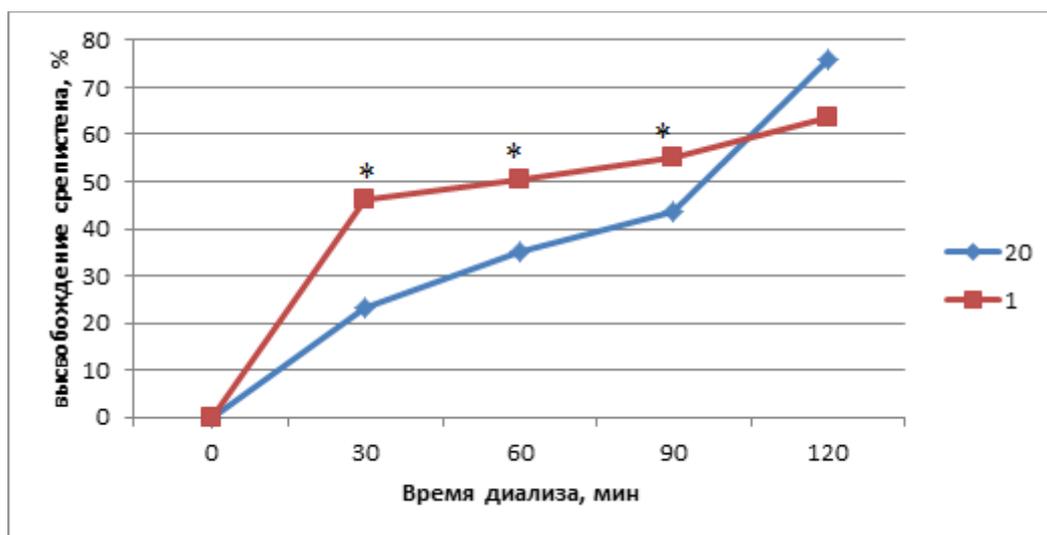


Рис. 11. Динамика высвобождения серпистена из мазевых композиций.

Примечание: \* - различие достоверно при  $p < 0,05$ .

За 2 ч диализа из состава 20 выходит на 11 % серпистана больше чем из первоначального состава.

Для МЛФ регенерирующего действия предлагается определять осмотическую активность. Умеренная осмотическая активность способствует удалению гноя из раны, ее очищению и ускорению репарации [ 23,41]. Результаты исследований, представленные в табл. 14, показывают, что мазь серпистана обладает низкой осмотической активностью.

Таблица 14.

#### Осмотическая активность мазовой композиции серпистана

Объект исследования	Абсорбировано жидкости, %	Время абсорбции, час.
10% раствор натрия хлорида (контроль)	21,4 ± 3,2	2
Мазь серпистана	15,5 ± 2,0	12

Таким образом, в ходе проведенного комплекса работ по оптимизации мазовой композиции серпистана выбран состав мази серпистен 0,02%. Комплекс проведенных исследований позволил экспериментально и теоретически обосновать композицию мази серпистана и ее технологию. Ниже приведены технологическая схема (рис. 12) и описание основных вспомогательных и технологических стадий получения МЛФ серпистана.

### 3.5. Разработка технологической схемы получения мази серпистана

Технологическая схема получения 0,02 % мази серпистана включает следующие стадии:

ВР-1. Подготовки воды очищенной.

ВР-2. Подготовка компонентов.

На весах лабораторных с ценой деления 0,001 отвешивали рассчитанное количество серпистана. На 100 г мази необходимо 20 мг серпистана. Далее навеску растворяли в 1 мл спирта этилового 40%.

ТП-3. Приготовление мазовой основы

На весах лабораторных с ценой деления 0,001 отвешивали необходимое количество вазелина, вазелинового масла и Т-2. На 100 г мази необходимо вазелина и вазелинового масла – по 23,0 г и Т-2 3,0. В емкость для плавления основы загружали Т-2, вазелин и вазелиновое масло, плавил в течение 20 мин при температуре в пределах от 60 °С до 70 °С. Нагрев емкости осуществляли на бане водяной лабораторной с электрическим подогревом. Температуру в водяной бане контролировали термометром. Полноту плавления контролировали визуально по отсутствию нерасплавленных кусков.

На весах лабораторных с ценой деления 0,001 отвешивали 3,0 г аэросила и заливали 50 мл воды очищенной. Полученную суспензию аэросила добавляли в емкость с гидрофобной массой и перемешивали до получения однородной мазевой основы в течение 1 ч. Полученную мазевую массу в горячем виде фильтровали через два слоя марли с помощью воронки в чистые, термостойкие емкости. Чистоту фильтратов контролировали визуально на отсутствие посторонних механических включений. С целью структурирования мазевой основы, ее выдерживали при температуре  $(25\pm 2)$  °С в течение 24 ч.

### ТП-3. Получение мази

В емкость для приготовления мазевой композиции, подогретую до температуры  $(40\pm 2)$  °С с последующим термостатированием, загружали примерно половину предварительно расплавленной основы и 1 мл 2 % спиртового раствора серпистена. Смесь перемешивали до образования однородной массы. Контроль равномерного распределения серпистена в расплавленном концентрате осуществляли визуально по достижению однородной окраски основы. К концентрату в два приема при постоянном перемешивании добавляли оставшуюся расплавленную основу, необходимую для достижения требуемой массы мази. Гомогенизацию мази осуществляли путем протираания через трехвальцовую мазетерку. С целью структурирования мази, ее выдерживали при температуре  $(25\pm 2)$  °С в течение 24 ч.

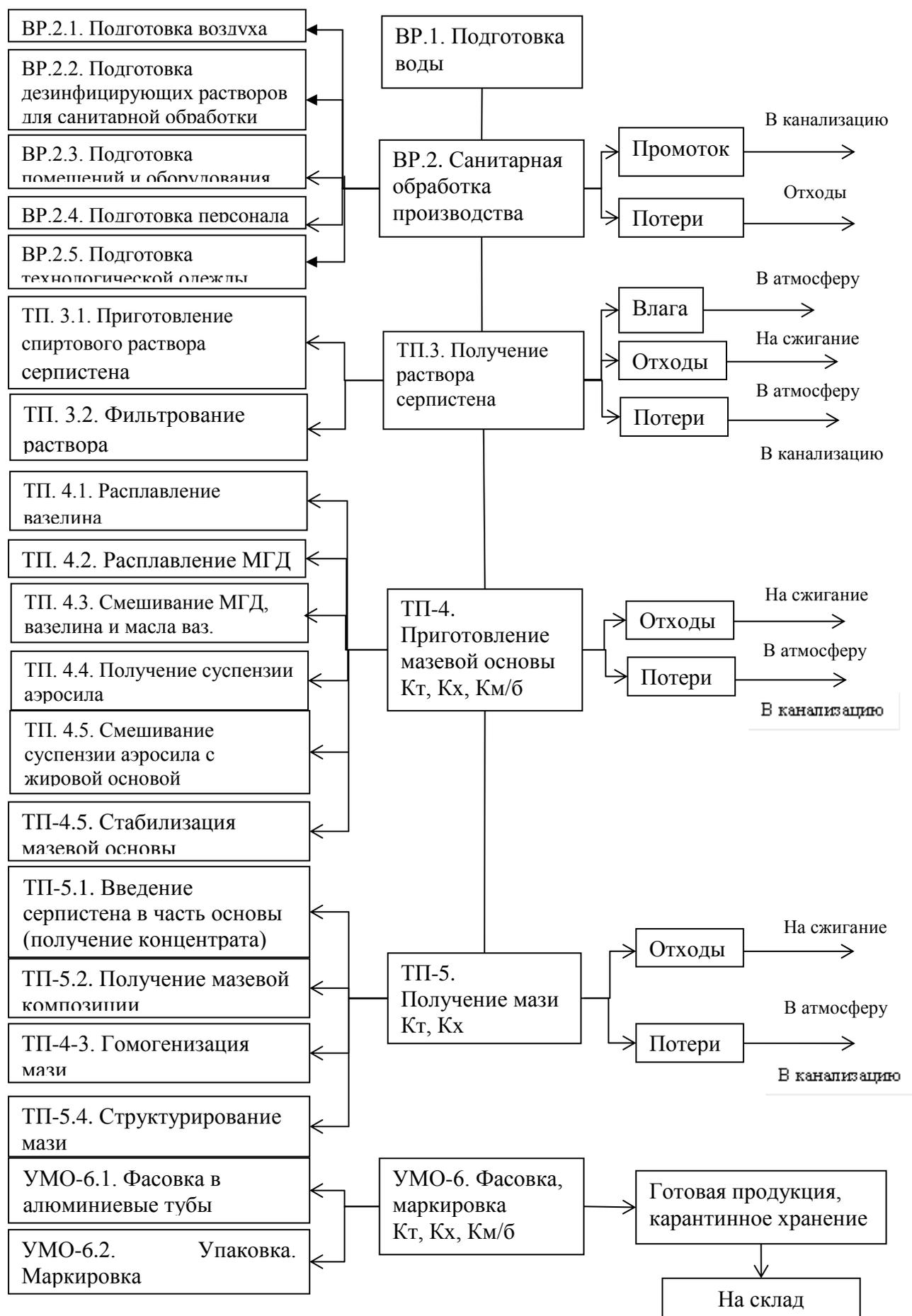


Рис. 12. Технологическая схема производства 0,02% мази серпистана.

Приготовленную мазь перед фасовкой перемешивали 10 минут. Мазь фасовали по 30 г в тубы алюминиевые с мембраной по ТУ 9467-004-32807885-2008 с внутренним лаковым покрытием.

Контроль готового продукта проводили по следующим показателям: описание, подлинность, количественное определение.

Перечень контролируемых параметров (далее КП) технологического процесса производства представлен в табл. 15.

Таблица 15.

Перечень контролируемых параметров технологического процесса  
производства

КП	Наименование этапа	Контролируемый показатель
КП-1	ВР-2. Подготовка компонентов.	Контроль спиртового раствора: -максимум поглощения при $(250\pm 2)$ нм;
КП-2	ТП-3. Приготовление мазевой основы.	Контроль мазевой основы: - рН=5,8-6,3; - реопараметры в пределах оптимума.
КП-3	ТП-4. Получение мази	Контроль мази в производственном подразделении: - рН=5,8-6,3; - реопараметры в пределах оптимума;
КП-4	УМО-5. Фасовка, маркировка	Средняя масса мази $(30,0\pm 1,5)$ г
КП-5	Контроль готовой продукции	Контроль препарата в лаборатории: -органолептические свойства; Подлинность; - рН=5,8-6,3; - средняя масса мази $(30,0\pm 1,5)$ г; - микробиологическая чистота (категория 2А).

На основании проделанных исследований разработан лабораторный регламент на производство 0,02 % мази серпистена, который с положительным результатом апробирован в условиях технологической лаборатории исследовательского отдела ОАО «Татхимфармпрепараты» (г. Казань). Акт апробации приведен в приложении 1.

### 3.6. Качественное и количественное определение серпистена в субстанции и в лекарственной форме

Для стандартизации мази, определения срока годности и подготовки нормативной документации необходимо разработать метод качественного и количественного определения серпистена в МЛФ.

Для определения подлинности серпистена в МЛФ использован метод спектрофотометрии [34]. Спектр поглощения в воде и водно-спиртовом растворе, полученные при извлечении серпистена из мази, оказались идентичным спектру поглощения РСО серпистена (рис. 13, 15).

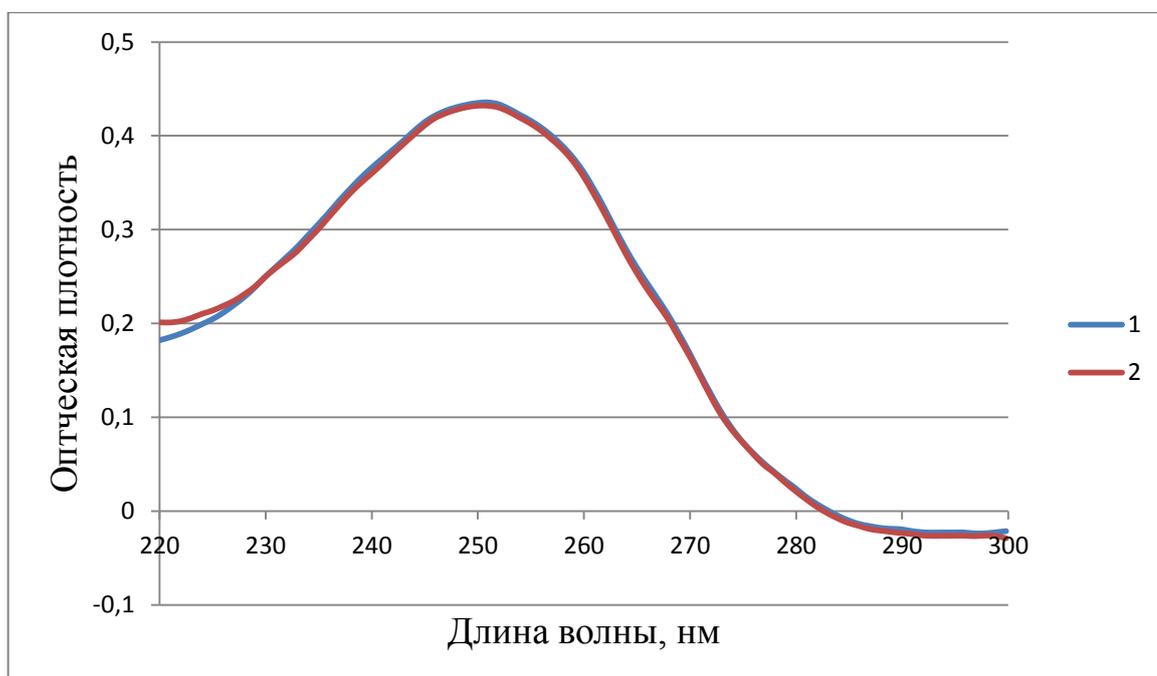


Рис. 13. Спектр поглощения водно-спиртового (1) и водного (2) раствора мази с серпистеном.

Специфичность методики качественного и количественного определения серпистена подтверждена методом ВЭЖХ. Хроматограмма водного раствора,

полученного при извлечении серпистена из мази, имеет один основной пик со временем удерживания 3,25 мин, что соответствует времени удерживания 20-гидроксиэкдизона (рис. 14).

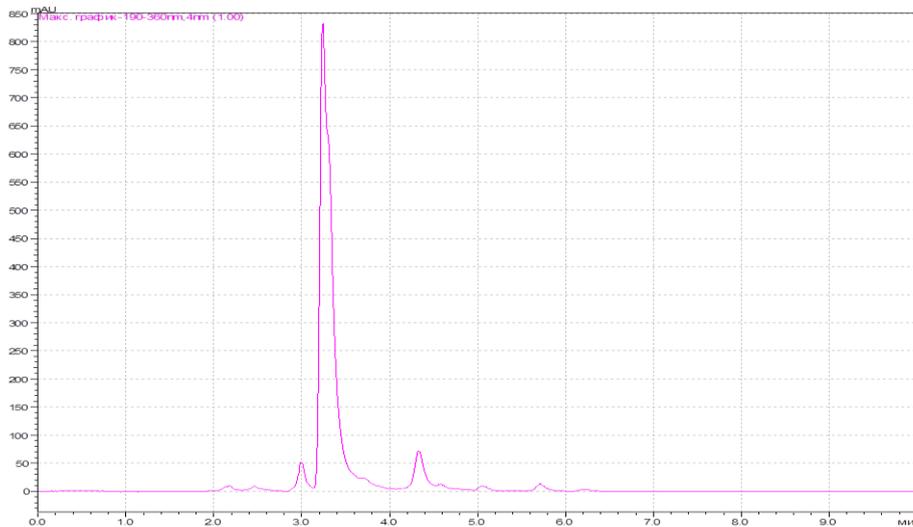


Рис. 14. Хроматограмма водного извлечения серпистена.

На начальном этапе для установления аналитической длины волны сняты спектры поглощения в УФ-области водных растворов серпистена в концентрациях 5; 10; 25 и 100 мкг/мл. Спектры поглощения серпистена приведены на рис. 15.

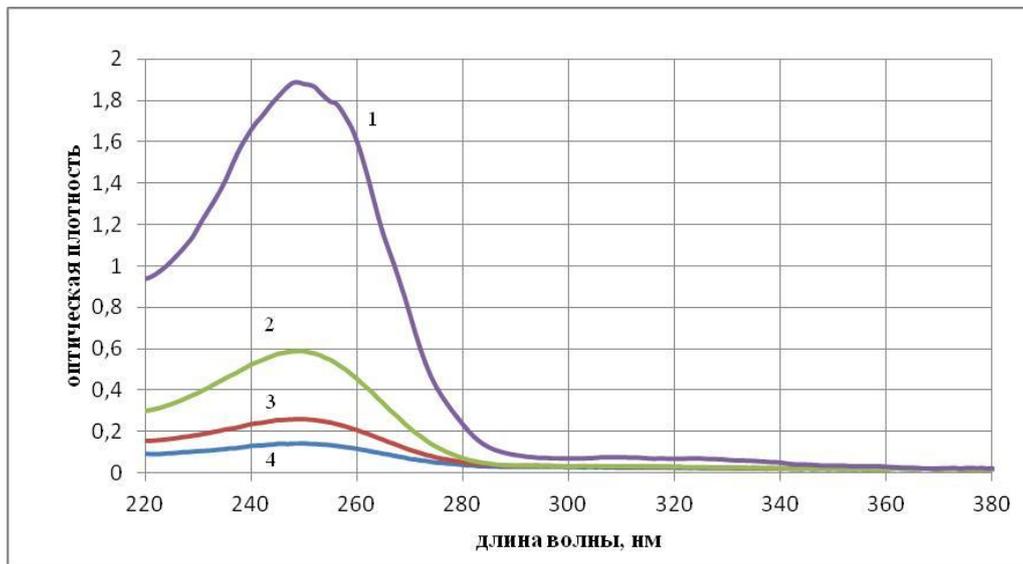


Рис. 15. Спектр поглощения водных растворов серпистена:

- 1 – содержание серпистена 100 мкг/мл;
- 2 – содержание серпистена 25 мкг/мл;
- 3 – содержание серпистена 10 мкг/мл;
- 4 – содержание серпистена 5 мкг/мл.

Таким образом, спектрофотометрия в УФ области может быть использована для стандартизации МЛФ серпистена, так как в области 220 – 380 нм наблюдается выраженный максимум светопоглощения при длине волны  $\lambda = (250 \pm 2)$ .

На следующем этапе определены границы подчинения основному закону светопоглощения. С этой целью готовились 5 растворов РСО серпистена с концентрациями от 5 до 25 мкг/мл, в которых замерялась оптическая плотность. Опыт проводили не менее 3 раз (рис.16).

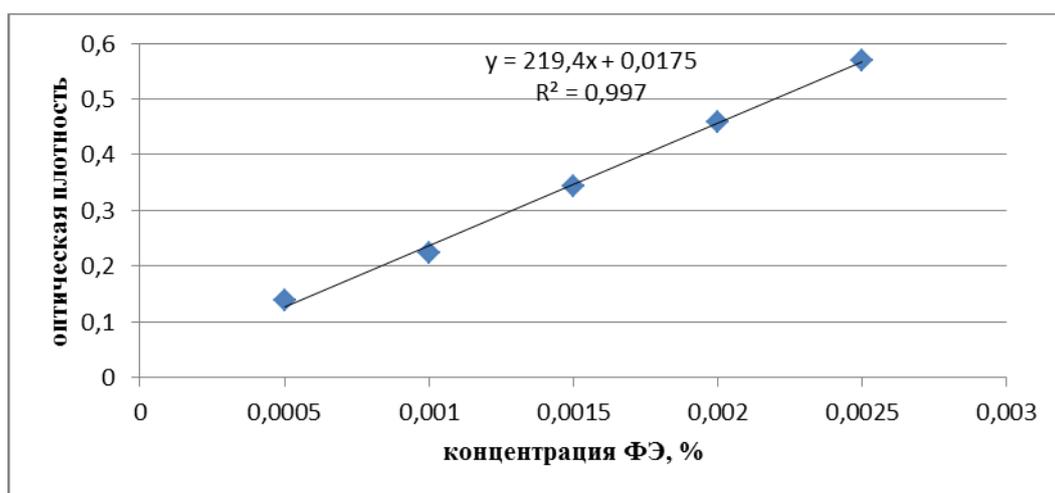


Рис. 16. График зависимости оптической плотности серпистена от концентрации.

Критерием приемлемости линейности аналитической методики являлся коэффициент корреляции. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,99. В результате проведенной работы выявлена зависимость оптической плотности серпистена от концентрации, выражающаяся уравнением  $Y=219X+0,0175$ , при этом коэффициент корреляции составил 0,997, прямая с тангенсом угла наклона 219,4 пересекается с осью ординат в точке 0,0175.

Для оценки критерия статистической незначимости свободного члена уравнения корреляции согласно ОФС 42-0111-09 использовано следующее неравенство:

$$|a| \leq t(95\%, f) * s, \text{ где}$$

$t$  – коэффициент Стьюдента для одностороннего распределения, доверительной вероятности 95 % и числа степеней свободы  $f = n - 2$ ;

$s$  – стандартное отклонение.

Т. к.  $0,0175 \leq 12,71 \cdot 0,0015$ , то свободный член статистически незначимо отличается от нуля.

Таким образом, расчет содержания серпистена в лекарственной форме можно осуществлять методом абсолютной калибровки или с использованием калибровочного графика рабочего стандартного образца серпистена.

С целью подбора оптимального способа экстракции серпистена из мази исследовано несколько режимов экстракции.

1 режим. В химический стакан помещали 3,0 г мази, добавляли около 25 мл воды очищенной, энергично встряхивали в течение 15 мин при комнатной температуре. По истечении времени извлечения серпистена из мази, химический стакан с раствором мази помещали в морозильную камеру на 15 мин, для того чтобы вспомогательные вещества выпали в осадок. Перед определением оптической плотности пробы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Доводили объем до 25 мл водой очищенной. На спектрофотометре снимали показания оптической плотности испытуемого раствора при аналитической длине волны в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор мазевой основы.

2 режим. Аналогичен 1 режиму с тем лишь отличием, что использовали спирт 40% (по объему).

3 режим. В химический стакан помещали 3,0 г мази, добавляли около 25 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 15 мин. По истечении времени извлечения серпистена из мази, химический стакан с раствором мази помещали в морозильную камеру на 15 мин. Перед определением оптической плотности пробы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Доводили объем до 25 мл водой очищенной. На спектрофотометре снимали показания оптической плотности испытуемого раствора при аналитической длине волны в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор мазевой основы.

4 режим. Аналогичен 3 режиму с тем лишь отличием, что использовали спирт 40% (по объему).

5 режим. В химический стакан помещали 3,0 г мази, добавляли около 15 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 10 мин. Надосадочную жидкость декантировали и помещали в морозильную камеру на 15 мин. К осадку добавляли около 10 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 5 мин. Затем химический стакан с раствором мази помещали в морозильную камеру на 15 мин. Перед определением оптической плотности обе вытяжки фильтровали через один мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Вытяжки объединяли и доводили объем до 25 мл водой очищенной. На спектрофотометре снимали показания оптической плотности испытуемого раствора при аналитической длине волны в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор мазевой основы.

6 режим. Аналогичен 5 режиму с тем лишь отличием, что использовали спирт 40% (по объему).

Изначально нами сняты УФ-спектры поглощения водных и водно-спиртовых извлечений основы мази, результаты отражены на рис. 17.

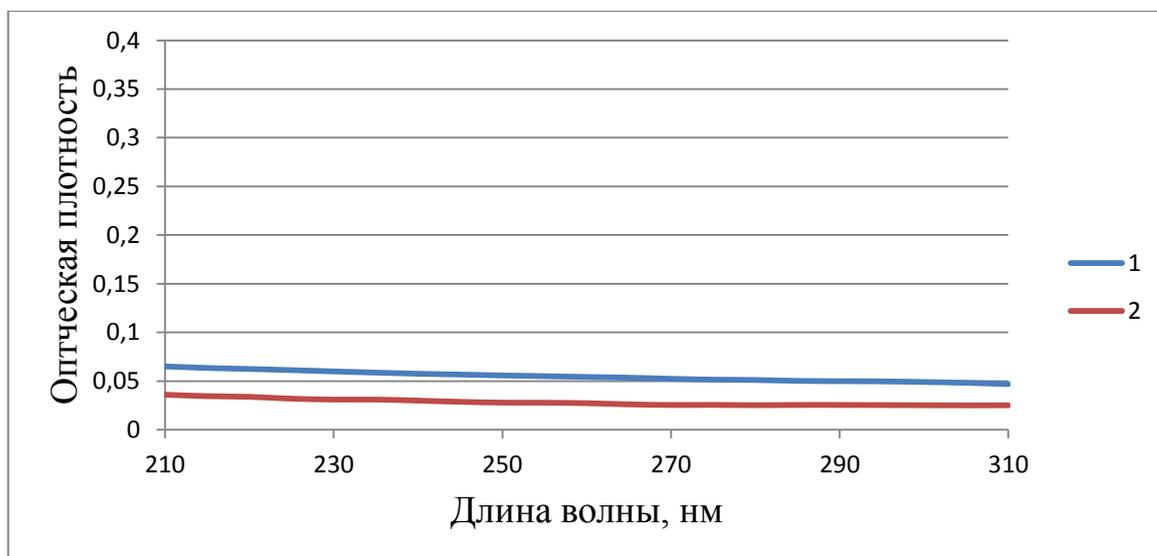


Рис. 17. Спектр поглощения водно-спиртового (1) и водного (2) раствора основы мази.

Из рис. 17 видно, что компоненты основы не мешают качественному и количественному определению серпистина в лекарственной форме. При

аналитической длине волны 250 нм поглощение основы мази не превышает 0,028 для водного раствора и 0,056 – для спиртового.

Результаты сравнительной оценки режимов количественного определения серпистена в МЛФ сведены в табл. 16.

Таблица 16.

Результаты количественного определения серпистена в мази методом УФ-спектрофотометрии

Режим	Навеска мази	Введено серпистена, мкг	Оптическая плотность раствора	Найдено серпистена, мкг	Оценка открываемости серпистена, %
1	3,125	625	0,3366	363	58,00
	3,080	616	0,3528	382	62,00
	3,135	627	0,2643	282	45,00
	3,214	643	0,3417	367	57,00
2	3,126	625	0,2940	313	50,10
	3,208	642	0,3370	359	55,96
	3,157	632	0,3020	322	50,95
3	3,125	625	0,4320	460	73,63
	3,223	645	0,4330	461	71,55
	3,160	632	0,4290	457	72,30
4	3,124	625	0,3362	358	57,30
	3,126	625	0,3786	403	64,52
	3,127	626	0,3515	375	59,44
	3,122	625	0,2454	262	41,87
5	3,158	632	0,4952	528	83,52
	3,119	624	0,4896	522	83,60
	3,148	630	0,4929	525	83,39
6	3,121	624	0,4446	474	75,87
	3,124	625	0,4699	501	80,11
	3,148	630	0,4536	483	76,74

Анализируя полученные данные, установлено, что выход серпистена из мази происходит полнее при температуре диализа 60 °С независимо от растворителя. Повторное экстрагирование навески мази чистым растворителем (режимы 5 и 6) приводит к увеличению содержания серпистена в извлечении, чем в случае однократной экстракции (режимы 3 и 4). В то же время открываемость серпистена не достигла 100 % значения: в случае экстракции водой данный параметр достиг значения 83,60%, в случае экстракции 40% спиртом этиловым – 80,11%.

На следующем этапе разработки нами снижена навеска мази с 3,125 г до 2,0 для достижения более полной открываемости серпистена. Результаты определения содержания серпистена представлены в табл. 17.

Таблица 17.

Параметры количественного определения серпистена в мази

Режим	Навеска мази	Введено серпистена, мкг	Оптическая плотность раствора	Найдено серпистена, мкг	Оценка открываемости серпистена, %
5	1,996	399,2	0,3752	399,7	100,12
	1,998	399,6	0,3730	397,3	99,43
	1,991	398,2	0,3609	384,4	96,53
	1,998	399,6	0,3843	409,3	102,44
	1,974	394,8	0,3554	377,9	95,72
M±m					98,85±3,41
6	2,013	402,6	0,3523	375,3	93,21
	2,016	403,2	0,3619	385,5	95,61
	1,978	395,6	0,3569	380,2	96,10
	1,982	396,4	0,3587	382,1	96,39
M±m					95,33±2,30

Уменьшение навески мази приводит к более полной открываемости серпистена в МЛФ: с 83,6% до 98,85% для режима 5 и с 77,57% до 95,33% для

режима 6. Относительная погрешность измерения для режима 5 составляет 3,40%, а для режима 6 – 2,30%. На основании проведенной работы установлено, что наиболее полная открываемость серпистена отмечается при использовании режима 5.

Для доказательства правильности предлагаемой методики получены и проанализированы модельные мазевые композиции с концентрацией серпистена 90 и 110% от номинальной (0,018 и 0,022 % соответственно). Результаты исследования представлены в табл. 18.

Таблица 18.

Оценка правильности методики количественного определения серпистена в мази

Введено серпистена (мкг/мл)	Оптическая плотность раствора	Найдено серпистена (мкг/мл)	Оценка открываемости серпистена, %	Метрологические характеристики
358,4	0,3392	353,8	98,72	$S^2 = 2,79; S = 1,67; S_{\bar{x}} = 0,96;$ $\bar{\epsilon} = 4,19\%;$ $t(95\%; 2) = 4,30.$
359,1	0,3428	361,3	100,61	
359,8	0,3305	350,0	97,28	
$M \pm m$			98,87 $\pm$ 4,15	
399,2	0,3752	399,7	100,12	$S^2 = 7,50; S = 2,74; S_{\bar{x}} = 1,23;$ $\bar{\epsilon} = 3,44\%;$ $t(95\%; 4) = 2,78.$
399,6	0,3730	397,3	99,43	
398,2	0,3609	384,4	96,53	
399,6	0,3843	409,3	102,44	
394,8	0,3554	377,9	95,72	
$M \pm m$			98,85 $\pm$ 3,41	
439,4	0,4072	442,8	100,77	$S^2 = 8,11; S = 2,85; S_{\bar{x}} = 1,64;$ $\bar{\epsilon} = 7,25\%;$ $t(95\%; 2) = 4,30.$
440,9	0,4174	438,0	95,61	
443,5	0,4256	434,9	96,10	
$M \pm m$			97,49 $\pm$ 7,07	

Правильность методики оценивали посредством решения следующего неравенства (ОФС 42-0113-09):  $|\bar{Z}-100| \leq \frac{\Delta z}{\sqrt{n}}$ , где

$\bar{Z}$  – среднее значение степени извлечения, рассчитанное для всех растворов;

$\Delta z$  – односторонний доверительный интервал, находимый по формуле:

$\Delta z = S_z * t(P, f)$ , где

$S_z$  – относительное стандартное отклонение, выраженное в процентах, рассчитанное для отношений «найдено : введено» для всех растворов. Решая оба уравнения, получили:

$$|98,49-100| \leq \frac{2,36*2,23}{\sqrt{11}}.$$

Таким образом, систематическая погрешность измерений статистически неотличима от нуля, что говорит о правильности и сходимости предлагаемой методики.

Для оценки прецизионности методики найдено значение суммарной неопределенности спектрофотометрического анализа на основе литературных данных, обобщенных в табл. 19 [66].

Таблица 19.

Значения неопределенности спектрофотометрического определения серпистена в мази

Источник неопределенности	Значение неопределенности, %
Взвешивание серпистена 0,02	1
Взвешивание мази серпистена	0,01
Мерная колба объемом 25 мл	0,17
Мерная колба объемом 100 мл	0,12
Пипетка объемом 2 мл	0,6
Методика спектрофотометрического анализа	0,2
Кювета	0,1

Исходя из значений, суммарная неопределенность результатов анализа равна 1,70%. В ходе статистического анализа выяснилось, что аналитическая методика удовлетворяет неравенству:

$$\frac{S_z * t(P,f)}{\sqrt{n}} \leq \Delta A_s, \text{ где}$$

$S_z$  – относительное стандартное отклонение, выраженное в процентах, рассчитанное для отношений «найдено : введено» для всех растворов;

$\Delta A_s$  – суммарная неопределенность результатов анализа.

Подставляя полученные значения в формулу получили:

$$1,59 \leq 1,70.$$

Таким образом, разработанная методика количественного определения серпистена в МЛФ обладает следующим набором валидационных характеристик: специфичностью, линейностью, правильностью, прецизионностью. Методика анализа серпистена в мази изложена в главе 2 и использована при составлении проекта ФСП на 0,02 % мазь серпистена (приложение 4).

### **3.7. Стабильность мази серпистена**

Изучение стабильности мази серпистена проводилось на образцах, которые были заложены на хранение при температуре (12-15) °С. Стабильность образцов мази оценивалось после 6 мес., 12 мес., 18 мес., 24 мес. и 30 мес. хранения. Критериями оценки стабильности являлись внешний вид, рН мази, эффективная вязкость, подлинность и количественное содержание серпистена. Результаты анализа технологических параметров мази серпистена приведены в табл. 20 и на рис. 18.

Результаты стабильности состава мази серпистена сроком хранения 6, 12, 18, 24 и 30 месяцев

Время хранения, мес.	Внешний вид	pH	Коллоидная стабильность	Подлинность
0	Мягкая, однородная масса от белого до бледно желтовато-белого цвета с характерным запахом	5,8-5,9	Стабилен	Соответствует
6	Не изменился	5,7-6,1	Стабилен	Соответствует
12	Не изменился	5,7-6,1	Стабилен	Соответствует
18	Не изменился	5,6-6,2	Стабилен	Соответствует
24	Не изменился	5,6-6,2	Стабилен	Соответствует
30	Не изменился	5,6-6,2	Стабилен	Соответствует

Как видно из табл. 20, наработанные серии мази серпистена стабильны в течение всего наблюдаемого промежутка времени.

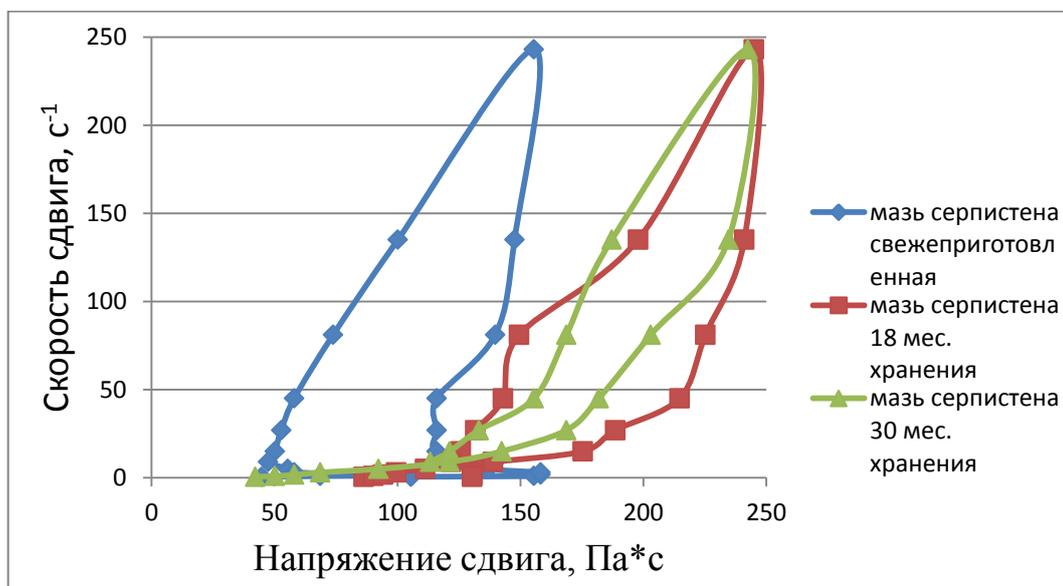


Рис. 18. Реограммы течения мазей серпистена.

Из рис. 18 видно, что при хранении мазь серпистена приобретает более плотную консистенцию. По истечении 6 мес. не наблюдается уменьшения площади петли гистерезиса, что говорит о сохранности внутренней структуры. К

концу наблюдения отмечается небольшое уменьшение площади петли гистерезиса. Результаты количественного определения серпистена в МЛФ представлены в табл. 21.

Таблица 21.

Количественное определение серпистена в мази после 6 и 24 месяцев хранения

Срок хранения мази, мес.	Навеска мази, г	Оптическая плотность	Содержание серпистена в 1 г мази, мг	Метрологические характеристики
6	1,990	0,3770	0,201	$S^2 = 1,0 \cdot 10^{-5}$ ; $S = 0,003$ ; $S_{\bar{x}} = 0,002$ ; $\bar{\varepsilon} = 4,02\%$ ; $t(95\%; 2) = 4,30$ .
	2,016	0,3735	0,195	
	2,020	0,3817	0,200	
$M \pm m$ , мг				$0,199 \pm 0,008$
12	2,035	0,3630	0,190	$S^2 = 3,0 \cdot 10^{-5}$ ; $S = 0,006$ ; $S_{\bar{x}} = 0,003$ ; $\bar{\varepsilon} = 7,00\%$ ; $t(95\%; 2) = 4,30$ .
	2,025	0,3728	0,195	
	2,026	0,3831	0,201	
$M \pm m$ , мг				$0,195 \pm 0,014$
18	2,023	0,3701	0,193	$S^2 = 1,0 \cdot 10^{-5}$ ; $S = 0,003$ ; $S_{\bar{x}} = 0,002$ ; $\bar{\varepsilon} = 4,06\%$ ; $t(95\%; 2) = 4,30$ .
	1,992	0,3786	0,198	
	2,009	0,3825	0,199	
$M \pm m$ , мг				$0,197 \pm 0,008$
24	1,990	0,3657	0,191	$S^2 = 1,3 \cdot 10^{-5}$ ; $S = 0,004$ ; $S_{\bar{x}} = 0,002$ ; $\bar{\varepsilon} = 4,61\%$ ; $t(95\%; 2) = 4,30$ .
	2,010	0,3681	0,193	
	2,028	0,3779	0,198	
$M \pm m$ , мг				$0,194 \pm 0,009$
30	2,005	0,3717	0,194	$S^2 = 1,0 \cdot 10^{-6}$ ; $S = 0,001$ ; $S_{\bar{x}} = 0,0006$ ; $\bar{\varepsilon} = 1,28\%$ ; $t(95\%; 2) = 4,30$ .
	2,011	0,3700	0,193	
	1,992	0,3739	0,195	
$M \pm m$ , мг				$0,194 \pm 0,002$

Результаты количественного определения показывают, что содержание серпистена достоверно не уменьшается ( $p = 0,416$ ) в течение всего времени наблюдения.

Таким образом, оценка стабильности позволила для мази серпистена установить срок годности 2 года при температуре (12-15) °С. Учитывая низкое содержание серпистена в МЛФ и относительно высокую погрешность измерения, нами предлагается отклонение в 10% при определении серпистена в МЛФ.

На основании проделанной работы составлен проект ФСП на 0,02 % мазь серпистена (приложение 4), который апробирован в условиях технологической лаборатории исследовательского отдела ОАО «Татхимфармпрепараты» (г. Казань).

### **Выводы по главе 3**

1. Проведен комплекс исследований по подбору и оптимизации состава 0,02 % мази серпистена, которая обладает оптимальными физико-химическими, технологическими, структурно-механическими и биофармацевтическими параметрами, что обеспечивает максимальную эффективность лекарственного препарата;
2. На основании комплекса проведенных исследований разработана рациональная технологическая схема мази серпистена;
3. Разработана и провалидирована методика стандартизации мази серпистена с помощью спектрофотометрии в УФ-области. Подобраны параметры пробоподготовки и условия проведения анализа, позволяющего достигнуть открываемости серпистена в мази ( $98,85 \pm 3,41$ ) %.
4. Изучение стабильности мази серпистеном позволило установить срок годности 24 месяцев при температуре (12-15) °С.
5. Составлены проект фармакопейной статьи предприятия на мазь серпистена и проект лабораторного регламента на его производство, которые с положительным результатом апробированы в условиях технологической лаборатории исследовательского отдела ОАО «Татхимфармпрепараты» (г. Казань).

## ГЛАВА 4. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ СЕРПИСТЕНА

В работе А. Meubeck показал, что включение в липосомы экстракта *Polipodium vulgare*, содержащего фитоэкдистероиды, приводит к более выраженному усилению регенерации кожи [154]. В исследовании Н. К. Политовой описана технология липосом с включенным 20-гидроксиэкдизоном [92]. Она получала большие мультиламеллярные липосомы (БМЛ) методом дегидратации/регидратации, гомогенизацию грубой липосомальной эмульсии проводила с помощью экструдера. Полученные при этом малые однослойные липосомы (МОЛ) со средним диаметром 70-90 нм имели низкую степень включения 20-гидроксиэкдизона – около 6%. Полученные результаты делают актуальным дальнейшие исследования по созданию липосом с фитоэкдистероидами с целью их усовершенствования.

Обобщение литературных данных позволило нам разработать алгоритм получения липосомального геля серпистена (рис. 19).

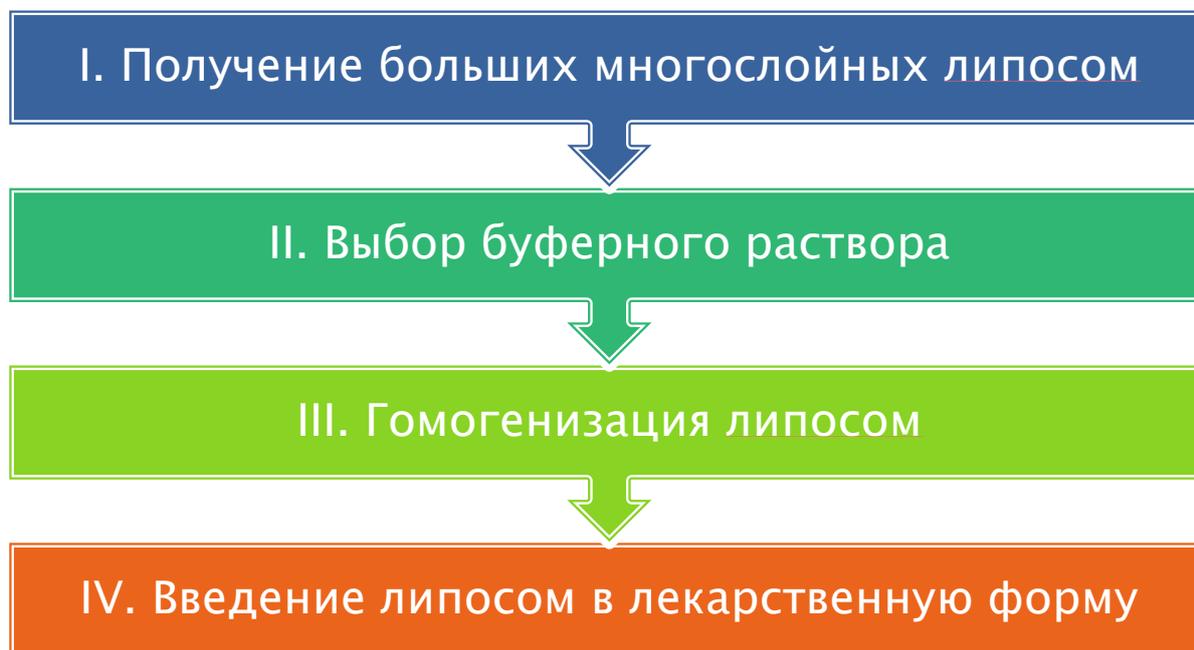


Рис. 19. Алгоритм создания ЛФ с липосомами.

На первой стадии проводится контроль качества фосфолипида и выбор методики получения БМЛ с учетом физико-химических свойств действующего

вещества. В качестве фосфолипида использован яичный лецитин. Для уплотнения липосомальной стенки в композицию введены холестерол и  $\beta$ -ситостерин.

На второй стадии осуществляется подбор буферного раствора и соотношения фосфолипид-действующее вещество и оценивается стабильность полученных липосом по показателям: средний диаметр липосом, дзета-потенциал и индекс полидисперсности.

На стадии получения МОЛ подбирается метод и режим гомогенизации. Наиболее рационально в качестве метода гомогенизации использовать ультразвуковую обработку благодаря своей простоте и отсутствию дорогостоящего оборудования, работающего под высоким давлением [87, 119]. Определены критические значения мощности ультразвуковой обработки (не более 200 Вт), режима озвучивания (5 мин озвучивания с последующей 15 мин выдержкой) и количества циклов озвучивания (не более 7). Превышение этих значений приводит к ускорению перекисного окисления липидов и увеличения числа нестабильных липосом с диаметром менее 40 нм [87].

Для технологического контроля представляет интерес использование в работе фотометрического показателя дисперсности, позволяющего эффективно оценить диаметр липосом во время и по окончании гомогенизации [27].

Качество полученных МОЛ определяется по степени включения действующего вещества и его «утечки» из липосом при хранении.

На завершающей стадии осуществляется процесс введения липосомальной суспензии в состав ЛФ (геля) и стандартизация готового лекарственного препарата.

#### **4.1. Оценка качества исходного сырья лецитина-стандарта по показателю «степень окисления»**

На начальном этапе работы проведена оценка качества яичного лецитина по показателю степень окисления, т. к. 10% спиртовой раствор лецитина легко подвергается перекисному окислению. В ФС 42У-200/20-285-97 отражено, что индекс окисления лецитина должен составлять не более 0,3 [90]. При высоких значениях критерия возможно разрушение липосомальных везикул в процессе

хранения, что может привести к снижению фармакологической активности препарата и к уменьшению срока годности [90].

Оценку индекса окисления лецитина проводили на спектрофотометре СФ-2000, согласно методике, описанной в главе 2. По результатам анализа трех партий яичного лецитина (табл. 22) установлено, что индекс окисления исходного яичного лецитина-стандарта находится в пределах  $0,081 \pm 0,009$ , что свидетельствует о соответствии качества лецитина требованиям ФС 42У-200/20-285-97. Это делает возможным его использование в качестве формообразователя липосом.

Таблица 22.

#### Оценка индекса окисления лецитина

№ партии	№ анализа	Оптическая плотность при 215 нм	Оптическая плотность при 233 нм	Индекс окисления лецитина
1	1	0,444	0,036	0,081
	2	0,447	0,041	0,092
2	3	0,445	0,038	0,085
	4	0,442	0,035	0,079
3	5	0,443	0,030	0,068
	$M \pm m$	$0,444 \pm 0,002$	$0,036 \pm 0,004$	$0,081 \pm 0,009$

#### 4.2. Выбор состава «пустых» липосом

В ходе предварительных испытаний установлено, что показатель растворимости серпистена в воде достигает 0,2 %. Это позволяет использовать метод гидратации тонкой липидной пленки, т. к. именно этот метод дает наибольшую степень включения водорастворимого действующего вещества во внутреннее ядро липосом [26, 35].

Для выбора оптимального буферного раствора получили 9 различных составов «пустых» липосом, которые представлены в табл. 23. Для уплотнения липосомальной стенки в композицию введены холестерол (составы 2, 4 и 8) и  $\beta$ -

ситостерин (составы 3, 6 и 9). Учитывая физико-химические свойства, нами использован хлороформ и спирт этиловый в соотношении 9 : 1 по объему. Концентрация фосфолипида (3,33 мг / мл) и соотношение между органическим растворителем и буферным раствором (1 : 3) выбраны на основе литературных данных. В качестве буферных растворов в работе апробированы буферы: трис-НСI (составы 1-3), ацетатный (составы 4-6) и фосфатный (составы 7-9), как наиболее часто используемые при получении липосомальных препаратов для наружного применения [126, 136, 150].

Таблица 23.

Составы исследуемых липосомальных композиций

№ состава	Буфер	Объем буфера, мл	pH	Лецитин, мг	Холестерол, мг	$\beta$ -ситостерин, мг	Объем органического растворителя, мл
1	трис-НСI	30	7,25	100	–	–	10
2	трис-НСI	30	7,25	100	20	–	10
3	трис-НСI	30	7,25	100	–	5	10
4	Ацетатный	30	5,5	100	20	–	10
5	Ацетатный	30	5,5	100	–	–	10
6	Ацетатный	30	5,5	100	–	5	10
7	Фосфатный	30	6,4	100	–	–	10
8	Фосфатный	30	6,4	100	20	–	10
9	Фосфатный	30	6,4	100	–	5	10

Водородные показатели буферных растворов имеют следующие значения: ацетатный – 5,5, фосфатный – 6,4 и трис-НСI – 7,25, что дает возможность оценить влияние pH на качество липосом.

Полученные методом гидратации тонкой липидной пленки БМЛ подвергались гомогенизации в ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия). После стадии гомогенизации оценка малых однослойных «пустых» липосом проведена

по параметрам: средний размер, индекс полидисперсности и дзета-потенциал. Значения диаметра «пустых» липосом составов 1-9 представлены на рис.20.

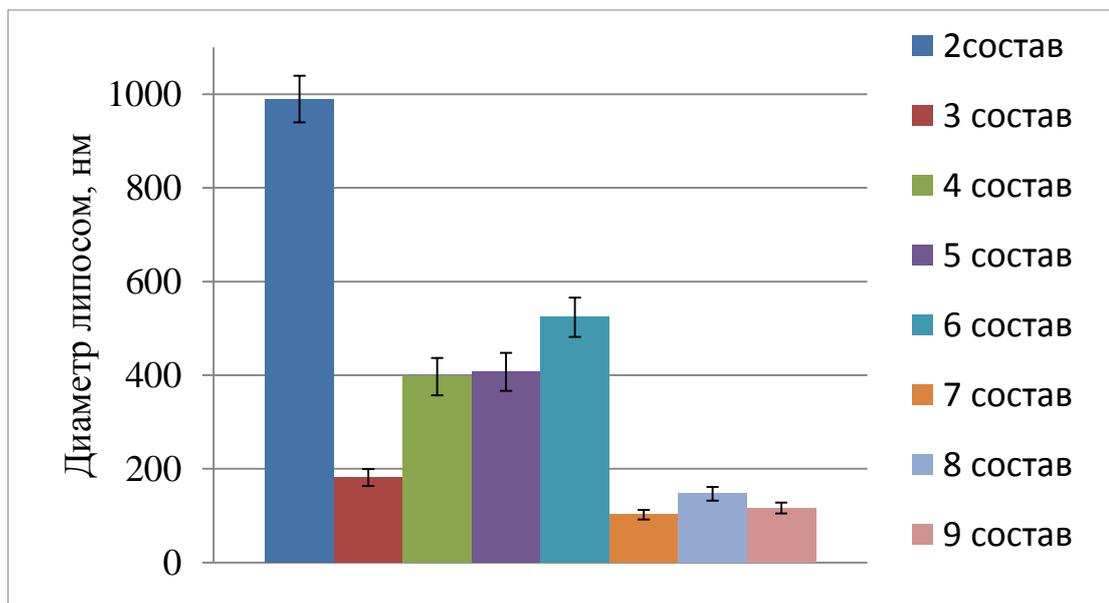


Рис. 20. Диаметр «пустых» липосом к концу озвучивания.

Из рис. 20 видно, что диаметр липосом после ресуспендирования в трис-HCl и ацетатном буферах значительно больше диаметра липосом в фосфатном буфере. Липосомы, полученные с использованием фосфатного буфера, обладают диаметром частиц от 102 до 147 нм. Наименьший диаметр отмечается в 7 составе.

Индекс полидисперсности характеризует гетерогенность системы, которая может колебаться от 0 (100% гомогенность) до 1,0 (100% гетерогенность). Значения индекса полидисперсности представлены на рис. 21.

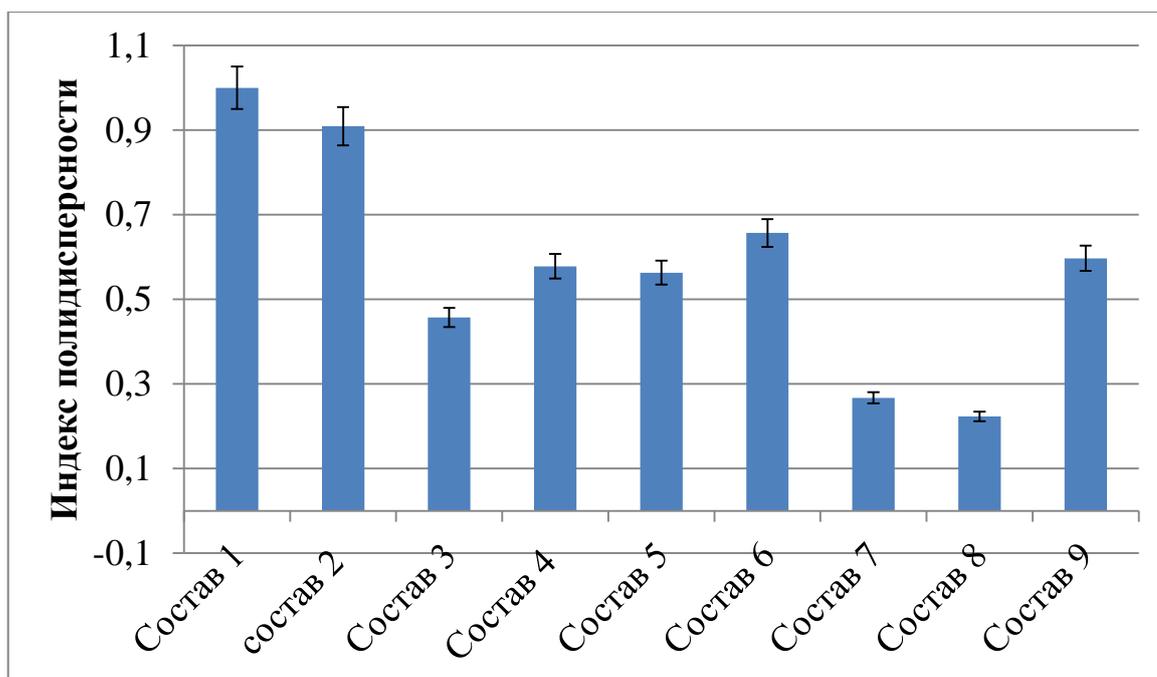


Рис. 21. Индекс полидисперсности «пустых» липосом.

Из рис. 21 видно, что составы 1 и 2 являются нестабильными системами с индексом полидисперсности больше 0,900 и при хранении быстро расслаиваются. В составы 3-6 и 9 исследуемый показатель находится в интервале 0,450-0,650, что свидетельствует о неоднородности состава, в суспензии присутствуют как маленькие, так и крупные везикулы. Однородные липосомальные суспензии, обладающие высокой седиментационной стабильностью, характеризуются индексом полидисперсности 0,3 и менее. Этому показателю удовлетворяли составы 7 и 8 (0,267 и 0,223 соответственно).

Результаты измерения  $\zeta$ -потенциала составов 1-9 отражены на рис. 22. Нестабильные состояния, характеризующие составы 1, 5 и 6, не позволили определить данный параметр.

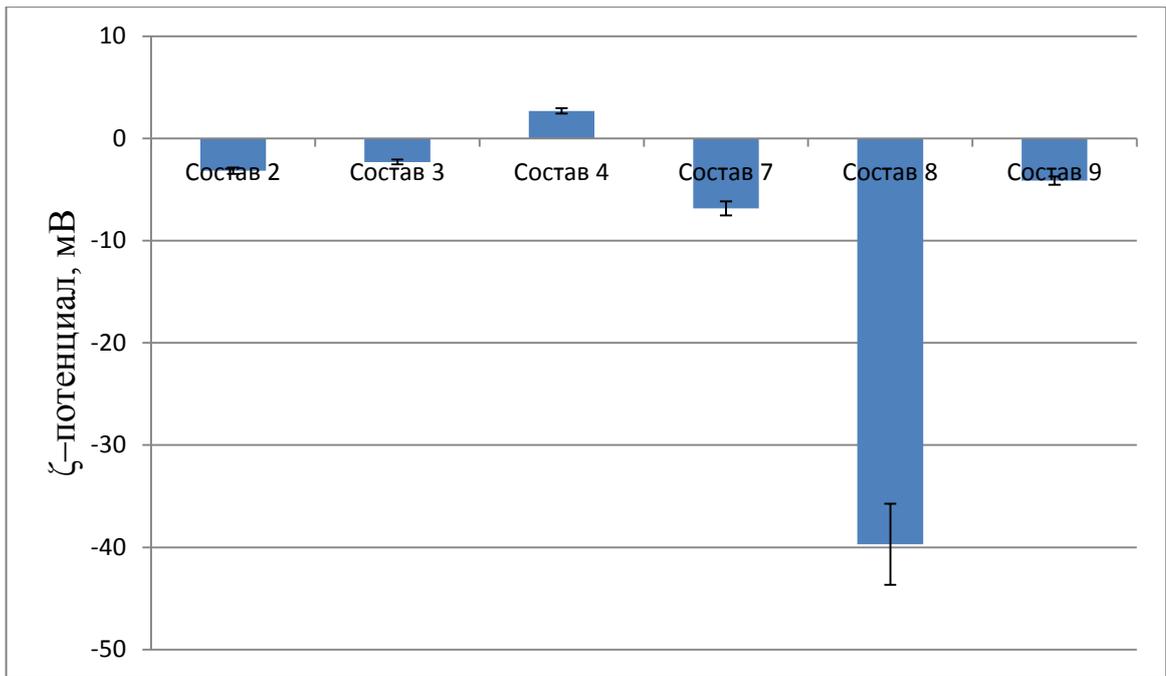


Рис. 22. ζ-потенциал «пустых» липосом к концу озвучивания.

Анализ полученных результатов показал, что природа буферного раствора влияет на заряд липосомальной мицеллы, так, в трис-НСI и фосфатном буфере они имеют отрицательный заряд, а в ацетатном буфере – положительный. ζ-потенциал в составах 2, 3 и 4 не превышает значения по модулю 3 мВ, что говорит о нестабильности липосом. Использование фосфатного буфера обеспечивает получения более стабильных липосом: в составах 7 и 9 составов ζ-потенциал составляет -7 мВ, а в 8 составе равен -40 мВ. Таким образом, на основании проведенных испытаний установлено, что из трех исследованных буферных систем, наиболее подходящим является фосфатный буферный раствор с рН=6,4 (составы 7-9).

Полученные данные позволяют предположить, что использование фосфатного буфера и холестерина в составе 8 оказывает существенное влияние на увеличение поверхностного заряда мицеллы.

Таким образом, для дальнейших исследований выбраны составы 7-9, полученные с использованием фосфатного буфера.

### 4.3. Ультразвуковая обработка «пустых» липосомальных композиций

Для установления рационального количества циклов гомогенизации БМЛ нами в составах 7-9 до начала гомогенизации и после каждого цикла отбирались аликвоты, в которых определялись диаметр липосом, индекс полидисперсности и  $\zeta$ -потенциал.

Динамика изменения диаметра липосом показана на рис. 23.

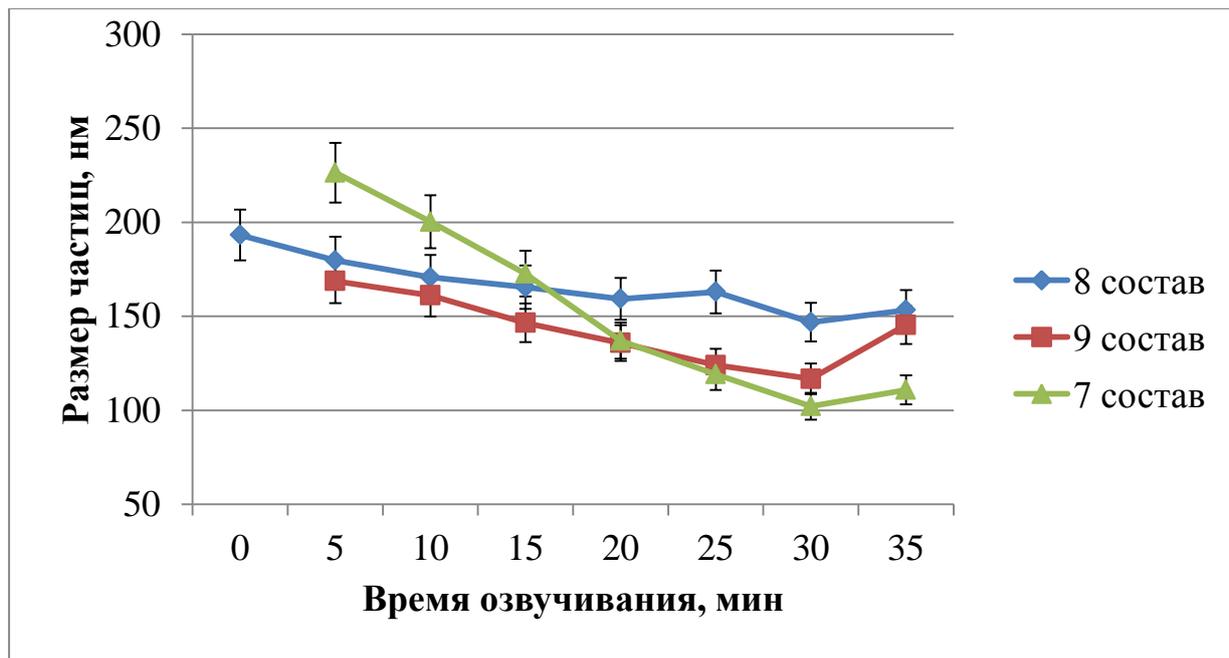


Рис. 23. Зависимость диаметра липосом от времени озвучивания.

Перед началом озвучивания диаметр БМЛ составов 7 и 9 превышал 1,5 мкм, а в составе 8 – находился в пределах 200 нм. В течение первого цикла гомогенизации диаметр липосом в составах 7 и 9 уменьшался до значений 226 и 169 нм соответственно.

При этом, наименьший диаметр липосом во всех составах отмечался к 30 минуте озвучивания (после 6 циклов). Дальнейшее озвучивание к уменьшению размера липосом не приводило.

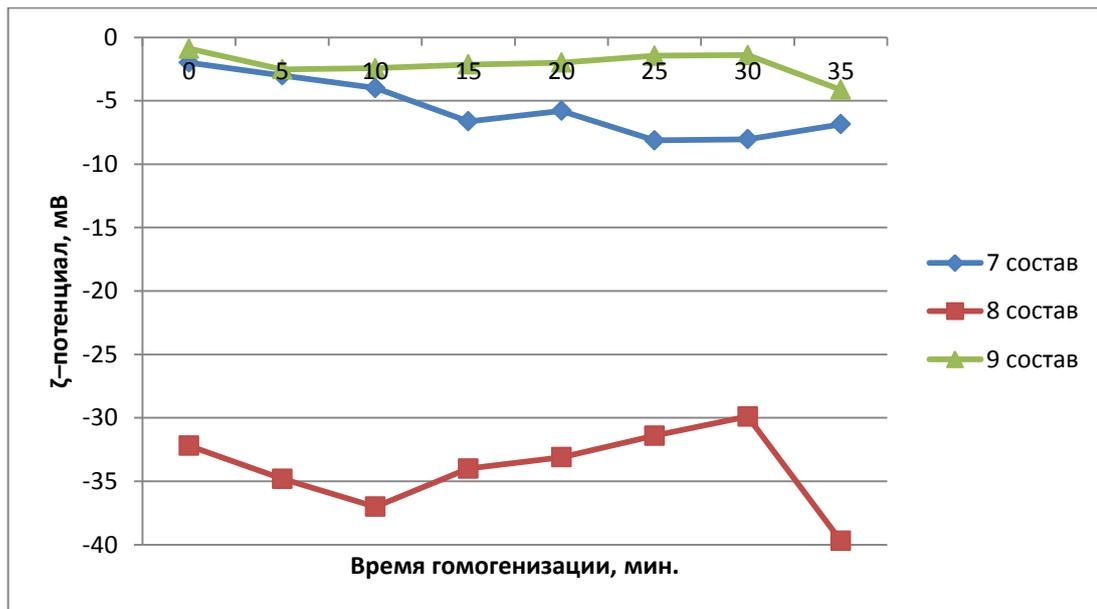
В табл. 24 представлены значения индекса полидисперсности составов 7-9. Из данных таблицы видно, что в ходе гомогенизации происходит уменьшение индекса полидисперсности до критического значения 0,3, что свидетельствует о повышении стабильности липосом.

Динамика изменения индекса полидисперсности липосомальных мицелл

№ состава	Время озвучивания, мин							
	0	5	10	15	20	25	30	35
7	1,000	0,869	0,674	0,546	0,293	0,348	0,296	0,297
8	0,444	0,313	0,289	0,273	0,287	0,289	0,228	0,223
9	0,760	0,660	0,437	0,418	0,428	0,394	0,366	0,597

Липосомы состава 7 достигают необходимой однородности после 20 мин ультразвуковой обработки, а липосомы состава 8 – после 10 мин. После достижения критического значения, индекс остается на одном уровне, что подтверждает, что липосомы измельчаются однородно во всем объеме.

Результаты измерения  $\zeta$ -потенциала липосомальных мицеллы составов 7-9 представлены на рис. 24.

Рис. 24. Динамика изменения  $\zeta$ -потенциала.

Наибольшей устойчивостью характеризуется состав 8, в котором в качестве уплотнителя использован холестерол.

На основании проделанной работы разработана методика получения липосомальной суспензии: 100 мг яичного лецитина, 20 мг холестерола (состав 8) либо 5 мг  $\beta$ -ситостерина (состав 9) растворяли в 10 мл смеси хлороформа и спирта этилового в соотношении 9 : 1 по объему. Полученный раствор упаривали на

ротормом испарителе до полного удаления органического растворителя и образования тонкой липидной пленки на стенках колбы при разрежении 30 кПа, температуре 44-46 °С в течение 9 ч. Далее липидную пленку гидратировали 30 мл фосфатного буфера при температуре 54-56 °С в течение 1 ч. Полученную таким образом эмульсию БМЛ для структурирования выдерживали 24 ч при температуре 2-8 °С. Далее БМЛ подвергали 6 циклам ультразвуковой обработки в течение 6 циклов при комнатной температуре, частоте 35 кГц, мощности 200 Вт. В результате получили 30 мл суспензии МОЛ с диаметром частиц 130-170 нм и индексом полидисперсности  $\leq 0,3$ .

#### 4.4. Выбор состава больших мультиламеллярных липосом с серпишеном

На следующем этапе исследований в липосомальные составы 7-9 включен серпишен. На основании литературных данных предложена концентрация серпишена 0,02 %. Составы композиций отражены в табл. 25.

Таблица 25.

Составы липосомальных композиций с серпишеном

№ состава	Серпишен, мг	Лецитин, мг	Холестерол, мг	$\beta$ -ситостерин, мг	Объем органического растворителя, мл	Объем буфера, мл	pH буфера
10	20	100	–	–	10	30	6,4
11	20	100	20	–	10	30	6,4
12	20	100	–	5	10	30	6,4

БМЛ с серпишеном получали методом гидратации тонкой липидной пленки. К органическому раствору фосфолипида добавляли 20 мг серпишена, а в остальном технология БМЛ аналогична получению «пустых» липосом. Полученные таким образом БМЛ представляли собой гетерогенную эмульсию молочно-белого цвета.

Неполное удаление органического растворителя приводит к снижению стабильности МОЛ [87]. Спирт этиловый и хлороформ являются веществами III (низкотоксичный) и II (негенотоксичный) класса токсичности с ПДК в воздухе 1000 и 20 мг/м<sup>3</sup>. LD<sub>50</sub> для крыс при пероральном приеме 9000 и 908 мг/кг соответственно [19]. Для них ОФС 42-0057-07 «Остаточные органические растворители» предусматривает идентификацию и количественное определение в ЛФ. В связи с этим в эмульсии БМЛ проведено определение концентрации остаточных растворителей.

#### 4.5. Определение концентрации остаточных растворителей

Количественное определение летучих растворителей проводили методом газовой хроматографии (глава 2).

Результаты определения количеств органических растворителей в исходной пробе (1) и в пробе, полученной после стадии гидратирования пленки с серпистеном фосфатным буфером (2), показаны на рис. 25 и обобщены в табл. 26.

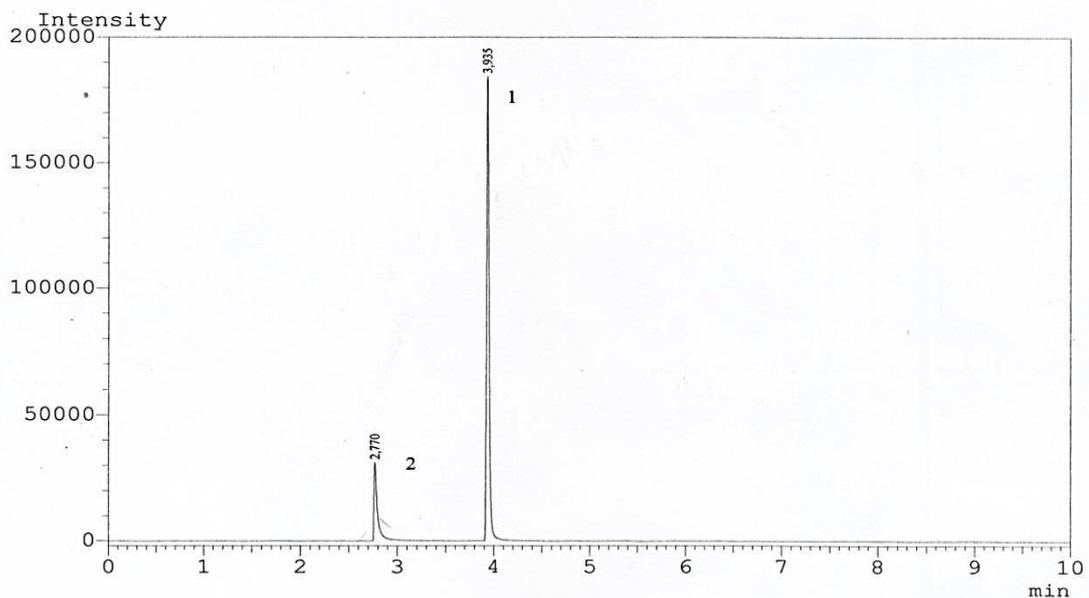


Рис. 25. Хроматографический профиль органических растворителей в липосомальной суспензии до стадии гомогенизации:

1. Пик хлороформа;
2. Пик спирта этилового.

## Содержание органических растворителей в образцах

Проба	Содержание спирта этилового, мг/мл	Содержание трихлорметана, мг/мл
1	78,927	1334,880
2	4,961	0,498

Анализ данных показывает, что на стадии получения тонкой липидной пленки удаляется 99,96 % хлороформа и 93,71 % спирта этилового.

#### 4.6. Изучение параметров гомогенизации липосом серпистена

Для выбора оптимального режима гомогенизации полуфабриката – липосомальной суспензии с серпистеном отбирались аликвоты до начала и после окончания каждого цикла обработки ультразвуком. Качество полученных МОЛ оценивали по диаметру (рис. 26), индексу полидисперсности и  $\zeta$ -потенциалу.

На основании испытаний «пустых» липосом рациональное число циклов ультразвуковой обработки предлагается 6, общее время гомогенизации – 30 мин.

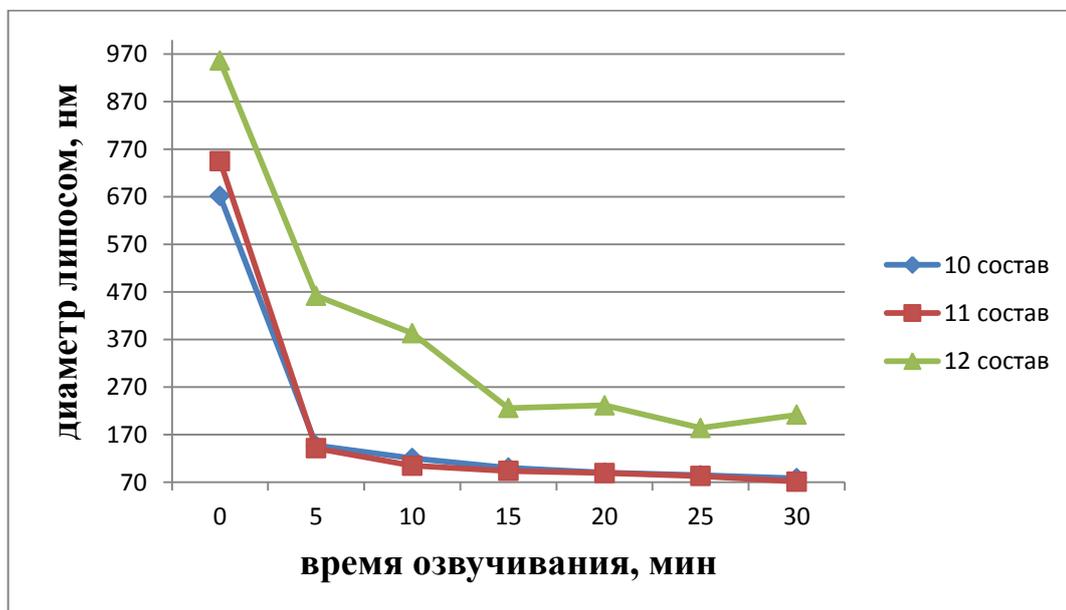


Рис. 26. Зависимость диаметра липосом с серпистеном от времени озвучивания.

Как видно из рис. 26, в ходе гомогенизации профиль снижения диаметра липосом с серпистеном имеет аналогичный характер для составов 10 и 11 и к

концу стадии гомогенизации составляет около 70 нм. При этом цвет суспензии изменяется с молочно-белого до белого с голубоватым оттенком. Интенсивнее всего процесс измельчения липосом проходит в течение первого цикла гомогенизации, когда размер липосом уменьшается в 2-4 раза.

Интегральная характеристика наиболее рационального состава 11 приведена на рис. 27.

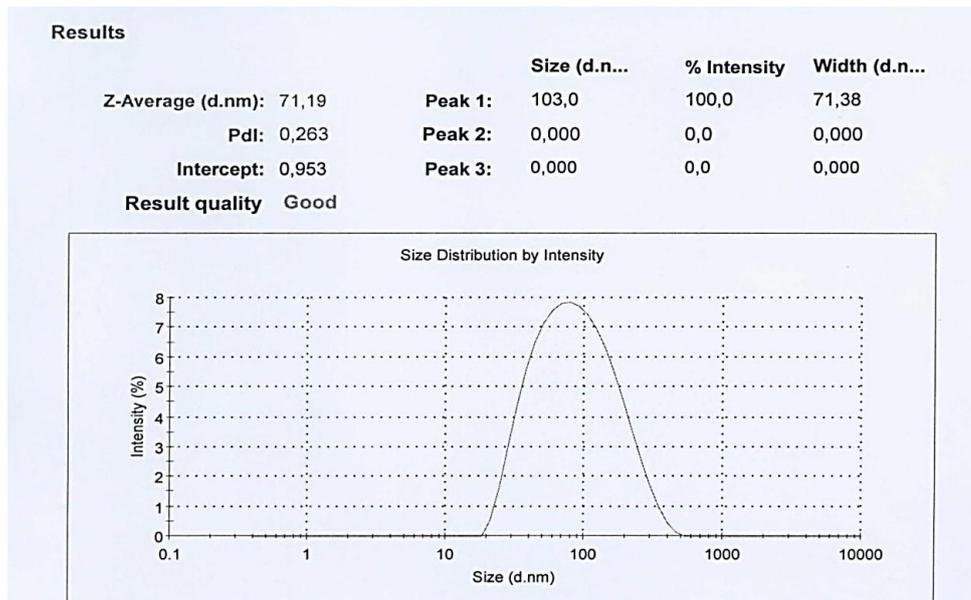


Рис. 27. Размер липосом состава 11 и его характеристики.

Результаты определения индекса полидисперсности липосомальной суспензии с серпистеном в ходе гомогенизации представлены в табл. 27.

Таблица 27.

Динамика изменения индекса полидисперсности липосомальных суспензий

№ состава	Время озвучивания, мин						
	0	5	10	15	20	25	30
10	0,608	0,409	0,400	0,372	0,296	0,290	0,385
11	0,616	0,451	0,355	0,353	0,355	0,269	0,263
12	1,000	1,000	1,000	0,848	0,688	0,771	0,772

Из табл. 27 видно, что критерий однородности ( $\leq 0,3$ ) липосом с серпистеном для составов 10 и 11 достигнут после 20 и 25 мин гомогенизации, соответственно.

Введение в состав 12  $\beta$ -ситостерина не позволило в используемом режиме гомогенизации достигнуть необходимой степени стабильности.

Данные по динамике  $\zeta$ -потенциала исследуемых составов, представлены на рис. 28. При этом, в ходе гомогенизации для составов 10 и 11 отмечается увеличение поверхностного заряда, в то время как значение  $\zeta$ -потенциала для состава 12 практически отсутствует.

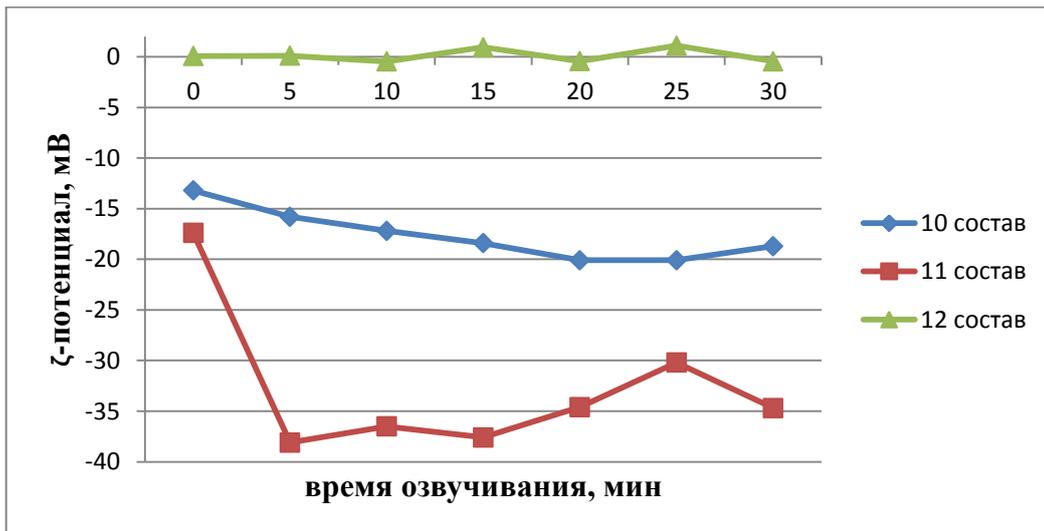


Рис. 28. Динамика изменения  $\zeta$ -потенциала в составах липосом с серпишеном.

Высокой седиментационной устойчивостью обладает состав 11, о чем свидетельствует значение модуля  $\zeta$ -потенциала ( $\geq |30|$  мВ).

На основании комплекса проведенных исследований для дальнейшей разработки технологии липосомального геля с серпишеном выбран состав 11. Высокая стабильность состава 11 позволяет предположить о формировании липосомального комплекса лецитина с участием гидроксильных групп молекулы фитоэкидстероида, подобно фитосомам.

#### 4.7. Исследование степени включения серпишена в липосомы и его «утечки» при хранении

Степень включения серпишена в липосомы определяли методом ВЭЖХ. Для этого липосомальную суспензию состава 11 центрифугировали при ускорении 15000 g для отделения липосом от невключенного серпишена.

Супернатант вносили в хроматографическую колонку. Условия хроматографирования представлены в главе 2.

Хроматограмма супернатанта соответствовала хроматограмме стандартного образца серпистена с четко выраженным пиком, характерным для 20-гидроксиэкдизона, основным фитоэкдистероидом серпистена.

Результаты расчетов степени включения серпистена в липосомы обобщены в табл. 28, из которой видно, что степень включения серпистена в липосомы, полученных по разработанной технологии, превышает 88 %.

Таблица 28.

Результаты определения степени включения серпистена в липосомы

Введено серпистена в состав липосом, мг	Концентрация серпистена в супернатанте, мг/мл	Обнаружено серпистена в супернатанте, мг	Степень включения серпистена в липосомы, %	Метрологические данные (n=5)
20	0,0752	2,256	88,72	$X_{\text{средн}} = 88,75$ $S^2 = 0,015$ $S_x = 0,054$ $\Delta X = 0,15$ $\varepsilon = 0,17\%$
	0,0763	2,289	88,56	
	0,0744	2,232	88,84	
	0,0743	2,229	88,86	
	0,0748	2,244	88,78	

Для прогнозирования материальных потоков при организации промышленного производства представляет интерес определение стабильности полуфабриката – липосомальной суспензии. Определение стабильности проводили после одного месяца хранения при температуре (2–8) °С. Стабильность оценивали по показателю средний диаметр частиц и степень включения в липосомы.

Из представленных результатов (табл. 29 и рис. 29), видно, что «утечка» серпистена из липосом незначительна и после месяца хранения составляет около 4%. В процессе хранения липосомальная суспензия подверглась естественному процессу агломерации, о чем свидетельствует появление дополнительного пика в

области размеров 4 мкм. Однако средний диаметр липосом увеличился незначительно (в пределах систематической ошибки) с 71 нм до 85 нм.

Таблица 29.

Результаты определения степени включения серпистена в липосомы после 1 мес хранения

Введено серпистена в липосомы, мг	Концентрация серпистена в супернатанте, мг/мл	Обнаружено серпистена в супернатанте, мг	Степень включения серпистена, %	Метрологические данные (n=5)
20	0,1031	3,093	84,54	$X_{\text{средн}} = 84,51$ $S^2 = 0,003$ $S_x = 0,026$ $\Delta X = 0,07$ $\varepsilon = 0,08\%$
	0,1028	3,084	84,58	
	0,1035	3,105	84,48	
	0,1038	3,114	84,43	
	0,1032	3,096	84,52	

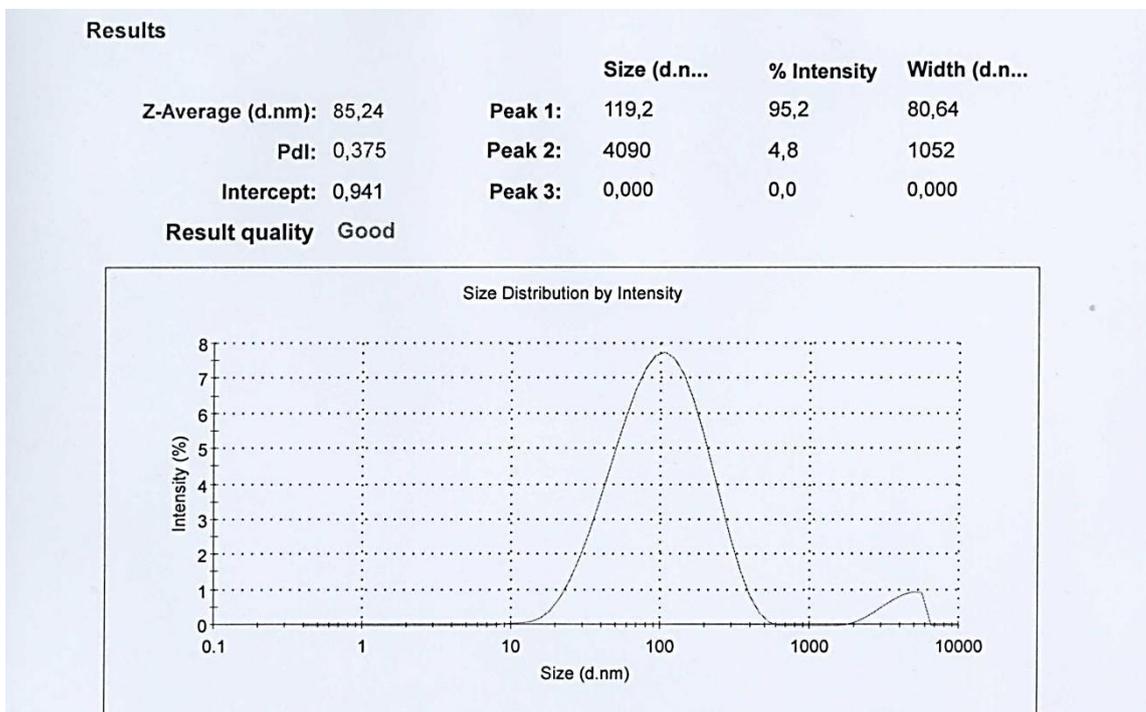


Рис. 29. Средний размер липосомальных везикул состава 11 после 1 месяца хранения.

#### 4.8. Изучение стабильности липосом в составе геля

Для доказательства сохранения целостности липосом с включенным серпистеном при нами получены 3 серии 0,02% модельных композиций липосомального геля серпистена на основе карбопола 940. Далее проведен диализ липосомального геля через полупроницаемую мембрану по методике, описанной в главе 2.

По полученным данным построен кинетический профиль по средним значениям высвобождения серпистена из липосомального геля (рис. 30).

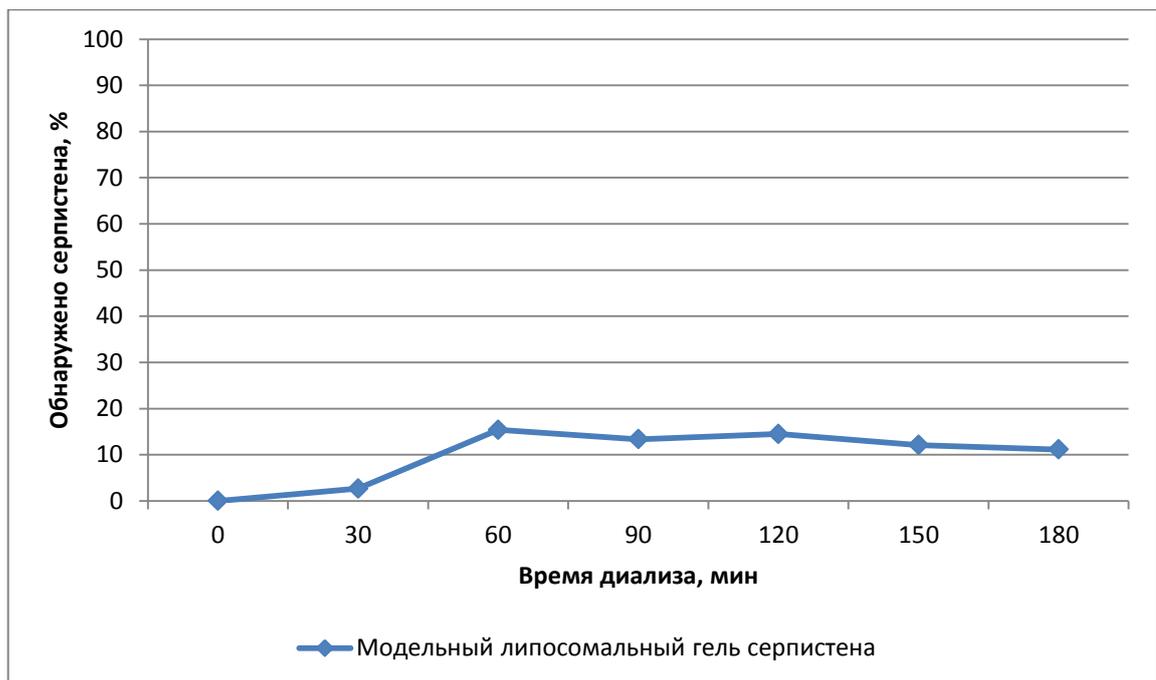


Рис. 30. Кривая высвобождения серпистена из липосомального геля.

Как видно из рис. 30, в диализную среду высвободилось около 15% серпистена. Полученные данные хорошо согласуются с результатами оценки степени включения серпистена во внутреннее пространство липосом, которыми установлено количество невключенного в липосомы серпистена 11,25 %.

Таким образом, проведенное исследование позволило подтвердить формирование стабильной структуры липосомального геля серпистена с включением серпистена 88,75 %.

#### 4.9. Оценка применимости фотометрического показателя дисперсности в технологическом контроле липосомальных суспензий

На следующем этапе работы нами исследована возможность применения фотометрического показателя дисперсности (далее ФПД) для технологического контроля размеров липосом в процессе получения.

Для оценки специфичности методики определения размера липосом с использованием ФПД сравнивались значения липосом со столбнячным анатоксином, указанные в работе А. В. Иванова [27] с близкими значениями ФПД, полученными в нашей работе, данные приведены на рис. 31.

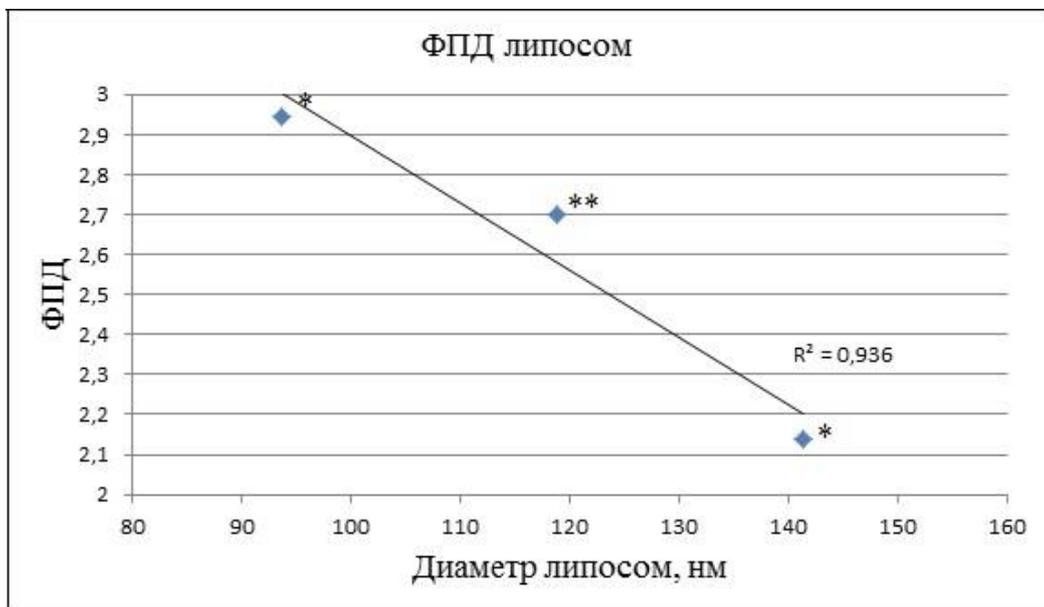


Рис. 31. ФПД липосом двух массивов данных.

Примечание:

\* - значения, полученные экспериментально;

\*\* - значение, взятое из литературных источников.

Коэффициент корреляции между двумя массивами данных составил 0,936, что говорит о специфичности методики определения размеров частиц посредством вычисления ФПД.

Для определения диапазона линейных значений ФПД замеряли оптическую плотность в липосомальных суспензиях составов 7-9, а также в их разведениях на

приборе КФК-2 и Biowave-II при длинах волн 400 и 540 нм с последующим расчетом ФПД. Массивы значений ФПД представлены в приложении 9.

На основании расчетных данных ФПД составов липосом 7-12 и средних диаметров липосом до и во время процесса гомогенизации устанавливалась корреляционная связь. Данные приведены в табл. 30.

Таблица 30.

Значения коэффициентов корреляции ФПД от диаметра липосом в составах 7-12

	Прибор	№ состава	Концентрация фосфолипида, мг/мл				
			3,33	1,67	1,11	0,83	0,67
Коэффициент корреляции	КФК-2, Россия	7	0,92	0,88	0,92	0,93	0,92
		8	0,89	0,89	0,94	0,94	0,86
		9	0,75	0,88	0,91	0,90	0,76
		10	0,89	0,89	0,94	0,94	0,86
		11	0,96	0,91	0,91	0,95	0,95
		12	*	0,80	0,88	0,83	0,94
	Biowave II, Великобритания	7	0,79	0,92	0,98	0,99	0,81
		8	*	0,98	0,95	0,98	0,95
		9	0,97	0,98	0,95	0,94	0,97
		10	*	0,98	0,95	0,98	0,95
		11	0,93	0,92	0,75	0,52	0,71
		12	*	*	*	0,27	0,20

Примечание: \* данных недостаточно для статистической обработки.

В результате проведенных исследований установлено, что коэффициент корреляции превышает 0,9 в 34 рядах из 54.

Из табл. 30 видно, что при концентрации фосфолипида 3,33 мг/мл коэффициент корреляции принимает значение свыше 0,9 лишь в 4 рядах из 12 возможных, что говорит о нерациональности измерения оптической плотности в неразведенной суспензии. На основании табличных данных можно сделать вывод, что при высокой концентрации фосфолипида (3,33 и 1,67 мг/мл) на начальных

циклах гомогенизации оптическая плотность малых однослойных липосом превышает оптический оптимум измерения (0,3–0,5), из-за чего оптическая плотность. В процессе измельчения липосом их оптическая плотность уменьшается и к концу стадии гомогенизации входит в область, подчиняющуюся закону Бугера-Ламберта-Бера.

При концентрации фосфолипида 0,67-1,11 мг/мл оптическая плотность разведения липосом подчиняется основному закону светопоглощения на начальных этапах гомогенизации, а ближе к концу при значениях 0,01-0,1 относительная ошибка измерения выходит за пределы 5 % (максимально допустимой ошибки инструментального метода анализа).

Для того, чтобы измерение оптической плотности липосом проходило в пределах оптимума, нами предложена следующая пробоподготовка липосомальной суспензии: после первого и второго цикла озвучивания отобранную аликвоту суспензии липосом разводить фосфатным буферным раствором до концентрации фосфолипида 0,67 мг/мл, измерять оптическую плотность, провести расчет ФПД. После третьего цикла гомогенизации аликвоту следует разводить до концентрации 0,87 мг/мл с последующим расчетом ФПД. Остальные измерения следует проводить в неразведенной суспензии липосом.

Результаты зависимости ФПД от диаметра липосом с использованием предложенной пробоподготовки представлены на рис. 32 и 33.

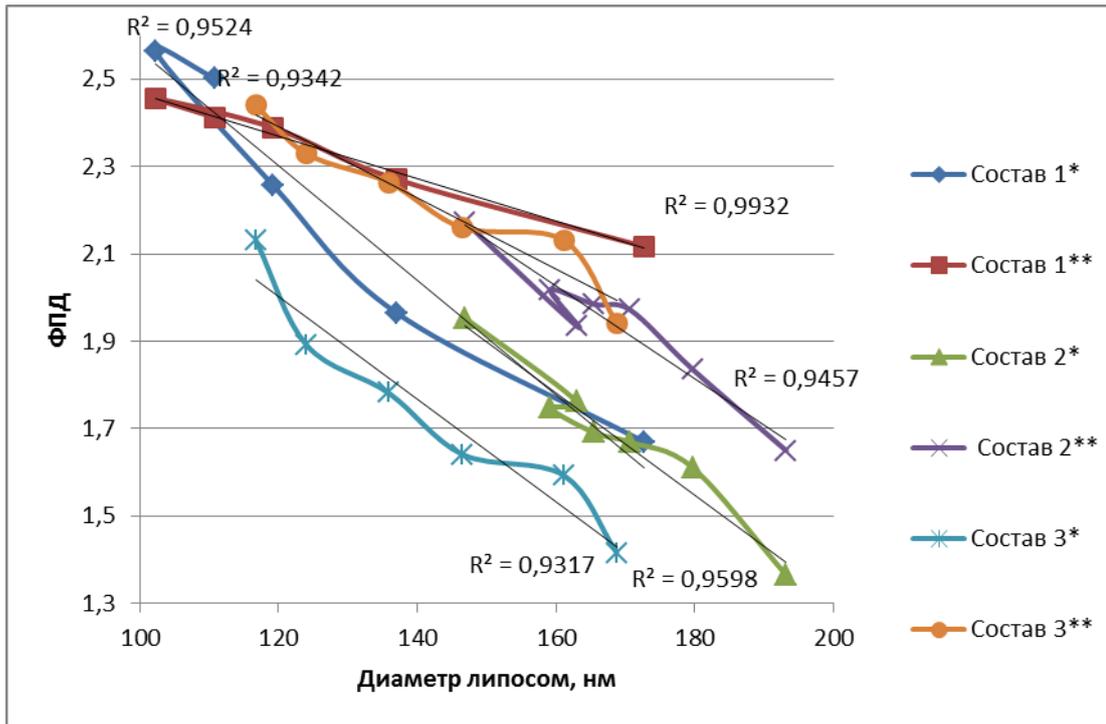


Рис. 32. Графики зависимости ФПД от диаметра липосом в составах 1-3.

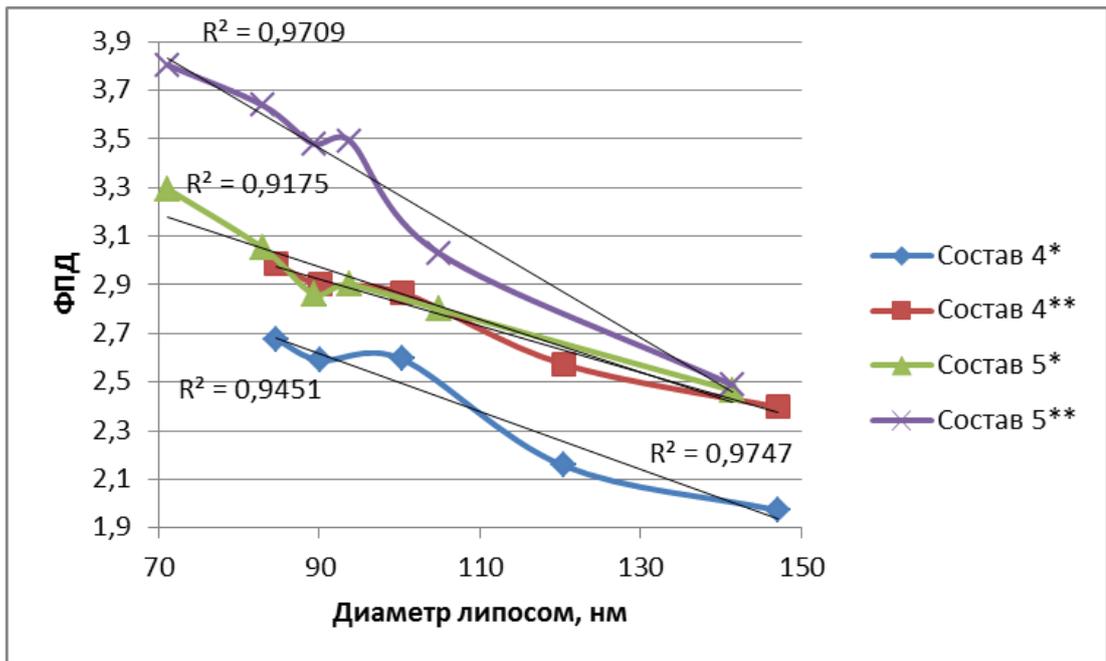


Рис. 33. Графики зависимости ФПД от диаметра липосом в составах 4-5.

Примечание: \* - значения получены на приборе КФК-2;

\*\* - значения получены на приборе Viowave II.

Предложенная методика пробоподготовки позволила достичь коэффициента корреляции на уровне 0,92-0,99. Доказанная закономерность позволяет контролировать технологический процесс измельчения липосом в диапазоне значений диаметра от 70 до 200 нм при помощи ФПД. Для указанного интервала

установлена специфичность и линейность методики оценки среднего диаметра липосом.

Таким образом, на основании проведенного комплекса исследований, установлено, что наиболее рациональными композицией и технологией является липосомальная суспензия с серпистеном состава 11. Высокая стабильность состава 11 позволяет предположить о формировании липосомального комплекса лецитина с участием гидроксильных групп молекулы ФЭ, подобно фитосомам.

#### 4.10. Изучение структуры липосом с серпистеном

Для доказательства образования водородных связей между молекулами фитостероидов и фосфатидилхолином нами согласно описанным методикам [155, 156] сняты спектры ЯМР  $^{31}\text{P}$  тонкой липидной пленки с серпистеном и лецитина в двух растворителях (дейтерированном хлороформе и дейтерированном диметилсульфоксиде).

На спектрах, снятых в диметилсульфоксиде (ДМСО), видно, что не происходит смещения основного пика, относящегося к фосфатидилхолину (рис. 34 и рис. 35).

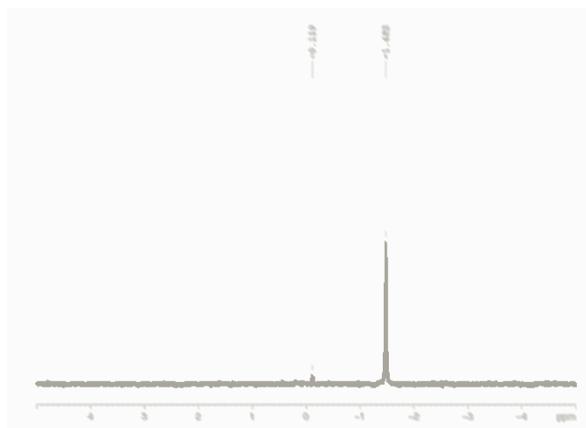


Рис 34. ЯМР  $^{31}\text{P}$ -спектр лецитина в дейтерированном ДМСО.

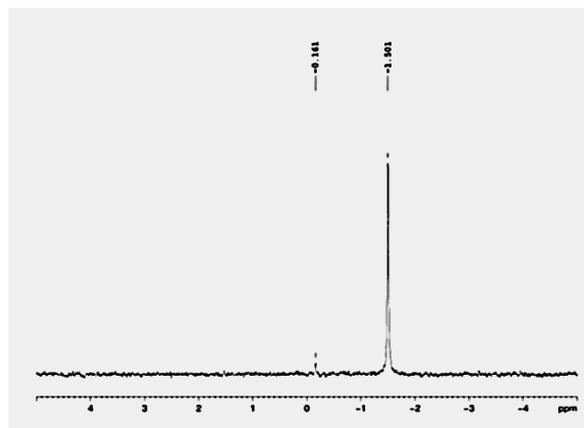


Рис 35. ЯМР  $^{31}\text{P}$ -спектр тонкой липидной пленки с серпистеном в дейтерированном ДМСО.

В то же время на спектрах, полученных на дейтерированном хлороформе видно, что происходит смещение пика на 0,15 м. д., что свидетельствует об образовании связи между фосфолипидом и фитостероидом (рис. 36 и рис. 37).

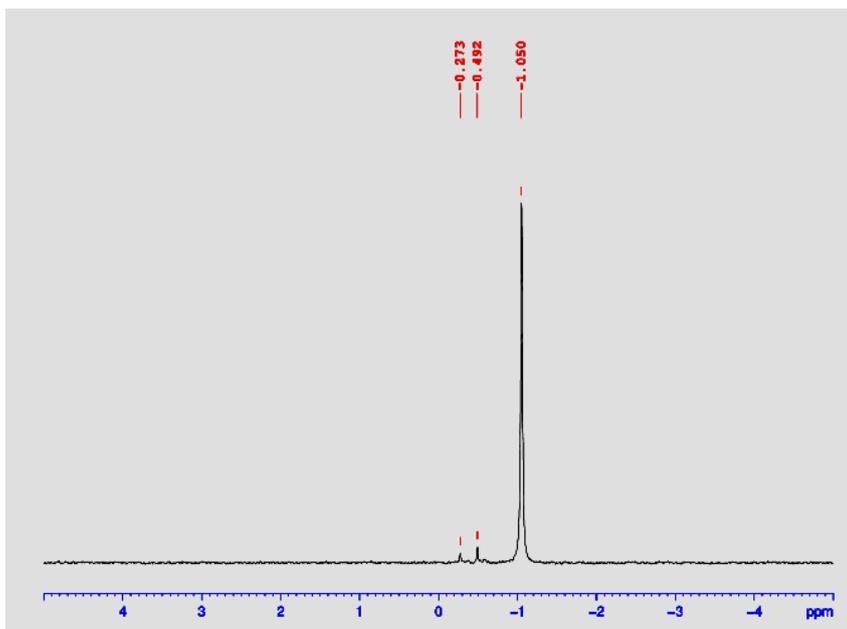


Рис. 36. ЯМР  $^{31}\text{P}$ -спектр лецитина в дейтерированном хлороформе.

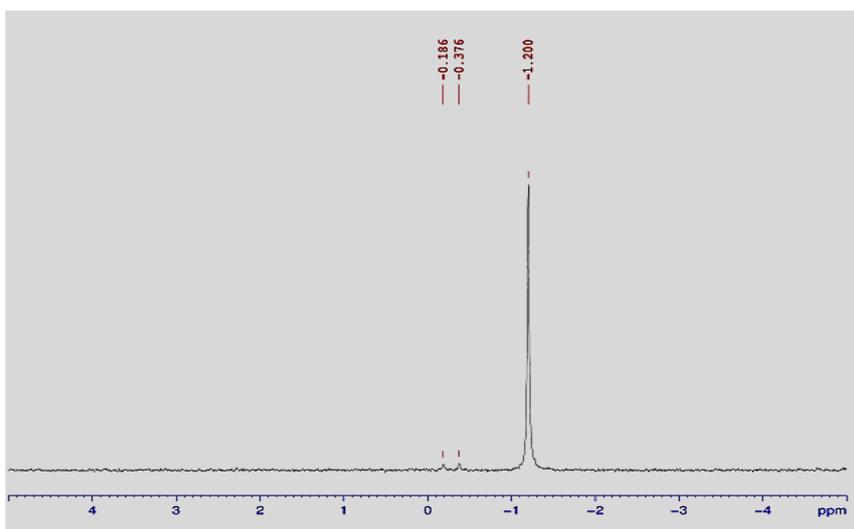


Рис. 37. ЯМР  $^{31}\text{P}$ -спектр тонкой липидной пленки с серпистеном в дейтерированном хлороформе.

Полученные результаты позволяют сделать заключение об образовании фитосом с серпистеном.

#### 4.11. Выбор состава липосомального геля

Опираясь на данные литературы, в качестве структурообразователя выбран карбопол марки 940, который известен своей способностью образовывать в воде устойчивый гель и широким использованием в технологии липосомальных гелей [170, 176]. С целью подбора состава липосомального геля серпистена, обладающего стабильностью и фармакологической активностью, предварительно

получены 3 состава 0,02% липосомальных гелей серпистана, составы которых представлены в табл. 31.

Таблица 31.

## Составы исследуемых образцов липосомальных гелей с серпистаном

№ образца	I	II	III
Компоненты			
Липосомальная суспензия серпистана, мл	30	30	30
Карбопол 940, г	0,5	0,75	1,0
0,1 Н калия гидроксид, мл	1,0	1,0	1,0
Воды очищенной, г	До 100,0	До 100,0	До 100,0

Все полученные составы изучали на предмет стабильности по таким критериям, как внешний вид, pH, термическая и коллоидная устойчивость, реологические характеристики и осмотическая активность. Методики испытаний описаны в главе 2.

Все образцы представляли собой прозрачные гели с синеватым оттенком, не расслаивающиеся и не изменяющие pH при хранении. Значения pH приведены в табл. 32.

Таблица 32.

## Значения pH составов липосомальных гелей серпистана

№ состава	f	pH( $X_{cp}$ )	$S^2$	S	$Sx_{cp}$	a, %	t(a, f)	$\Delta X$	$\epsilon_{cp}$ , %
I	4	6,63	0,001	0,036	0,08	95	3,18	0,25	4,21
II	4	6,47	0,001	0,027	0,09	95	3,18	0,29	4,90
III	4	6,35	0,001	0,024	0,03	95	3,18	0,10	1,55

Примечание. f – количество степеней свободы;  $X_{cp}$  – выборочное среднее;  $S^2$  – исправленная выборочная дисперсия; S – исправленное выборочное среднее квадратическое отклонение (стандартное отклонение);  $Sx_{cp}$  – исправленное среднее квадратическое отклонение средней выборочной (стандартное отклонение); a, % - доверительная вероятность; t(a, f) – коэффициент Стьюдента;  $\Delta X$  – полуширина доверительного интервала;  $\epsilon_{cp}$ , - относительная погрешность.

При введении липосомальной суспензии серпистена в состав геля значение рН практически не изменяется: рН липосомальной суспензии составляет 6,4, а водородный показатель липосомальных гелей колеблется от 6,32 до 6,67.

Для гидрофильных гелей реологический оптимум консистенции характеризуется пределом текучести от 45 до 160 Па, эффективной вязкостью 0,34-108 Па\*с при скоростях сдвига от 1,5 до 1312 с<sup>-1</sup>[4].

Анализ полученных реограмм испытуемых составов показал, что липосомальные гели обладают тиксотропными свойствами и представлены на диаграмме течения липосомальных гелей серпистена петлями гистерезиса (рис. 38).

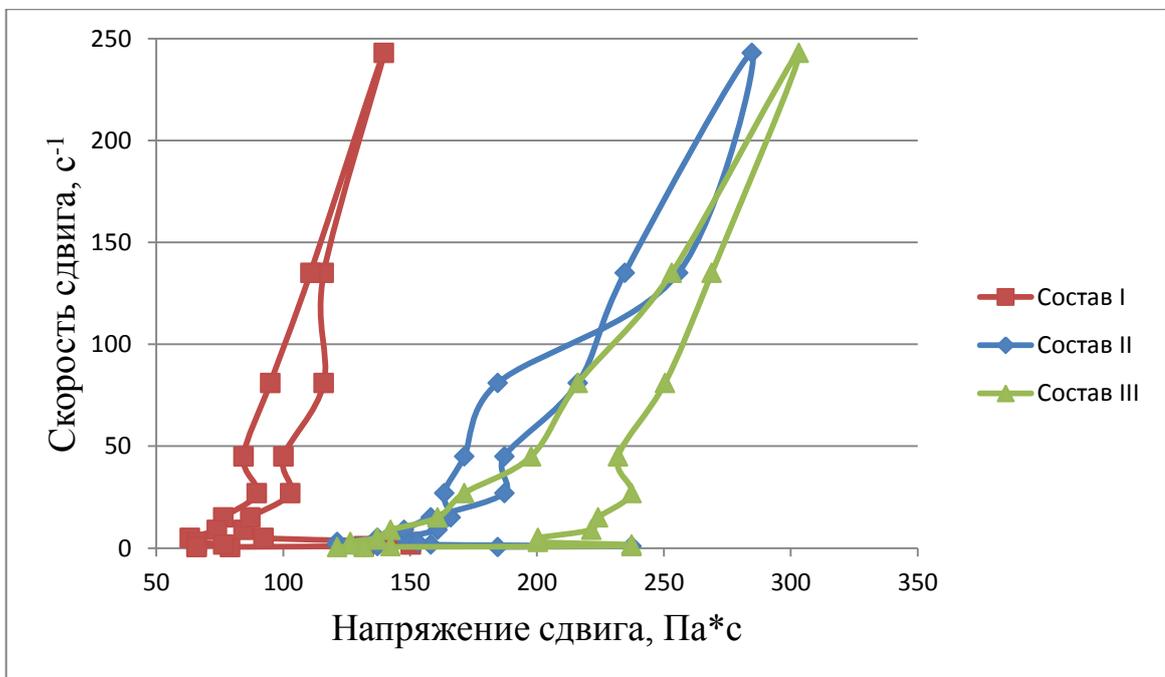


Рис. 38. Диаграммы течения 0,02% липосомальных гелей серпистена на карбополе 940 разной концентрации.

Как видно из рис. 34, самая широкая петля среди исследованных композиций отмечается для состава III, в котором содержание карбопола 1%, это указывает на его лучшие реологические характеристики, например, экструзию (способность выдавливаться) из туб и лучшую намазываемость. Логарифмирование функции зависимости эффективной вязкости от скорости сдвига выявило, что наиболее прямолинейный график соответствует составу III (рис. 39;  $r^2=0,9945$ ).

Таким образом, анализ двух массивов данных определил, что показатели эффективной вязкости и напряжение сдвига наиболее оптимальны у геля серпистена с концентрацией карбопола 1%. Поэтому для дальнейшей работы выбран состав III.

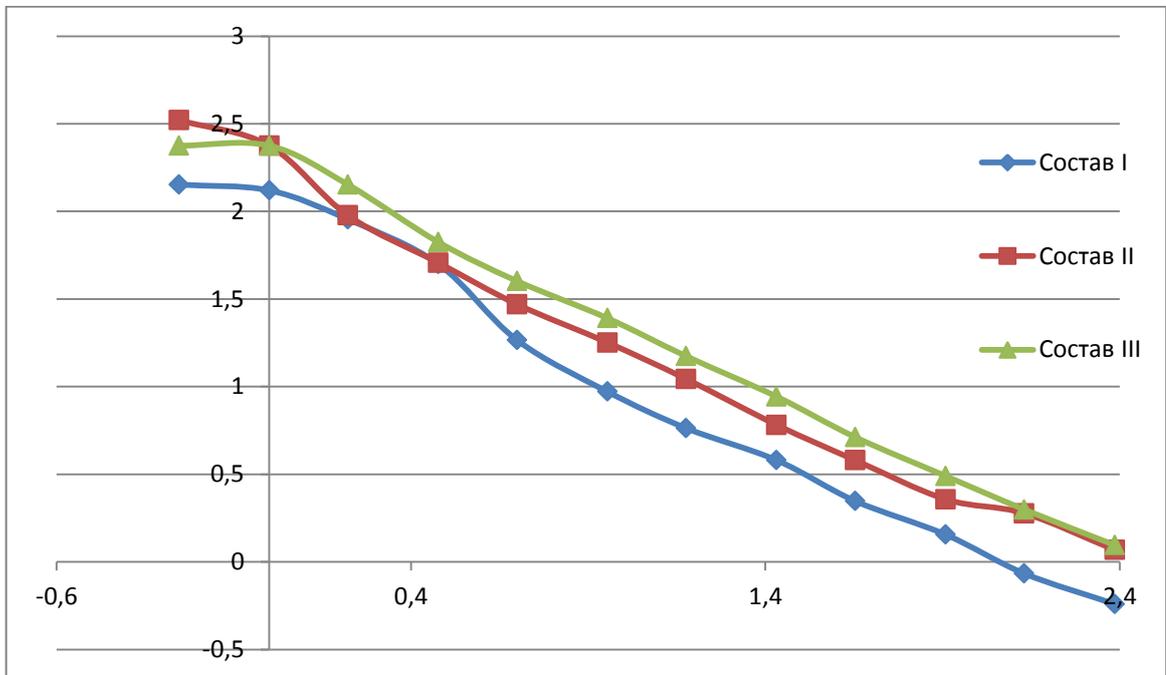


Рис. 39. Зависимость логарифма эффективной вязкости от логарифма скорости сдвига.

При изучении осмотической активности установлено, что липосомальный гель серпистена обладает значительным и продолжительным дегидратирующим действием, который проявлялся в течение 12 часов, в то время как у 10 % раствора натрия хлорида только в течение первых 2 часов (табл. 33).

Таблица 33.

#### Осмотическая активность липосомального геля серпистена

Объект исследования	Абсорбировано жидкости, %	Время абсорбции, час.
10% раствор натрия хлорида (контроль)	21,4 ± 3,2	2
Липосомальный гель серпистена	212,4 ± 4,9	12

Полученные данные позволяют предположить наличие у липосомального геля серпистена противоотечных свойств, которые способствуют очищению раны.

#### **4.12. Разработка технологической схемы получения липосомального геля серпистена**

Как указано выше, наибольшей стабильностью липосомальная суспензия серпистена обладает в фосфатном буферном растворе с использованием яичного лецитина в качестве фосфолипида, холестерина в качестве уплотнителя фосфолипидного слоя. При использовании в качестве гелеобразователя карбопола марки 940 проявляются оптимальные структурообразующие и реологические свойства геля. В качестве нейтрализующего агента в состав геля введен гидроксид калия.

Таким образом, комплекс технологических исследований позволил выбрать состав липосомального геля серпистена 0,02 %:

Серпистен	0,02
Яичный лецитин	0,1
Холестерол	0,02
Фосфатный буферный раствор	30 мл
Карбопол марки 940	1,0
Калия гидроксид	0,056
Вода очищенная	До 100,0

Получение липосомального геля серпистена включает несколько этапов:

1 этап: получение липосомальной суспензии серпистена и мазевой основы (ТП - 3);

2 этап: получение липосомального геля с серпистеном (ТП-4);

3 этап: фасовка и упаковка липосомального геля (УМО-5).

Ниже приведено описание основных технологических стадий получения липосомального геля с серпистеном.

#### **Описание основных стадий технологического процесса**

##### **Приготовление липосомальной суспензии**

20 мг серпистена, 1 мл 10% раствора яичного лецитина в абсолютном спирте, 20 мг холестерина растворяют в 9 мл хлороформа. Полученный раствор

помещают в круглодонную колбу емкостью 250 мл и подсоединяют к роторному испарителю, упаривают при давлении 30 кПа в течение 9 часов при температуре  $(45\pm 1)$  °С, число оборотов ротора 120 об/мин. Упаривание проводят до полного удаления органических растворителей и образования тонкой липидной пленки на стенках колбы. Затем липидную пленку гидратируют в фосфатном буферном растворе объемом 30 мл при температуре  $(55\pm 1)$  °С в течение 1 ч. Полученную таким образом дисперсию БМЛ с серпистеном выдерживают 24 ч в условиях холодильника для структурирования липосом. Таким образом, получают эмульсию БМЛ серпистена, которую подвергают гомогенизации.

Круглодонную колбу с эмульсией БМЛ серпистена помещают в ультразвуковую ванну и проводят обработку ультразвуком циклами по 5 мин с 15 минутным перерывом для структурирования липосом. Всего проводится 6 циклов при полной мощности, частоте ультразвуковых волн 35 кГц, температура воды в установке поддерживалась на уровне 41-43 °С.

Полученную липосомальную суспензию контролируют в производственном подразделении по следующим показателям: средний размер липосом, ФПД и  $\zeta$ -потенциал.

### **Получение липосомального геля серпистена**

На начальной стадии получают гель-концентрат карбопола. Для этого в рассчитанном количестве воды очищенной диспергируют карбопол марки 940 и после двухчасового набухания полученный гель-концентрат нейтрализуют гидроксидом калия. Затем к полученному гелю добавляют липосомальную суспензию, с помощью механической мешалки тщательно перемешивают до образования прозрачной однородной желеобразной массы с голубоватым оттенком.

Полученный гель выгружают в емкости и хранят до операции фасовки в холодильнике при температуре не выше  $(2-8)$  °С не более 15 суток.

Липосомальный гель контролируют по показателям: количественное содержание серпистена, микробиологическая чистота, эффективная вязкость, pH.

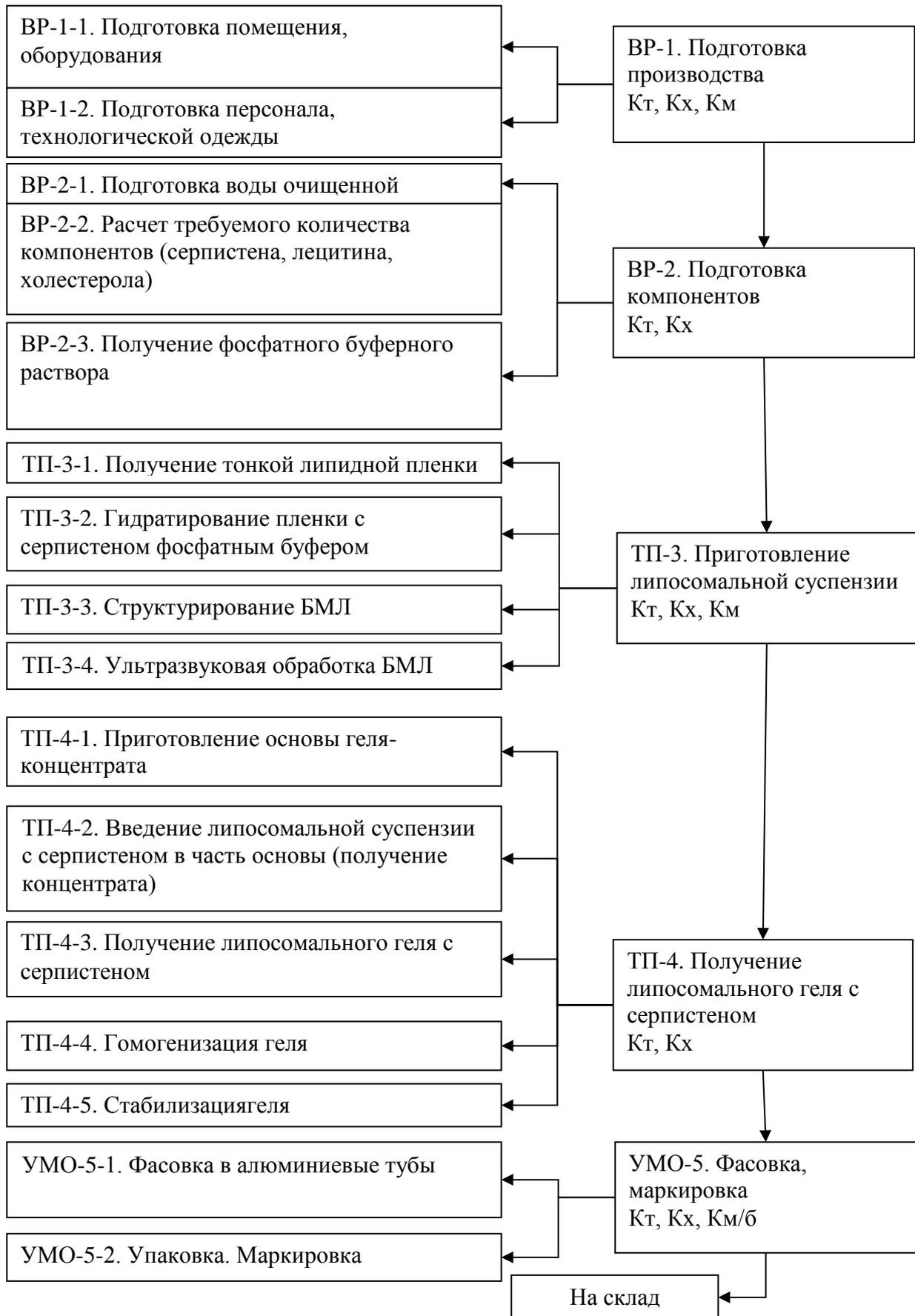


Рис. 40. Технологическая схема получения липосомального геля серпистена

### Фасовка

Липосомальный гель серпистена фасовали по 30 г в тубы алюминиевые с мембраной по ТУ 9467-004-32807885-2008 с внутренним лаковым покрытием. Тубу вместе с инструкцией по применению упаковывают в картонную коробку.

Хранение. Хранить в прохладном, защищенном от света месте при температуре 2–8 °С.

Полученный оптимальный состав 0,02% липосомального геля серпистена обеспечивает стабильность при хранении и рациональную технологию (рис. 40).

Перечень КП получения липосомального геля серпистена представлен в табл. 34.

Таблица 34.

#### Основные КП технологического процесса получения липосомального геля серпистена

КП	Контролируемый показатель	Наименование этапа
КП-1	Температура (45±1) °С; Давление 30 кПа.	ТП-3-1. Получение тонкой липидной пленки
КП-2	Остаточные органические растворители: Хлороформа не более 0,1 % от введенного количества; Спирта этилового не более 7,0 % от введенного количества.	ТП-3-1. Получение тонкой липидной пленки
КП-3	Температура гидратации (55±1) °С; Время гидратации 1 ч.	ТП-3-2. Гидратирование пленки с серпистеном фосфатным буфером
КП-4	ФПД раствора БМЛ с концентрацией фосфолипида 0,67 мг/мл в пределах 0,6 -1,0.	ТП-3-3. Структурирование БМЛ
КП-5	Значение рН раствора БМЛ 6,4±0,3	
КП-6	Количество циклов гомогенизации не более 7.	ТП-3-4. Ультразвуковая обработка БМЛ
КП-8	Степень включения серпистена в липосомы не менее 88 %	
КП-9	Значение рН основы геля-концентрата 6,4 ±0,4	ТП-4-1. Приготовление основы геля-концентрата
КП-10	Средняя масса геля; Количественное содержание серпистена; Значение эффективной вязкости в пределах оптимума; Содержание хлороформа менее 0,02%; Содержание спирта этилового менее 0,2 %. Микробиологическая чистота	УМО-5. Фасовка, маркировка

### 4.13. Стабильность геля серпистена

Стабильность липосомального геля серпистена изучали в течение 6, 12 и 15 мес. при температуре (2-8) °С. Всего на хранение заложено 9 серий, при этом 3 серии оценивались на стабильность после 6 мес. хранения, 3 серии – после 12 мес., оставшиеся 3 – после 15 мес.

Стандартизацию липосомальной формы серпистена проводили по показателям качества, представленным в спецификации (прил. 4): внешний вид геля, размер липосом, рН водного извлечения, подлинность, микробиологическая чистота и количественное содержание серпистена, которое проводилось согласно методике, предложенной для мази серпистена.

Результаты оценки технологических параметров мази серпистена приведены в табл. 35.

Таблица 35.

Результаты стабильности липосомального геля серпистена сроком хранения 6, 12 и 15 месяцев

Время хранения, мес.	Внешний вид	рН	Коллоидная стабильность	Подлинность
0	однородная прозрачная масса с голубоватым оттенком	6,2-6,6	Стабилен	Соответствует
6	Не изменился	6,4-6,8	Стабилен	Соответствует
12	Не изменился	6,5-6,9	Стабилен	Соответствует
15	Не изменился	6,5-6,9	Стабилен	Соответствует

Результаты исследований показали, что липосомальный гель серпистена сохраняет стабильность в течение 15 месяцев хранения при температуре от +2 до +8 °С и количественное содержание серпистена находилось в диапазоне 0,18-0,22 мг в 1 г геля.

**Выводы по главе 4**

1. С использованием метода гидратации тонкой липидной пленки и последующей ультразвуковой обработки разработана технология липосомальной суспензии серпистена со средним размером частиц 70-90 нм, дзета-потенциалом  $|35|$  мВ, индексом полидисперсности 0,263 и степенью включения фитоэкидистероидов  $88,75 \pm 0,15$  %.
2. Показана возможность постадийного контроля среднего размера частиц липосом в интервале 70-140 нм с помощью фотометрического показателя дисперсности, данный метод является специфичным, воспроизводимым и линейным ( $r^2 > 0,95$ );
3. Проведен комплекс исследований по подбору состава липосомального геля серпистена 0,02 %, который позволил получить лекарственную форму с удовлетворительными технологическими и реологическими характеристиками;
4. На основании выполненных исследований разработана рациональная технология липосомального геля серпистена;
5. Установлено, что липосомальный гель серпистена остается стабильным в течение 15 месяцев хранения при температуре (2-8) °С .

## **ГЛАВА 5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С СЕРПИСТЕНОМ**

### **5.1. Исследование раздражающего действия серпистена при нанесении на кожу кроликам**

Действие серпистена при нанесении на кожу животных исследовали на 6 кроликах-самцах средней массой 3500 г открытым способом при температуре окружающей среды (20-22) °С. За 2 дня до эксперимента кроликам выстригали волосы на спине виде квадрата по обе стороны от позвоночника площадью 4 см<sup>2</sup>. Правый бок служил для аппликации суспензии серпистена с крахмальной слизью в соотношении 1:2, а левый бок – для контроля. Суспензию серпистена наносили однократно в объеме 1-2 мл на правый бок, а на левый бок – крахмальную слизь. В течение 10 дней за подопытными животными вели наблюдение. Наличие раздражающих свойств у исследуемой субстанции определяли визуально.

При аппликации суспензии серпистена на кожу кроликов видимых изменений не наблюдалось. Кожная складка до начала аппликаций была в пределах 2 мм. В последующие 10 суток кожная складка не утолщалась и равнялась 2-3 мм. При этом признаков воспаления или раздражения на коже у кроликов при нанесении серпистена в виде суспензии не наблюдалось.

### **5.2. Оценка местно-раздражающего действия мягких лекарственных форм с серпистеном**

Следующий этап эксперимента заключался в изучении местно-раздражающего действия лекарственных форм серпистена на слизистую оболочку глаз кроликов. опыты проводили на 6 кроликах-самцах массой 3300-3600 г. Животные были разделены на три группы: 1-я группа – животные, которым вводили мазь серпистена, 2-я группа – животные, которым вводили липосомальный гель серпистена и 3-я группа – животные, которым вводили препарат сравнения – крем «Актовегин». Препараты вводили в конъюнктивальные мешки кролика по 0,1 г. Перед проведением эксперимента слизистая глаз кроликов была розового цвета, слегка увлажненная, без признаков

воспаления. После введения препаратов в течение одной минуты прижимали слезно-носовый канал у внутреннего угла глаза кролика. Наблюдение за подопытными животными вели в течение двух недель, при этом учитывали появление отечности, выраженной гиперемии, инъекции сосудов склеры и роговицы, состояние век и диаметр зрачка.

При введении крема «Актовегин» в конъюнктивальный мешок кроликов наблюдалась умеренная гиперемия конъюнктивы, краев век и третьего века. Животные не открывали глаза в течение 3 мин после введения препарата. При введении мази серпистена в конъюнктивальный мешок кроликов наблюдалась легкая гиперемия краев век. Животные не открывали глаза в течение 3 мин после введения препарата. При введении липосомального геля серпистена в конъюнктивальный мешок кроликов видимых изменений с первоначальным состоянием животных не наблюдалось. Кролики открывали глаза сразу после введения препарата.

Тем самым, в результате проведенного исследования, нами выявлено, что нанесение лекарственных форм серпистена на слизистые оболочки глаз и кожу кроликов не вызывает раздражающего и кожно-резорбтивного действия у животных.

Следовательно, проведенные исследования свидетельствуют о том, что серпистен не обладают токсическими свойствами при нанесении на кожу и слизистые оболочки глаз животных и по ГОСТу – 2.14.95 и по токсичности данные препараты могут быть классифицированы как нетоксичные и безвредные, не обладающие кумулятивным действием.

### **5.3. Изучение репаративной активности лекарственных форм с серпистеном**

Для проведения исследований на специфическую активность лекарственных форм с серпистеном для наружного применения использованы мазь серпистена и липосомальный геля с серпистеном, составы которых приведены на стр. 75 и 120 соответственно. Препаратами сравнения служили регенерирующие препараты различных производителей: «Бепантен» (GP Grenzach

Produktions GmbH, Германия) и «Актовегин» (Nycomed Austria GmbH, Австрия). «Бепантен» представляет собой 5% крем декспантенола для наружного применения, «Актовегин» - 5% крем бычьего гемодиализата. Изучение репаративной активности лекарственных форм серпистена проводили на моделях линейной асептической раны и термического ожога.

### 5.3.1. Исследование репаративной активности лекарственных форм серпистена на модели линейной асептической раны

Изучение специфической активности разработанных лекарственных форм с серпистеном проводили на модели линейной асептической раны, на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-250 г. Влияние препаратов на заживление изучено ранотензиометрическим методом. Методика описана в главе 2.

О регенерирующем действии препаратов судили по изменению прочности послеоперационного рубца на разрыв по сравнению с контролем. Протокол исследования, составленный при изучении регенерирующей активности образцов на модели линейной асептической раны, представлен в приложении 7.

Изучение регенерирующей активности показало, что мазь серпистена оказывает выраженный регенерирующий эффект на модели линейных асептических ран кожи, как и препараты сравнения, что проявляется в достоверном увеличении силы разрыва рубца на 5 и 7 сутки эксперимента по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$ . Результаты статистической обработки экспериментальных данных приведены в табл. 36.

Таблица 36.

Влияние мази серпистена на прочность рубца

Образцы препаратов	Сила разрыва рубца, Н	
	На 5 сутки	На 7 сутки
Контроль	1,23±0,20	1,93±0,22
Мазь серпистена	2,82±0,40*	5,94±0,41*,**,***
Основа мази	1,61±0,18	5,48±0,59*,***
Крем «Актовегин» 5%	3,23±0,17*	4,50±0,48*
Мазь «Бепантен» 5 %	2,29±0,16*	3,35±0,51*

Примечание:

\* – различие достоверно по сравнению с контролем при  $p \leq 0,02$ ;

\*\* – различие достоверно по сравнению с кремом «Актовегин» при  $p \leq 0,05$ ;

\*\*\* – различие достоверно по сравнению с мазью «Бепантен» при  $p \leq 0,05$ .

Как видно из табл. 38, применение мази серпистена достоверно увеличивало прочность рубца относительно контроля на 229,3 % на 5-ые сутки наблюдения и на 307,8 % к концу наблюдения. Прочность рубца при использовании мази серпистена на 7-ые сутки после нанесения травмы выше, чем у основы на 8,2 %, на 31,9 % и 77,3 % выше крема «Актовегин» и мази «Бепантен» соответственно.

Изучение регенерирующей активности липосомального геля с серпистеном выявило (табл. 37) достоверное увеличение прочности рубца на 237,4 % и 255,4 % по отношению к контролю.

К концу эксперимента прочность рубца геля серпистена на 76,1 % выше, чем у основы, на 9,4 % и 47,2 % прочнее, чем у крема «Актовегин» и мази «Бепантен» соответственно.

Таблица 37.

Влияние липосомального геля с серпистеном на прочность рубца

Образцы препаратов	Сила разрыва рубца, Н	
	На 5 сутки	На 7 сутки
Контроль	1,23±0,20	1,93±0,22
Липосомальный гель серпистена	2,92±0,51*	4,93±0,66*,**
Основа геля	1,94±0,20	2,80±0,32
Крем «Актовегин» 5%	3,23±0,17*	4,50±0,48*
Мазь «Бепантен» 5 %	2,29±0,16*	3,35±0,51*

Примечание:

\* – различие достоверно по сравнению с контролем при  $p \leq 0,02$ ;

\*\* – различие достоверно по сравнению с мазью «Бепантен» при  $p \leq 0,05$ .

Проведенными экспериментами установлено, что основа мази сама обладает выраженной регенерирующей активностью, сопоставимой с препаратами сравнения, в то время как основа липосомального геля достоверно не увеличивает прочность рубца по сравнению с контролем.

Следует учесть, что в препаратах сравнения концентрация действующих веществ (гемодеривата крови телят и декспантенола соответственно) составляет 5%, а в исследуемой мази и липосомальном геле 0,02%, что в 250 раз меньше. При этом мазь и липосомальный гель серпистена проявляют выраженный фармакологический эффект, сопоставимый с препаратами сравнения.

### **5.3.2. Оценка регенерирующей активности лекарственных форм серпистена на модели ожоговой раны**

Согласно с Методическими указаниями по изучению новых ранозаживляющих препаратов [67] наиболее адекватным методом оценки регенерирующего действия лекарственных форм для наружного применения является модель термического ожога. Следующим этапом исследования было изучение регенерирующего действия разработанных лекарственных форм фитоэкидстероидов серпухи венценосной на модели термического ожога у белых крыс. Методика исследования приведена в главе 2.

Животные были распределены на 4 группы по 8 белых крыс в каждой (3 опытных и 1 контрольная). Раны животных подопытных групп ежедневно обрабатывали разработанными образцами лекарственных форм фитоэкидстероидов серпухи венценосной. Наряду с этим на модели термического ожога осуществляли исследование препарата сравнения – крема «Актовегин». В контрольной группе обработку не производили. О темпах заживления раневых повреждений у крыс из разных групп судили по изменению площади раневой поверхности в условных единицах. Вычисляли степень заживления раны в процентах по отношению к исходной величине. Оценивали состояние раневой поверхности, сроки отторжения первичного струпа и полного заживления. Результаты приведены в приложении 8.

Наблюдения за общим состоянием животных показали, что в течение эксперимента не происходило изменения двигательной активности, питьевого и пищевого поведения. Общее состояние животных в течение эксперимента было удовлетворительным – крысы были активными, бодрыми, имели хороший аппетит.

В опытных группах гибели животных не отмечено. В контрольной группе и подопытной группе, где ожоговые раны обрабатывались кремом «Актовегин», погибло по 1 крысе, что составляет 12,5% от численности группы. Гибель животных наблюдалась на 25-й и 20-й дни эксперимента соответственно.

Динамика массы животных в течение срока наблюдения представлена в табл. 37. Значительного естественного прироста массы не обнаружено. В период с 15 по 25 сутки эксперимента отмечено некоторое снижение средних показателей массы, однако эти изменения не являются статистически достоверными и, очевидно, не обусловлены развитием ожоговой болезни, интоксикацией продуктами распада тканей или действием лекарственных веществ. Снижение массы происходило в период заживления, когда происходило отторжение первичного струпа и рост грануляционной ткани что соответствует II-III фазам раневого процесса.

Таблица 37

Результаты оценки массы животных в течение эксперимента (n=8)

Исследуемый образец	Масса животных, г						
	Исх.	5 сут.	10 сут.	15 сут.	20 сут.	25 сут.	30 сут.
Мазь серпиסתена	264,7±3,5	273,5±5,1	261,0±5,9	267,0±5,7	257,5±2,5	253,0±6,4	270,6±5,3
Липосомальный гель серпиסתена	247,5±19,9	274,3±18,6	262,5±18,2	255,5±17,1	269,3±18,3	239,3±16,2	243,9±15,9
«Актовегин»	250,6±15,0	265,7±16,9	253,6±17,1	248,7±20,3	252,3±19,6	245,3±19,5	252,4±19,2
Контроль	232,8±15,8	269,5±17,9	257,5±19,8	248,3±20,1	240,7±21,4	254,7±16,2	254,8±16,2

Результаты измерений площади раневой поверхности представлены на рис. 41 и 42.

Состояние экспериментальных ожоговых ран оценивалось визуально. У контрольных (нелеченных) животных через сутки после нанесения травмы происходило образование плотного струпа серо-бурого цвета, с выраженными воспалительными изменениями окружающих тканей, с последующим ограничением зоны некроза четкой демаркационной линией. Местами струп отслаивался по линии демаркации с обильными сукровично-фибринозными выделениями.

На 7-10 сутки наблюдался процесс частичного отторжения струпа, раневая поверхность покрывалась фибринозно-гнойным отделяемым. Отмечался некроз подлежащих тканей – фасций, мышц, подкожной клетчатки. К 15 суткам наблюдения в контрольной группе отмечено полное или частичное отторжение раневого струпа. Полость раны содержала гнойное отделяемое, некротизированные ткани. Выраженное нагноение ран наблюдалось у 50% животных в группе. Отмечались воспалительные изменения окружающих мягких тканей. На 20 сутки у большинства животных данной группы раневая поверхность очищалась от некротизированных тканей. Воспалительные изменения окружающих тканей умеренные. Наблюдался рост грануляционной ткани, эпителизация от краев раны. Процесс краевой эпителизации происходил несколько медленнее, чем при применении для лечения ожоговых ран исследуемых препаратов и препаратов сравнения в других экспериментальных группах. Полное заживление раневого дефекта наблюдалось только в 12,5% случаев.

В группе животных, на раны которых наносили крем «Актовегин», течение процесса заживления происходило так же, как в контрольной группе, несколько отличаясь по срокам. Через сутки после нанесения ожога раневая поверхность покрывалась плотным струпом серовато-бурого цвета. Окружающие рану ткани были гиперемизированными, отечными. На 10-й день наблюдения у части животных происходило отторжение ожогового струпа, очищение раневой поверхности и краев раны от некротизированных тканей. Раневое отделяемое не обильное, воспалительные изменения окружающих тканей умеренные.

На 15-20 сутки эксперимента раневая полость постепенно заполнялась грануляционной тканью бледно-серого цвета. Эпителизация происходила с краев раны медленно, раневое отделяемое скудное. К 30 суткам наблюдения заживление происходило вторичным натяжением, у части животных раневая поверхность покрывалась тонкой корочкой, образованной раневым отделяемым. Окружающие ткани умеренно воспалены. Полное заживление раневого дефекта зарегистрировано у 28,6% выживших животных этой группы.

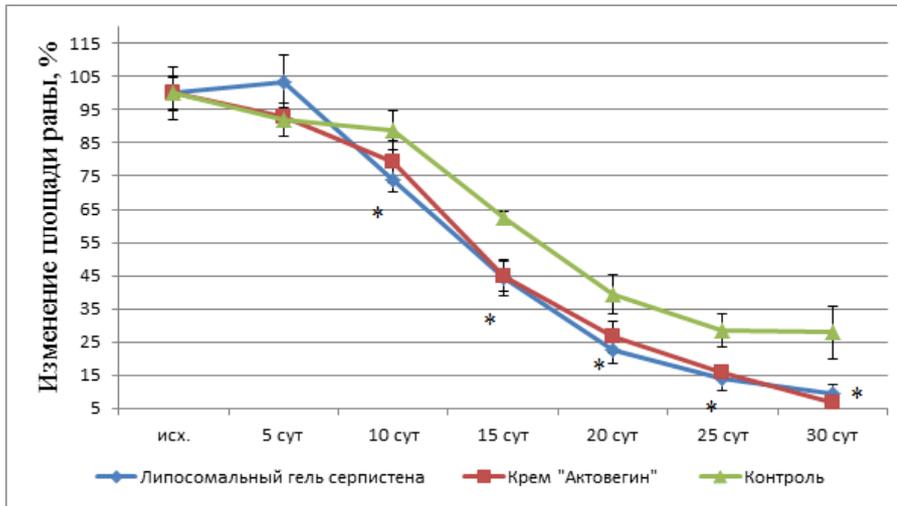


Рис. 41. Динамика заживления ожоговых ран кожи крыс под влиянием липосомального геля с серпиסתеном.

Примечание:

\* – различие достоверно по сравнению с контролем при  $p \leq 0,1$ .

У животных опытной группы, получавших липосомальный гель с серпиסתеном в виде местных аппликаций, на 5 сутки наблюдения происходило увеличение площади ожоговой поверхности по сравнению с исходной величиной, затем площадь ран быстро уменьшалась.

Через сутки после моделирования ожогов происходило разрушение всех слоев кожи с образованием открытой раны. Раневая поверхность покрывалась некротизированной тканью – фасциями, мышцами, подкожной клетчаткой. В это время отмечалось увеличение площади раны по сравнению с исходной величиной. В период с 10 до 15 суток наблюдалось отторжение ожогового струпа у большинства животных подопытной группы с последующим очищением раневой поверхности и краев раны от некротизированных тканей. В это время происходило образование грануляционной ткани. Наблюдались воспалительные изменения окружающих рану мягких тканей. Нагноений раны в данной экспериментальной группе не отмечено.

Наиболее заметное снижение площади поверхности отмечено к 15 суткам наблюдения. В конце эксперимента уменьшение площади раневой поверхности достоверно отличалось от контроля, что говорит о выраженном регенерирующем действии липосомального геля с серпиסתеном. На 20-е сутки наблюдения

происходило полное очищение ожоговой поверхности от некротических тканей и заполнение раневой полости грануляционной тканью. К 30-ым суткам эксперимента заживление ран у всех животных, пролеченных липосомальным гелем с серпишеном, протекало вторичным натяжением. Раневая полость заполнялась грануляционной тканью бледно-розового цвета, эпителизация происходила от краев раны тонким ободком. Окружающие мягкие ткани характеризовались отсутствием воспалительных изменений. Полное заживление раны к концу срока наблюдения отмечалось у 25% животных, получавших липосомальный гель серпишена.

Динамика заживления ожогов у животных, которым наносили аппликации мази серпишена, проходила аналогично заживлению ран в опытной группе, пролеченной липосомальным гелем серпишена.

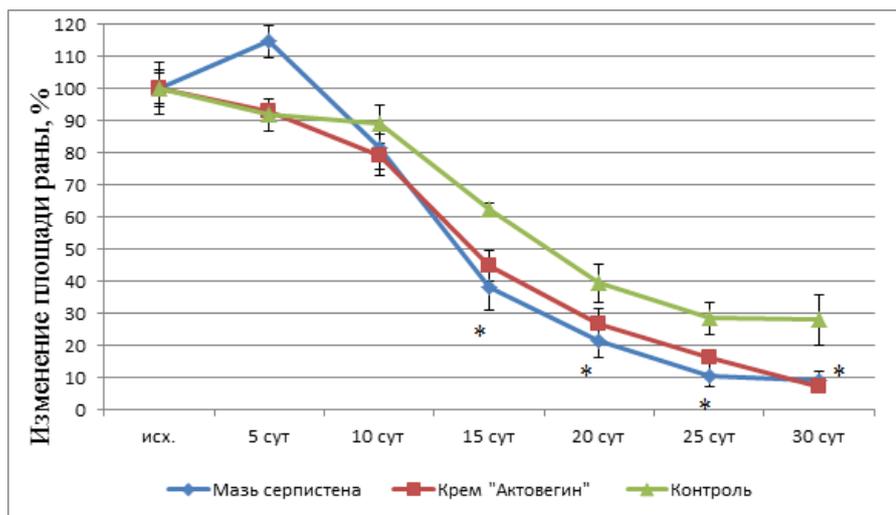


Рис. 42. Динамика заживления ожоговых ран кожи крыс под влиянием мази серпишена.

Примечание:

\* – различие достоверно по сравнению с контролем при  $p \leq 0,1$ .

К концу срока наблюдения полное заживление ожоговой раны отмечалось у 3 особей, что соответствует 37,5 % животных в опытной группе.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов на модели термического ожога установлено, что лекарственные формы с серпишеном, уменьшают время отторжения струпа на 5 дней, предотвращают инфицирование

раны, гибель подопытных животных и в 2-3 раза увеличивают количество случаев полного заживления раны по сравнению с контролем.

Результаты биологических экспериментов показывают, что мягкие лекарственные формы с серпистеном не уступают по эффективности мягким лекарственным формам зарубежного производства: мази «Бепантен» и крему «Актовегин».

### **Выводы по главе 5**

1. В ходе изучения токсического и местно-раздражающего действия лекарственных форм серпистена установлено, что они являются безвредными, не обладающими кумулятивным и раздражающим действиями. Наименьшим раздражающим эффектом на слизистую глаза кролика обладает липосомальный гель серпистена.
2. При изучении регенерирующего действия на модели линейной асептической раны выявлено, что мягкие лекарственные формы обладают репаративным действием: рубец при применении мази и липосомального геля с серпистеном достоверно становится прочнее на 307,8 % и 255,4 % по отношению к контролю соответственно. Прочность рубца при использовании липосомального геля серпистена на 7-ые сутки после нанесения травмы выше, чем у основы на 76,1 %, выше крема «Актовегин» и мази «Бепантен» на 9,4 % и 47,2 % соответственно, для мази серпистена значения следующие 8,2 %, 31,9 % и 77,3 %.
3. В ходе проведения регенерирующей активности на модели ожоговой раны установлено, что выживаемость в контрольной группе и группе сравнения составила 87,5 %, в опытных группах - 100 %. Применение мягких лекарственных форм с серпистеном ускоряет отторжение струпа на 5 дней по отношению к контролю. В контрольной группе у 50 % животных отмечались случаи нагноения ран, в опытных группах нагноения не наблюдалось.

4. Ежедневные аппликации мягких лекарственных форм с серпистеном в 2-3 раза увеличивают число случаев полного заживления ожоговых поверхностей по сравнению с контролем.
5. Результаты биологических экспериментов показывают, что мягкие лекарственные формы с серпистеном не уступают по эффективности мягким лекарственным формам зарубежного производства: мази «Бепантен» и крему «Актовегин».

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. С учетом физико-химических свойств серпистена проведен комплекс технологических, реологических и биофармацевтических исследований по выбору и оптимизации состава мази, который позволил приблизить водородный показатель мази к рН кожи человека, добиться параметров, входящих в реологический оптимум для дерматологических мазей (0,34–108 Па\*с), увеличить степень высвобождения серпистена из МЛФ с 64 % до 78 %.
2. Разработан методика качественного и количественного определения серпистена в мази спектрофотометрическим способом с открываемостью  $98,85 \pm 3,41$  %. Проведенный статистический анализ установил, что выбранный метод является специфичным, правильным, прецизионным и линейным. Коэффициент корреляции равен 0,997. Изучением стабильности мази серпистена установлен срок годности 24 мес при температуре хранения (+12-+15) °С в алюминиевых тубах (срок наблюдения).
3. С использованием метода гидратации тонкой липидной пленки и последующей ультразвуковой обработкой получены МОЛ с включенным серпистеном. Зависимость между ФПД и диаметром липосом в диапазоне 70-140 нм с коэффициентом корреляции линейности, превышающей 0,95, может быть использована для технологического контроля процесса гомогенизации.
4. В результате изучения параметров гомогенизации выбран состав вспомогательных веществ, позволяющих получать МОЛ со степенью включения серпистена  $88,75 \pm 0,15$  %, со средним диаметром 71 нм, индексом полидисперсности 0,263,  $\zeta$ -потенциалом -34,7 мВ. Диализом липосомального геля подтверждена стабильность липосомальной структуры.
5. С помощью технологических и реологических исследований подобран рациональный состав геля, содержащего МОЛ с серпистеном. Теоретически и экспериментально обоснован выбор карбопола 940 в концентрации 1 % в качестве гелеобразователя. Исследование стабильности липосомального геля позволило установить срок годности 12 мес при температуре хранения +2 - +8 °С в алюминиевых тубах (срок наблюдения).

6. Сравнительными экспериментами установлено, что липосомальный гель с серпистеном при инстилляции в конъюнктивальный мешок не вызывает ощущения дискомфорта у кроликов. На модели линейной раны установлено, прочность рубца мази серпистена на 8,2 % выше, чем у основы, в случае липосомального геля – на 76,1 %. Изучение регенерирующего действия на модели термического ожога выявило, что по динамике заживления, выраженности воспаления мазь и липосомальный гель с серпистеном не уступают крему Актовегин.

7. Предложены рациональные технологические схемы и контролируемые параметры критических стадий получения мази и липосомального геля серпистена. Разработаны проект ФСП и лабораторный регламент на производство мази серпистена 0,02 %, которые апробированы на базе ОАО «Татхимфармпрепараты» (акт внедрения от 24 марта 2015 г).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность и искреннюю признательность за научное руководство, идею настоящей работы, поддержку и помощь при планировании и выполнении исследований доктору фармацевтических наук, профессору Молоховой Е. И. и доктору биологических наук, профессору Володину В. В.

Автор считает своим долгом выразить благодарность ректору ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России доктору фармацевтических наук, профессору Одеговой Т. Ф., заведующему кафедрой промышленной технологии лекарств с курсом ботехнологии доктору медицинских наук, профессору Казьянину А. В., сотрудникам научного отдела филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» доктору биологических наук Николаевой А. М.; старшему научному сотруднику, кандидату фармацевтических наук Иванову А. В.; доценту кафедры фармацевтической химии очного обучения, кандидату фармацевтических наук Кирилловой Р. В.; доценту кафедры физиологии с основами патологии, кандидату биологических наук Чащиной С. В., проректору по НИР Института экологии и генетики микроорганизмов ПНЦ УрО РАН доктору медицинских наук, профессору Шмагелю К. В., сотрудникам лаборатории инструментальных методов анализа Института экологии и генетики микроорганизмов ПНЦ УрО РАН, сотрудникам Института органического синтеза имени А. С. Постовского (г. Екатеринбург), сотруднику лаборатории биохимии и биотехнологии растений Института биологии Коми научного центра УрО РАН за помощь, оказанную при подготовке диссертации.

Искренне благодарю сотрудников кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА за помощь, ценные советы и замечания. Выражаю признательность Фонду содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере за финансовую поддержку.

Выражаю благодарность моей семье за понимание, помощь и поддержку.

Большое спасибо всем, кто оказал помощь и содействие при выполнении диссертации!

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Абдукадиров, И. Т. Разработка технологии производства препаратов аюстан, эксумид, гарпахол из растения *Ajuga turkestanica* : автореф. на дис. ...канд. техн. наук : 02.00.10 / И. Т. Абдукадиров. – Ташкент, 2007. – 22 с.
2. Андреева, Л. И. Воздействие нового экистероидсодержащего препарата Серпистен на поведенческую активность и формирование клеточной адаптации у крыс при тепловом стрессе / Л. И. Андреева, А. А. Бойкова, А. А. Быкова // Теорет. и прикладн. экология. – 2012. – №1. – С. 36–43.
3. Антимикробная активность нативных экистероидов растения *Serratula coronata* L. и некоторых их ацильных производных / Т. И. Ширшова [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, № 5. – С. 34–36.
4. Ахметова, Т. А. Обоснование оптимума реологических параметров глазных гелей / Т. А. Ахметова, С. Н. Егорова // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 43–45.
5. Ахназарова, С. Л. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии : учеб. пособие для хим.-технол. спец. вузов / С. Л. Ахназарова, В. В. Кафаров. – изд. 2-е, перераб. и доп. – Москва : Высшая школа, 1985. – 327 с.
6. Базаркина, О. В. Разработка новой лекарственной формы с ранозаживляющей и противовоспалительной активностью / О. В. Базаркина, О. А. Семкина, Е. И. Грибкова // Рос. науч. мир. – 2013. – № 2. – С. 5-16.
7. Балтаев, У. А. Фитоэкистероиды из *Rhaponticum carthamoides* / У. А. Балтаев, Н. К. Абубакиров // Химия природн. соединений. – 1987. – № 5. – С. 681–684.
8. Борщевский, Г. И. Стандартизация технологии изготовления липосомальной формы рекомбинантного интерферона альфа-2b / Г. И. Борщевский, С. И. Дихтярев // Фармаком. – 2009. – № 3. – С. 53–58.
9. Ботанико-фармакогностический словарь : Справочное пособие / К. Ф. Блинова [и др.] ; Под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. – Москва : Высшая школа, 1990. – 272 с.
10. Ветошева В.И. Влияние Серпистена на продуктивность памяти пациентов с ограниченными изменениями коронарных сосудов мозга / В. И. Ветошева, А. Е.

Попов, С. О. Володина, В. В. Володин // Теорет. и приклад. экология. – 2012. – №1. – С.62–65.

11. Володин, В. В. 20-гидроксиэкдизон – растительный адаптоген: анаболическое действие, возможное использование в спортивном питании / В. В. Володин, Ю. С. Сидорова, В. К. Мазо // Вопросы питания. – 2013. - № 6. – С. 24–30.

12. Володин, В. В. Стресс-протекторное действие экдистероидсодержащей субстанции Серпистен / В. В. Володин В. Н. Сыров, З. А. Хушбактова // Теорет. и прикладн. экология. – 2012. – №1. – С. 18–24.

13. Володин, В. В. Экдистероидсодержащие растения – источники новых адаптогенов / В. В. Володин, С. И. Матаев // Вест. биотех. физ.-хим. биологии. – 2011. – Т. 7, № 2. – С. 52-59.

14. Володин, В. В. Экдистероиды в интактных растениях и клеточных культурах : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.12 / В. В. Володин. – Москва, 1999. – 207 с.

15. Володина, С. О. Ресурсы, биотехнология и использование экдистероидсодержащих растений / С. О. Володина, В. В. Володин, И. Ф. Чадин // Известия Самарского науч. центра Российской академии наук. – 2010. – Т. 12, № 1(3). – С. 668–674.

16. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) (обзор) / О. А. Семкина [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2005. – Т. 39, № 9. – С. 45–48.

17. ВФС РК 42-1265-06. Серпухи венценосной, трава. – Б. м. – 7 с.

18. Горбунов, С. М. Устройство для определения прочности на разрыв заживающих ран / С. М. Горбунов, И. В. Заиконникова, Н. Г. Абдрахманова // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике. – Йошкар-Ола. – 1979. – С. 100-104.

19. ГОСТ 12.1.005-88, Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

20. Государственный вторичный эталон единиц дисперсных параметров взвесей нанометрового диапазона / О. В. Карпов, Д. М. Балаханов, Е. В. Лесников, Д. А. Данькин // Измерительная техника. - 2011. - № 2. - С. 3-6.
21. Грошовый Т.А. Применение методов планирования эксперимента для оптимизации технологий лекарственных форм // Фармация.-1986.- Т.33.- №6.- С.48-53.
22. Дармограй, С. В. Фармакогностическое изучение травы волдырника ягодного (*Cucubalus baccifer* L.) и мягковолосника водяного (*Myosoton aquaticum* (L.) Moench : дис. ...канд. фармац. наук : 14.04.02 / С. В. Дармограй. – Ярославль, 2013. – 219 с.
23. Демина, Н. Б. Мягкие лекарственные формы фурациллина: влияние типа лекарственной формы и вспомогательных веществ / Н. Б. Демина, М. Н. Анурова, Е. О. Бахрушина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 4 (5). – С. 22–28.
24. Закирова, Р. П. Возможность повышения содержания экидистероидов в каллусных и суспензионных культурах клеток *Ajuga turkestanica* за счет использования индуцированного морфогенеза / Р. П. Закирова, И. Т. Абдукадыров, М. Р. Якубова // Биотехнология. – 2012. – № 3. – С. 44-47.
25. Зибарева, Л. Н. Фитоэкидистероиды растений семейства *Caryophyllaceae* : автореф. дис. ... д-ра хим. наук : 02.00.10 / Л. Н. Зибарева. – Томск, 2003. – 25 с.
26. Иванов, А. В. Разработка и использование адъювантов на основе наночастиц в технологии вакцинных препаратов : дис. ...канд. фармац. наук : 14.04.01 / А. В. Иванов. – Пермь, 2013. – 148 с.
27. Иванов, А. В. Разработка и использование адъювантов на основе наночастиц в технологии вакцинных препаратов : автореф. на дис. ...канд. фармац. наук : 14.04.01 / А. В. Иванов. – Пермь, 2013. – 25 с.
28. Изучение качественного состава и содержания экидистероидов дикорастущей в Монголии и интродуцированной в Западную Сибирь *Silene repens* / Н. Мунхжаргал [и др.] // Химия раст. сырья. – 2009. – № 4. – С. 133–138.

29. Изучение нанокапсул кремнийорганической природы, используемые для трансдермальной доставки активных субстанций / И. А. Базиков [и др.] // Вестник Российской Академии естественных наук. – 2012. № 1. – С. 81-83.
30. Исследование химического состава Серпухи венценосной, культивируемой в Сибири / А.С.Ангаскиева [и др.] // Химия раст. сырья. – 2003. – №4. – С. 47–50.
31. Касимова, Д. И. Экдистероидсодержащее растение *Stemakantha serratuloides* и его адаптация к условиям прозрания / Д. И.Касимова, Ф.З.Хайбуллина // Биоантиоксидант : тезисы докладов VIII междунар. конф. (Москва, 4-6 окт. 2010 г.). – Москва, 2010. – С. 199–200.
32. Качество липосом фосфолипидов на этапах технологического процесса / Е. В. Санарова [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2012. – Т. 46, № 3. – С. 50-54.
33. Количественное определение экдистерона в капсулах «Экдифит» / А. Н. Жаббаева, А. С. Адекенова, Ш. Д. Биланова, Х. И. Итжанова // Фармац. бюллетень. – 2012. - № 4-6. – С. 94-97.
34. Краснопольский, Ю. М. Перспективы получения наноразмерных противоопухолевых липосомальных лекарственных препаратов / Ю. М. Краснопольский, А. Е. Степанов, В. И. Швец // Нанотехнологии в онкологии : тез. докл. III Всерос. науч. конф. с междунар. участием, Москва, 30 окт. 2010 г. – Москва, 2010. – С. 49–53.
35. Кузякова, Л. М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2005. – Т. 46, № 1. – С. 74–79.
36. Куркумов, А. Г. Влияние экдистерона на экспериментальные аритмии, изменение гемодинамики и сократимости миокарда, вызванные окклюзией коронарной артерии / А. Г. Куркумов, О. А. Ермишина // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т. 54, № 1. – С. 27-29.
37. Лафон, Р. Фитоэкдистероиды и мировая флора: разнообразие, распределение и эволюция // Физиология растений. – 1998. – Т. 45. – С. 326–346.

38. Легеза, В.И. Актуальные вопросы экспериментального моделирования термических ожогов кожи / В. И. Легеза, В. Н. Хребтович, Е. В. Зиновьев // Патолог. физиология и эксперим. терапия. – 2004. – № 3. – С. 25–28.
39. Маймескулова, Л. А. Антиаритмический эффект фитоадаптогенов / Л. А. Маймескулова, Л. Н. Маслов // Эксперим. и клин. фармакология. – 2000. – Т. 63, № 4. – С. 29-31.
40. Малкин, А. Я. Реология: концепции, методы, приложения / А. Я. Малкин, А. И. Исаев. – Санкт-Петербург : Профессия, 2010. – 557 с.
41. Манджиголадзе, Т. Ю. Определение осмотической активности исследуемых мазей с экстрактами робинии и солодки / Т. Ю. Манджиголадзе, Н. А. Романцова // Здоровье и образование в XXI веке. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 366-367.
42. Мунхжаргал, Н. Экдистероидсодержащие растения Западной монголии (скрининг, химический состав, перспективы использования) : автореф. на дис. ...канд. биол. наук : 03.00.05;03.00.12 / Н. Мунхжаргал. – Томск, 2009. – 19 с.
43. Новосельская, И. Л. Фитоэкдистероиды *Serratula coronata* / И. Л. Новосельская, М. Б. Горовиц, Н. К. Абубакиров // Химия природ. соединений. – 1981. – №5. – С. 668–669.
44. Одинокоев, В. Н. Новые и необычные трансформации экдистероидов / В. Н. Одинокоев, И. В. Галяутдинов, А. Ш. Ибрагимова // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Москва, 23–28 сентября 2007. Тезисы докладов. С. 61.
45. Оптимизация технологии адсорбционного вагинального геля методом реологии / Т.В. Романко [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2010. – Т. 44, № 7. – С. 40–43.
46. ОСТ 29188.3-91. Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии. – Введ. 01.01.93. – Москва : Издательство стандартов, 1992. – 4 с.
47. Оценка гипогликемического действия фитоэкдистероидов / В. Н. Сыров [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2012. – Т. 75, № 5. – С. 28-31.

48. Парамонов, Б.А. Методы моделирования термических ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения / Б. А. Парамонов, В. Ю. Чеботарев // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. – 2002. – № 11. – С. 593–597.
49. Пат. 2119331 Рос. Федерация : МПК<sup>6</sup> А61К9/06, А61К 35/78. Средство для лечения ожоговых ран "Витадерм" / В. Н. Дармограй [и др.]. – №96104062/14 ; заявл. 29.02.96 ; опубл. 27.09.98, Изобрет. № 27. – 6 с.
50. Пат. 2141816 Рос. Федерация : МПК<sup>6</sup> А61К7/26, А61К35/78. Средство для лечения заболеваний пародонта и травматических повреждений слизистой оболочки полости рта «Виспосил» / В. Н. Дармограй [и др.]. – №98101617/14 ; заявл. 13.01.98 ; опубл. 27.11.99, Изобрет. № 26. – 5 с.
51. Пат. 2153346 Рос. Федерация МПК<sup>7</sup> А61К35/78 Способ получения экдистероидов / В. В. Володин, С. О. Володина. – №99106351/14 ; заявл. 29.03.99 ; опубл. 27.07.00, Изобрет. № 23. – 7 с.
52. Пат. 2168979 Рос. Федерация МПК<sup>7</sup> А61К7/26, А61К7/18, А61К6/00. Средство для лечения заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта «Валеодонт» / В. Н. Дармограй, Н. В. Курякина, А. Ю. Архипенко, С. В. Дармограй. – №2000100545/14 ; заявл. 10.01.2000 ; опубл. 20.06.2001, Изобрет. №27. – 6 с.
53. Пат. 2173980 Рос. Федерация МПК<sup>7</sup> А61К7/26, А61К35/78. Средство для лечения глубокого кариеса и пульпита зубов / В. Н. Дармограй, Н. В. Курякина, О. В. Арефьева, Г. В. Дубоделова. – №2000108886/14 ; заявл. 10.04.2000 ; опубл. 27.09.2001, Изобрет. №14. – 8 с.
54. Пат. 2337698 Рос. Федерация МПК А61К36/28, А61Р3/10. Противодиабетическое средство с гипополипидемической активностью для лечения и профилактики сахарного диабета II типа / В. В. Володин, С. О. Володина. – № 2007104249/15 ; заявл. 06.02.2007 ; опубл. 10.11.2008, Изобрет. № 30. – 5 с.
55. Пат. 2337701 Рос. Федерация МПК А61К36/28, А61Р9/10 Гипополипидемическое и противоишемическое средство «Серпистен» / В. В. Володин, С. О. Володина. – № 2007104250/15 ; заявл. 06.02.2007 ; опубл. 10.11.2008, Изобрет. № 31. – 10 с.

56. Пат. 7060693 В1 US : МПК<sup>6</sup> А61К 31/56. *Ajuga turkestanica* extract and its cosmetic uses / M. Dumas, F. Bonte, C. Gondran. – 10/130788 ; заявл. 24.11.00 ; опубл. 31.05.01, Изобрет. № 27. – 8 с.
57. Петрова, Н. Б. Антиагрегационное и стресс-лимитирующее действие экидистероидсодержащей субстанции серпистен / Н. Б. Петрова // Теорет. и прикладн. экология. – 2012. – №1. – С.48–54.
58. Повышение растворимости экидистерона / А. К. Назаров [и др.] // Фармация. – 2014. – № 5. – С. 35–38.
59. Политова, Н. К. Химическая модификация экидистероидов: результаты и перспективы / Н. К. Политова, Е. А. Пшунетлева // Вестн. Ин-та биологии Коми НЦ УрО РАН. – 2001. – № 3. – С. 2–5.
60. Получение культуры трансформированных корней *Rhaponticum carthamoides* / И. В. Орлова [и др.] // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 3. – С. 397–400.
61. Получение субстанции Экидистерон-80 из *Serratula coronata* L. и оценка ее фармакологического действия. I. Адаптогенная, гастропротекторная, термопротекторная и антигипоксическая активность субстанции / В. В. Пунегов [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2008. – Т. 42, № 8. – С. 6–11.
62. Получение субстанции Экидистерон-80 из *Serratula coronata* L. и оценка ее фармакологического действия. II. Кардиопротекторные свойства. Влияние субстанции на гормонально-медиаторный баланс в условиях хронической сердечной недостаточности / В. Н. Федоров [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2009. – Т. 43, № 1. – С. 17–21.
63. Пшунетлева, Е. А. Синтез ацильных производных 20-гидроксиэкидизона и липосомы на их основе : автореф. на дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / Е. А. Пшунетлева. – Москва, 2000. – 22 с.
64. Ревина, Т. А. Экидистероидсодержащие виды во флоре Горного Алтая / Т. А. Ревина, А. С. Ревушкин, А. В. Ракитин // Раст. ресурсы. – 1988. – Т. 24, № 3. – С. 565–570.

65. Репях, С. М. Влияние химических и физических факторов на рост и развитие каллусных тканей левзеи сафлоровидной / С. М. Репях, Е. В. Юшкова, Н. А. Величко // Биотехнология. – 1996. – № 8. – С. 45–49.
66. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. Москва : — Спорт и Культура - 2000, 2007. 192 с.
67. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.
68. Савченко, Л. Н. Разработка состава и технологии стоматологической мази с экстрактом шалфея густым / Л. Н. Савченко, Т. Ф. Маринина, А. С. Саушкина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 817-820.
69. Сидорова, Ю. С. Физиолого-биохимическая оценка *in vivo* адаптогенных свойств фитоэкдистероидсодержащего экстракта серпухи венценосной : дис. ...канд. биол. наук : 03.01.04 / Ю. С. Сидорова. – Москва, 2014. – 115 с.
70. Слепнев, М. В. Технология экстемпоральных мазей с применением редкосшитых акриловых полимеров : дис. ...канд. фармац. наук : 15.00.01 / М. В. Слепнев. – Санкт-Петербург, 2004. – 148 с.
71. Слепнев, М. В. Технология экстемпоральных мазей с применением редкосшитых акриловых полимеров : автореф. на дис. ...канд. фармац. наук : 15.00.01 / М. В. Слепнев. – Санкт-Петербург, 2004. – 23 с.
72. Смагулова, Ф. М. Фармакогностическое изучение *Serratula coronata* L., разработка и стандартизация препарата «Экдифит» : автореф. на дис. ...канд. фармац. наук : 15.00.02 / Ф. М. Смагулова. – Алматы, 2008. – 22 с.
73. Современные мягкие лекарственные формы, содержащие фитопрепараты / В. Ф. Охотникова [и др.] // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. – 2013. – № 11. – С. 121–126.
74. Сочетанное влияние витаминно-минерального комплекса Витабаланс-мультивит и БАД «Серпистен» на физическую работоспособность лыжников-гонщиков высокой квалификации / Е. Р. Бойко [и др.] // Спорт и медицина. Сочи-2013 : Сб. материалов IV Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Сочи,

- 19–22 июня 2013 г) ; Под. общ. ред. М. П. Бердниковой, С. Е. Павлова. – Сочи, 2013. – С. 34–36.
75. Страдомский, Б. В. Экспериментальная и клиническая фармакология мазевых форм Стелланина (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида). – 2-е изд., исп. и доп. / Б. В. Страдомский, Ю. Ю. Солодунов. – Ростов-на-Дону : Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – 89 с.
76. Странски, К. Липидный состав семян у содержащего экистероиды вида растений *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC (Asteraceae) / К. Странски, В. Немец, К. Слама // Физиология растений. – 1998. – Т. 45, № 3. – С. 390–396.
77. Сыров, В. Н. Лекарственные препараты на основе природных соединений из флоры Центрально-Азиатского региона / В. Н. Сыров, Ш. Ш. Сагдуллаев // Химия и медицина : тез. докл. IX Всерос. конф. с молодежной науч. школой по органич. химии (Уфа-Абзаково 4-8 июня 2013 г.) – Уфа, 2013. – С. 23.
78. Сыров, В. Н. Сравнительное изучение анаболической активности фитоэкистероидов и стеранаболов в эксперименте // Хим.-фармац. журн. – 2000. – Т.34, № 4. – С.31-34.
79. Сыров, В. Н. Сравнительное изучение регулирующего влияния экистерона и ретаболила на белоксинтезирующие процессы в организме высших животных / Г. А. Шахмурова, З. А. Хушбактова, В. Н. Сыров // Теорет. и прикладн. экология. - 2012.- №1.- с. 13-17
80. Табриз, Н. С. Эффективность фитопрепарата «Экдифит» в комплексном лечении туберкулеза // Альманах соврем. науки и образования. – 2010. – № 3, Ч. 1. – С. 83–85.
81. Трансформации экистероидов при гидридном восстановлении и каталитическом гидрировании / Р. Г. Савченко, Р. В. Шафиков, С. Р. Афонькина, В. Н. Одинокоев // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Москва, 23–28 сентября 2007. Тез. докл. С. 410.
82. Усманов, Б. З. Фитоэкидионы *Ajuga turkestanica*. III. Структура туркестерона / Б.З. Усманов, М. Б. Горовиц, Н. К. Абубакиров // Химия природ. соединений. – 1975. - № 4. – С. 466-470.

83. Фармакологическая оценка новой экистероидсодержащей субстанции «Серпистен» / В. В. Володин [и др.] // Раст. ресурсы. – 2006. – Т. 42, Вып. 3. – С. 113–130.
84. Фармакопейная статья 42-1995- 99 Левзеи экстракт жидкий. – Москва, 1999.
85. Фармакопейная статья 42-2702-99 Корневище с корнями рапontiкума сафлоровидного (левзеи сафлоровидной). – Москва, 1999.
86. Фармакопейная статья предприятия 42-0382-7834-06 Рапontiкума сафлоровидного (Левзеи) экстракт. – Москва, 2006.
87. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. С. Н. Быковского, И. А. Василенко, Н. Б. Деминой, И. Е. Шохина, О. В. Новожилова, А. П. Мешковского, О. Р. Спицкого. – Москва : Изд-во Перо, 2015. – 472 с.
88. Фитоэкистероиды / Л. И. Алексеева [и др.] ; под ред. В. В. Володина. – Санкт-Петербург : Наука, 2003. – 293 с.
89. Фитоэкистероиды в надземной части дальневосточных видов *Scrophyllaceae* / Е. В. Новожилова, В. Г. Рыбин, П. Г. Горовой, И. Г. Гавриленко // *Turczaninowia*.–2014. – Т. 17, Вып. 2. – С. 42–48.
90. ФС 42У-200/20-285-97. Лецитин стандарт / М-во здравоохранения Украины, Фармакопейный комитет. – [Б. м.], 1997. – 7 с.
91. Хаджиева, З. Д. Исследования по выбору оптимальной мазевой основы наружной лекарственной формы для лечения атопического дерматита / З. Д. Хаджиева, З. Б. Тигиева // *Фундам. исследования*. – 2010. – № 11. – С. 155-158.
92. Химическая модификация 20-гидроксиэкидизона и исследование мембранотропных свойств его производных / Н. К. Политова [и др.] // *Химия раст. сырья*. – 2001. - № 2. С. 69-81.
93. Шахмурова, Г. А. Иммуномодулирующая и стресс-протективная активность фитоэкистероидов экистерона и туркестерона при иммобилизационном стрессе у мышей / Г. А. Шахмурова, В. Н. Сыров, З. А. Хушбактова // *Хим.-фармац. журн.* – 2010. – Т. 44, № 1. – С. 9–11.

94. Экдистероиды в культурах клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* // В.Н. Филиппова [и др.] // Химия раст. сырья. – 2002. – № 1. – С. 57–62.
95. Экдистероиды культуры тканей и клеток *Ajuga turkestanica* / С. В. Лев [и др.] // Химия природн. соединений. – 1990. - № 1. С. 51-52.
96. Экдистероиды растений Урала, Кавказа, российского Дальнего Востока и Китая (выборочный скрининг) / С. О. Володина [и др.] // *Turczaninowia*.–2012. – Т. 15, Вып. 4. – С. 58–73.
97. Экспериментальная оценка действия фитоэкдистероидов на процессы перекисного окисления липидов печени крыс при проведении опытов *in vitro* и *in vivo* / З. А. Хушбактова, А. В. Царук, В. М. Гукасов, В. Н. Сыров // Теорет. и прикладн. экология. – 2012. – № 1. – С. 20-23.
98. Ярных, Т. Г. Разработка и стандартизация мази «Дермалик» / Т. Г. Ярных, О. А. Гаркавцева, В. Н. Чушенко // Хим.-фармац. журн. – 2011. – Т. 45, № 12. – С. 41-44.
99. 2-Acetyl- and 3-acetyl-29-norcyasterone, new minor phytoecdysteroids from *Ajuga reptans* (Labiatae) / F. Camps [et al.] // *J. Chem. Res. (S.)*. – 1985. – Issue 1. P. 14-15.
100. Acharya, N. S. Phytosomes: novel approach for delivering herbal extract with improved bioavailability / N. S. Acharya, G. V. Parihar, S. R. Acharya // *Pharma science monitor: an international journal of pharmaceutical sciences*. – 2011. – Vol. 2, Issue 1. – P. 144–160.
101. AgingSkin: protective effect of silymarin- phytosome / E. Bombardelli [et al.] // *Fitoterapia*. – 1991. – Vol. 62, Issue 1. – P. 115-122.
102. An antimicrobial ecdysonone from *Asparagus dumosus* / V. U. Ahmad [et al.] // *Fitoterapia*. – 1996. – Vol. 67, Issue 1. – P. 88–91.
103. An overview of phytosomes as an advanced herbal drug delivery system / J. Patel, R. Patel, K. Khambholja, N. Patel // *Asian journal of pharmaceutical sciences*. – 2009. – Vol. 4, Issue 6. – P. 363–371.

104. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica* / N. Z. Mamadalieva [et al] // *Phytopharmacology*. – 2013. – Vol. 4, Issue 1. – P. 1-18.
105. Bathori, M. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans / M. Bathori, Z. Pongracz // *Current medicinal chemistry*. – 2005. - Vol. 12, № 2. – P. 153-172.
106. Cancer chemopreventive agents (antitumour promoters) from *Ajuga decumbens* / M. Takasaki, H. Tokuda, H. Nishino, T. Konoshima // *Journal of natural products*. – 1999. – Vol. 62. – P. 972 – 975
107. Chen, Q. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro/ Q. Chen, Y. Xia, Z. Qiu // *Life Sciences*. – 2006. – Vol. 78.– P. 1108–1113
108. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine / T. H. Marczylo [et al.] // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2007. – Vol. 60. – issue 2. – P. 171-177.
109. Complexes between phospholipids and vegetal derivatives of biological interest / E. Bombardelli [et al.] // *Fitoterapia*. – 1989. – Vol. 60, Issue 1. – P. 1-9.
110. Development and characterization of nanovesicles containing phenolic compounds of microalgae *Spirulina* strain LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa* / L. M. de Assis [et al.] // *Advances in materials physics and chemistry*. – 2014. – Vol. 4. – P. 6–12.
111. Dinan, L. A strategy for the identification of ecdysteroid receptor agonists and antagonists from plants // *European Journal of Entomology*. – 1995. – № 92. – P. 271–283.
112. Dinan, L. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals / L. Dinan, R. Lafont // *Journal of Endocrinology*. – 2006. – Vol. 191. - P. 1-8.
113. Dinan, L. Phytoecdysteroids: biological aspects // *Phytochemistry*. – 2001. – Vol. 57. – P. 325–339.
114. Dipierro, F. Composition Comprising Ginkgo Biloba Derivatives For Treatment of Asthmatic and Allergic Conditions Patent No. EP1813280, 2007.

115. Ecdysteroid production in tissue cultures of *Polypodium vulgare* / F. Camps [et al.] // *Phytochemistry*. – 1990. – Vol. 29. – P. 3819-3821.
116. Ecdysteroids from the roots of *Leuzea carthamoides* / J. Pis [et al.] // *Phytochemistry*. – 1994. – Vol. 37, № 3. – P. 707–711.
117. Ecdysteroids Sensitize MDR and non-MDR cancer cell lines to doxorubicin, paclitaxel and vincristine but tend to protect them from cisplatin / A. Martins [et al.] // *BioMed Research International*. – Vol. 2015, Article 895360. – 8 p.
118. Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals / T. Yoshida, T. Otaka, M. Uchiyama, S. Ogawa // *Biochemical Pharmacology*. – 1971. – Vol. 20. – P. 3263–3268.
119. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation / R. Silva, H. Ferreira, C. Little, A. Cavaco-Paulo // *Ultrasonics sonochemistry*. – 2010. – Vol. 17, Issue 3. – P. 628-632.
120. Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes in vitro / M. Detmar [et al.] // *Eur. J. Dermatol.* – 1994. – V.4. – P.558–562.
121. Effects of vitamin D<sub>3</sub> and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation / A. Kuzmenko [et al.]. – *Biochemistry (Moscow)*. – 1997. – Vol. 62, № 7. P. 609–612.
122. Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes / C. R. Dass, T. L. Walker, M. A. Burton, E. E. Decruz // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1997. – Vol. 49. – Issue 10. – P. 972–975.
123. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats: a comparative study / K. Maiti [et al.] // *Iranian journal of pharmacology and therapeutics*. – 2005. – Vol. 4, Issue 2. – P. 84-90.
124. Esposito, E. Ethosomes and liposomes as topical vehicles for azelaic acid: a preformulation study / E. Esposito, E. Menegatti, R. Cortes // *J. Cosmet. Sci.* – 2004. – Vol. 55, № 3. – P. 253-264.
125. Evaluation of herbal ointments formulated with methanolic extract of *Cajanus scarabaeoides* / S. Pattanayak [et al.] // *Journal of pharmacy and allied health sciences*. – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 49-57.

126. Fathalla, D. Development and in vitro/in vivo evaluation of liposomal gels for the sustained ocular delivery of latanoprost / D. Fathalla, G. M. Soliman, E. A. Fouad // *Journal of clinical and experimental ophthalmology*. – 2015. – Vol. 6, Issue 1. – 9 pp.
127. Formulation and evaluation of topical liposomal gel for fluconazole / B. V. Mitkari, S. A. Korde, K. R. Mahadik, C. R. Kokare // *Indian journal of pharmaceutical education and research*. – 2010. – Vol. 44, Issue 4. – P. 324–333.
128. Freeze-drying of liposomes using tertiary butyl alcohol/water cosolvent systems / J. Cui [et al.] // *International journal of pharmaceutics*. – 2006. – Vol. 312, Issue 1-2. – P. 131-136.
129. Gibis, M. Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract / M. Gibis, N. Rahn, J. Weiss // *Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 5. – P. 421-433.
130. Gorelick-Feldman, J. Ecdysteroids elicit a rapid  $\text{Ca}^{2+}$  flux leading to Akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells / J. Gorelick-Feldman, W. Cohick, I. Raskin // *Steroids*. – 2010. – Vol. 75, № 10. – P. 632-637.
131. Hairy root biotechnology of *Rauwolfia serpentina*: a potent approach for the production of pharmaceutically important terpenoid indole alkaloids / S. Mehrotra, M. K. Goel, V. Srivastava, L. U. Rahman // *Biotechnology letters*. – 2015. – Vol. 37, Issue 2. – P. 253-263.
132. Honary, S. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 1) / S. Honary, F. Zahir // *Tropical journal of pharmaceutical research*. – 2013. – Vol. 12, № 2. – P. 255-264.
133. <http://www.ecdybase.org>
134. Huber, R. Die kristall- und molekülstrukturanalyse des insektenverpuppungshormones ecdysonmit der automatisiertenfaltmolekülmethode / R. Huber, W. Hoppe // *Chemische Berichte*. – 1965. – № 98. – P. 2403–2404.
135. In vitro incorporation of radiolabelled cholesterol and mevalonic acid into ecdysteroid by hairy root cultures of a plant, *Serratula tinctoria* / J. P. Delbecque, P. Beydon, L. Chapuis, M. F. Corio-Costet // *Eur. J. Entomol.* – 1995. – Vol. 92. – Issue 1. – P. 301-307.

136. In vivo and in vitro evaluation of octyl methoxycinnamate liposomes / A. de Carvalho Varjão Mota [et al] // International journal of nanomedicine. – 2013. – Vol. 8, Issue 1. – P. 4689-4701.
137. Kidd, P. M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts // Alternative medicine review. – 2009. – Vol. 14, № 3. – P. 226-246.
138. Kuzmenko, A. I. New functions of 20-hydroxyecdysone in lipid peroxydation / A. I. Kuzmenko, E. Niki, N. Noguchi // Journal of oleo science. – 2001. – Vol. 50. – P. 497-506.
139. Lafont, R. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update / R. Lafont, L. Dinan // Journal of Insect Science.– 2003. – article 7. – 30 pp.
140. Lafont, R. Recent progress in ecdysteroid pharmacology // Теорет. и приклад. экология. – 2012. – № 1. – С. 6–12.
141. Lagova, N. Effect of ecdysterone isolated from *Rhaponticum carthamoides* on the growth of experimental tumours / N. Lagova, I. Valueva // Experimental Oncology. – 1981. – Vol. 3. – P. 69–71.
142. Li, C. A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions / C. Li, Y. Deng // Journal of pharmaceutical sciences. – 2004. – Vol. 93, Issue 6. – P. 1403-1414.
143. Liposome Technology. Third Edition. Vol. II Entrapment of Drugs and Other Materials into Liposomes. Edited by G.Gregoriadis. New York, 397 p.
144. Liposomes as novel drug delivery system: a comprehensive review / N. V. Dhandapani [et al.] // International journal of research in pharmaceutical sciences. – 2013. – Vol. 4, Issue 2. – P. 187-193.
145. Macek, T. *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Bracken Fern): In vitro culture and the production of ecdysteroids / T. Macek, T. Vanek // Biotechnology in agriculture and forestry ; Ed. I. Bajaj. – Berlin : Heidelberg, 1994. - Vol. 26. Medicinal and aromatic plants VI. – P. 299-315.

146. Mamadalieva, N. Z. Diversity of secondary metabolites in the genus *Silene* L. (Caryophyllaceae) – structures, distribution, and biological properties / N. Z. Mamadalieva, R. Lafont, M. Wink // *Diversity*. – 2014. – Vol. 6, Issue 3. – P. 415-499.
147. Mamadalieva, N. Z. In vitro biological activities of the components from *Silene wallichiana* / N. Z. Mamadalieva, D. Egamberdieva, A. Tiezzi // *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*. – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 1–7.
148. Mamadalieva, N. Z. Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant) activities // *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. – 2012. – Vol. 11, № 6. – P. 474–497.
149. McMorris, T. C. Ecdysones from gametophytic tissues of a fern / T. C. McMorris, B. Voeller // *Phytochemistry*. – 1971. – Vol. 10. – P. 3253-3254.
150. Mertins, O. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. part I: Effect of polymer deprotonation / O. Mertins, R. Dimova // *Langmuir*. – 2013. – Vol. 29, Issue 47. – P. 14545- 14551.
151. Najmutdinova, D. K. Lung local defense in experimental diabetes mellitus and the effect of 11,20-dihydroxyecdysone in combination with Maninil / D. K. Najmutdinova, Z. Saatov // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 1999. – Vol. 41, Issue 3. – P. 144-147.
152. Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications / T. S. Gechev [et al.] // *Biotechnology advances*. – 2014. – Vol. 32, Issue 6. – P. 1091–1101.
153. Nyamoita, M, G, Toxicity of individual and blends of pure phytoecdysteroids isolated from *Vitex schliebenii* and *Vitex payos* against *Anopheles Gambiae* S.S. larvae // *World journal of organic chemistry*. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 1-5.
154. Patent EP 0436650 МКИ А 61 К №7/00. Meybeck A., Bonté F. Phases lamellaires lipidiques hydratees on liposomes a base d'ecdysteroides. №8812909; Заявл. 03.10.88; Опубл. 17.07.91. Bull. №91/29.

155. Patent US 2009/01313738 A 1МКИ А 61 К № 36/685, С 07 F № 9/10. Giori A., Franceschi F. Phospholipid complexes of curcumin having improved bioavailability. №12/281994; Заявл. 01.12.2008; Опу́бл. 21.05.2009.
156. Patent US 2010/0068318 A 1МКИ А 61 К № 36/63, А 61 P № 39/00, А 61 P № 36/06. Giori A., Franceschi F. Phospholipid complexes of olive fruits or leaves extracts having improved bioavailability. №12/296696; Заявл. 06.04.2007; Опу́бл. 18.03.2010. Bull. №95/29.
157. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects / N. Barzaghi [et al.] // European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. – 1990. – Vol. 15. – Issue 4. – P. 333-338.
158. pH-induced in situ gelling system of an anti-infective drug for sustained ocular delivery / A. Malik, S. Satyananda // Journal of applied pharmaceutical science. – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 101-104.
159. Phytoecdysteroids of *Silene guntensis* and their in vitro cytotoxic and antioxidant activity / N. Z. Mamadaliyeva [et al.] // Zeitschrift fur Naturforschung C. – 2011. – Vol. 66, № 5-6. – P. 215–224.
160. Phytosome: phytolipid drug delivery system for improving bioavailability of herbal drug / A. Patel, Y. S. Tanwar, R. Suman, P. Patel // Journal of pharmaceutical sciences and bioscientific research. – 2013. – Vol. 3, Issue 2. – P. 51–57.
161. Polyphenols: food sources and bioavailability / C. Manach [et al] // American journal of clinical nutrition. – 2004. – Vol. 79, Issue 5. – P. 727–747.
162. Post-exercise effect of anabolic drug on blood cell apoptosis / U. N. Kapysyeva [et al.] // European researcher. – 2013. – Vol. 38, № 1, Part 1. – P. 5–10.
163. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents / S. M. Mortazavia, M. R. Mohammadabadib, K. Khosravi-Daranic, and M. R. Mozafari // Journal of biotechnology. – 2007. – Vol. 129. – Issue 4. – P. – 604-613.
164. Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method / K. Otake [et al.] // Langmuir. – 2006. – Vol. 22, Issue 6. – P. – 2543-2550.

165. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art / A. Laouini [et al.] // *Journal of colloid science and biotechnology*. – 2012. – Vol. 1. – P. 147–168.
166. Preparative size exclusion chromatography combined with detergent removal as a versatile tool to prepare unilamellar and spherical liposomes of highly uniform size distribution / M. Holzer, S. Barnert, J. Momm, R. Schubert // *Journal of Chromatography A*. – 2009. Vol. 1216, issue 31. – P. 5838- 5848.
167. Production of ecdysteroids by plant cell culture of *Pteridium aquilinum* / T. Vanek, T. Macek, T. Vaisar, A. Breznovits // [Biotechnology Letters](#). – 1990. – Vol. 12. – N 10. – P. 727-730.
168. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet / A.-S. Foucault [et al.] // *Physiology and behavior*. – 2014. – Vol. 128. – P. 226 – 231.
169. Ragged Robin (*Lychnis flos-cuculi*) - a plant with potential medicinal value / M. P. Malinski [et al] // *Brazilian journal of pharmacognosy*. – 2014. – Vol. 24, Issue 6. – P. 722-730.
170. Rheological study of a liposomal hydrogel based on carbopol / A. Ortan [et al] / *Romanian biotechnological letters*. – 2011. – Vol. 16, № 1. – P. 47-54.
171. Rudolphi-Skórska, E. Mechanical and electrokinetic effects of polyamines/phospholipid interactions in model membranes / E. Rudolphi-Skórska, M. Zembala, M. Filek // *The journal of membrane biology*. – 2014. – Vol. 247, Issue 1. – P. 81-92.
172. Saonere Suryawanshi, J. A. Phytosome: an emerging trend in herbal drug treatment // *Journal of medical genetics and genomics*. – 2011. – Vol. 3, Issue 6. – P. 109–114.
173. Schroepfer, G. J. Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes // *Physiological reviews*. – 2000. – Vol. 80 – P. 361–554.
174. *Serratula coronata* L. и *Ajuga reptans* L. – продуценты экидистероидов в культуре *in vitro* / Э. Н. Ануфриева, Л. А. Ковлер, Н. А. Колегова, В. В. Володин. – Сыктывкар, 1995. – 28 с.

175. Silymarin production by hairy root culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn / H. Rahnama, T. Hasanloo, M. R. Shams, R. Sepehrifar // *Iranian journal of biotechnology*. – 2008. – Vol. 6. – N 2. – P. 113–118.
176. Singh, A. Design, development and characterization of liposomal neem gel / A. Singh, P. Vengurlekar, S. Rathod // *International journal of pharma sciences and research*. – 2014. – Vol. 5, Issue 4. – P. 140-148.
177. The minor ecdysteroids from *Ajuga turkestanica* / L. Guibout [et al] // *Phytochemical analysis*. – 2015. – Vol. 26, Issue 5. – P. 293-300.
178. Therapeutic and antilipoperoxidant effects of silybin-phosphatidylcholine complex in chronic liver disease: preliminary results / S. Mascarella [et al.] // *Current therapeutic research*. – 1993. – Vol. 53, Issue 1. – P. 98–102.
179. Thermoresponsive ophthalmic poloxamer/tween/carbopol in situ gels of a poorly water-soluble drug fluconazole: preparation and in vitro–in vivo evaluation / W. Lihong [et al] // *Drug development and industrial pharmacy*. – 2014. – Vol. 40, № 10. – P. 1402-1410.
180. Tseomashko, N. Comparison the proliferative activity of phytosteroids on the cancerous cell cultures and civilized cell culture of fibroblasts / N. Tseomashko, Sh. Azimova // *Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach*. – Titusville : L&L Publishing, 2012. – Vol. 1. – P. 118-119.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора  
по развитию ОАО «Татхимфармпрепараты»

Анисимов А.Н.

2015 г.

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся: заместитель генерального директора по развитию ОАО «Татхимфармпрепараты» Анисимов А.Н., начальник исследовательского отдела ОАО «Татхимфармпрепараты» Филиппов Ю.В., начальник технологической лаборатории исследовательского отдела ОАО «Татхимфармпрепараты» Степанова Н.В., начальник аналитической лаборатории исследовательского отдела ОАО «Татхимфармпрепараты» Хуснутдинова Р.Ф., составили настоящий акт о проведении апробации проектов ФСП на «Серпистен, мазь 30 г» и лабораторного регламента на производство «Серпистен, мазь 30 г», разработанных аспирантом кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Д.Е. Липиным и профессором кафедры промышленной технологии лекарств д.фарм.н. Е.И. Молоховой на базе ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

Опытная партия соответствует требованиям проекта ФСП. Полученные результаты могут быть использованы для создания опытно-промышленного регламента и внедрения в производство с использованием стандартного оборудования.

Начальник исследовательского  
отдела ОАО «Татхимфармпрепараты»

Филиппов Ю.В.

Начальник технологической лаборатории  
исследовательского отдела  
ОАО «Татхимфармпрепараты»

Степанова Н.В.

Начальник аналитической лаборатории  
исследовательского отдела  
ОАО «Татхимфармпрепараты»

Хуснутдинова Р.Ф.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе  
ГБОУ ВПО «Пермская государственная  
фармацевтическая академия» Минздрава России,  
профессор, д.ф.н. И.В.Алексеева  
« » \_\_\_\_\_ 2014 г.

АКТ

**внедрения результатов диссертационной работы  
Липина Даниила Евгеньевича**

на тему «Разработка состава, технологии и стандартизация мягких лекарственных форм, содержащих фитоэкдистероиды *Serratula coronata* L.» в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии

**Объект внедрения:** результаты научных исследований Д.Е. Липина по разработке состава и технологии мягких лекарственных форм с фитоэкдистероидами *Serratula coronata* L.

**Разработчики:** аспирант кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Д.Е. Липин, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Е.И. Молохова.

**Место использования:** практическое занятие «Мягкие лекарственные формы. Технологические и аппаратурные схемы производства мазей и суппозиторий. Стандартизация. Реология» по курсу промышленной технологии на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

**Пользователи:** студенты 4 курса очного обучения ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

**Когда внедрено:** март 2014 года.

**Эффективность внедрения:** материалы диссертационной работы, представленные в виде практического занятия «Определение технологических показателей геля карбопола». Целью работы является изучение влияния физико-химического показателя рН на реологические параметры гелей на основе карбопола; приобретение практических умений по определению рН в мягких лекарственных формах и анализу полученных результатов. В задачи работы входит: получение гелей карбопола марок 940 в концентрациях 0,5, 0,75 и 1%; проведение испытания полученных гелей согласно ГОСТ 29188.2.-91; интерпретация результатов о влиянии рН на вязкость гелей карбопола.

Практическое занятие «Определение технологических показателей геля карбопола» дает теоретические знания о современных гелеобразователях, вырабатывает у студентов навыки по подбору оптимального состава, по технологии современных гелей и по определению водородного показателя в мягкой лекарственной форме.

Зав. кафедрой промышленной  
технологии лекарств с курсом  
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА,  
профессор, д.ф.н.



Е.В. Орлова

Методист курса промышленной  
технологии кафедры промышленной  
технологии лекарств с курсом  
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА,  
доцент, к.ф.н.



Н.А. Ковязина

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе  
ГБОУ ВПО «Пермская государственная  
фармацевтическая академия» Минздрава России,  
профессор, д.ф.н.  И.В.Алексеева  
« » \_\_\_\_\_ 2014 г.

АКТ

**внедрения результатов диссертационной работы**

**Липина Даниила Евгеньевича**

на тему «Разработка состава, технологии и стандартизация мягких лекарственных форм, содержащих фитостероиды *Serratula coronata* L.» в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии

**Объект внедрения:** результаты научных исследований Д.Е. Липина по разработке состава и технологии мягких лекарственных форм с фитостероидами *Serratula coronata* L.

**Разработчики:** аспирант кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Д.Е. Липин, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Е.И. Молохова.

**Место использования:** лекция «Нанотехнологии в получении лекарственных форм» по курсу промышленной технологии на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

**Пользователи:** студенты 5 курса очного обучения ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ.

**Когда внедрено:** ноябрь 2013 года.

**Эффективность внедрения:** материалы диссертационной работы, представленные в лекции, позволяют приобрести теоретические знания по основным терминам и понятиям, используемым в нанотехнологии; исторической справке развития и областей применения нанотехнологий в медицине и фармации; адресной доставке лекарственных веществ; классификации наночастиц по морфологическим особенностям строения; по технологическим аспектам получения нанопрепаратов в фармации; номенклатуре современных лекарственных средств на основе носителей.

Зав. кафедрой промышленной  
технологии лекарств с курсом  
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА,  
профессор, д.ф.н.



Е.В. Орлова

Методист курса промышленной  
технологии кафедры промышленной  
технологии лекарств с курсом  
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА,  
доцент, к.ф.н.



Н.А. Ковязина

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_

Дата регистрации « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное  
удостоверение, адрес)

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

ФСП 42-

Серпистен

(торговое наименование лекарственного препарата)

---

международное непатентованное или химическое наименование

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ООО «КОМИБИОФАРМ»

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ООО «КОМИБИОФАРМ»

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

**СЕРПИСТЕН**

Содержит не менее 75% 20-гидроксиэкдизона, не менее 11% 25S-инокостерона, не менее 7% экдизона.

**Описание.** Белый или белый с кремовым оттенком аморфный порошок, без запаха, слабо горького вкуса.

**Растворимость.** Легко растворим в спирте 70%, растворим в хлороформе, мало растворим в воде.

**Подлинность.** Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора (раздел «Количественное определение») должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора рабочего стандартного образца серпистена.

**Удельное вращение.**

**Прозрачность раствора.** Раствор 0,5 г субстанции в 50 мл спирта должен быть прозрачным или выдерживать сравнения с эталоном 1.

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании Прозрачность раствора, должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном В<sub>9</sub>.

**pH.** От 6,0 до 8,0 (0,1 г субстанции растворяют в 50 мл спирта 70%).

**Посторонние примеси.**

**Сульфатная зола и тяжелые металлы.** Сульфатная зола из 1 г (точная навеска) не должна превышать 0,2% и должна выдерживать испытание на тяжелые металлы (не более 0,001% в субстанции).

**Мышьяк.** 0,25 г субстанции должны выдерживать испытания на мышьяк (не более 0,0003%).

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Остаточные органические растворители».

**Потеря в массе при высушивании.** Около 0,5 г субстанции (точная навеска) сушат при температуре 105 °С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 0,5 %.

**Сульфатная зола и тяжелые металлы.** Сульфатная зола и з 1г (точная навеска) субстанции не должна превышать 0,1 % и должна выдерживать испытание на тяжелые металлы (не более 0,001 % в субстанции).

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Определение проводят методом ВЭЖХ.

Приготовление подвижной фазы. 134,45 мл ацетонитрила и 25,21 мл тетрагидрофурана помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и смешивают водой очищенной, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. Около 0,02 г субстанции серпистена (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор. Около 0,02 г рабочего стандартного образца серпистена (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Хроматографические условия:

Колонка	150×4 мм с гексадецилсилил силикагелем (С16), 8 мкм;
Подвижная фаза	вода очищенная–ацетонитрил–тетрагидрофуран (100 : 16 : 3);
Скорость потока	1 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 254 нм;
Объем пробы	10 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение между пиками 20-гидроксиэкдизона и 25S-инокостерона должно быть не менее 5,0.

Пять раз хроматографируют стандартный раствор. Относительное стандартное отклонение для площади пика 20-гидроксиэкдизона должно быть не более 2,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор и стандартный раствор.

Содержание серпистена в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot (100 - w)}, \text{ где}$$

$S_1$  – площадь пика 20-гидроксиэкдизона на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 20-гидроксиэкдизона на хроматограмме стандартного раствора;

$a_1$  – навеска субстанции, г;

$a_0$  – навеска стандартного образца серпистена, г;

$w$  – потеря в массе при высушивании, %;

$P$  – содержание 20-гидроксиэкдизона в стандартном образце серпистена, %.

**Хранение.** В сухом месте.

## МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_

Дата регистрации « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное  
удостоверение, адрес)

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

ФСП 42-

Мазь серпистена 0,02%

(торговое наименование лекарственного препарата)

---

 международное непатентованное или химическое наименование
Мазь для наружного применения 30 г

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

 СПЕЦИФИКАЦИЯ  
 Мазь серпистена 0,02%

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
------------	--------	-------

Однородность по внешнему виду	Визуальный	Мягкая эластичная гомогенная матовая мазь от белого до белого с желтоватым оттенком цвета со слабым характерным запахом
Масса содержимого упаковки	Гравиметрический	Средняя масса содержимого 10 туб должна быть не менее 30 г, масса содержимого каждой тубы должна быть не менее 27 г.
рН водного извлечения	Потенциометрический (ГФ XII, Ч. 1. С. 89-92)	От 5,7 до 6,0
Вязкость	Ротационная вискозиметрия	70,0 – 100,0 Па*с
Идентификация	Спектрофотометрический (ГФ XII, Ч. 1. С. 56-61)	На УФ-спектре поглощения испытуемого раствора, полученного в разделе «Количественное определение», в области 220-350 нм должен иметь максимум при длине волны $250 \pm 2$ нм
	Хроматографический (ГФ XII, Ч. 2. С. 42-48)	Испытуемый раствор в системе растворителей хлороформ-метанол 5:1 на пластинках Silufol UV-254 должен обладать фактором удерживания 0,24
Количественное определение серпистена	Спектрофотометрический (ГФ XII, Ч. 1. С. 56-61)	Содержание серпистена должно быть 0,18 – 0,22 мг в 1,0 г мази
Микробиологическая чистота	Биологический (ГФ XII, Ч. 1. С. 160-180)	Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более 100 в 1 г мази; не более 10 энтеробактерий в 1 г мази; отсутствие бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г мази
Упаковка.		В алюминиевые тубы по 30 г, с контролем первого вскрытия и пластмассовой

		крышкой. 1 туба с инструкцией по применению помещается в картонную пачку.
Маркировка		В соответствии с ФСП
Хранение		При температуре от 12°C до 15°C
Срок годности		2 года

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Для служебного пользования

И. о. ректора ГБОУ ВПО ПФА Росздрава  
проф., д. фарм. н. Алексеева И. В.



### ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство мази с серпистеном 30 г

Срок действия регламента до «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

19. ГОСТ 17768-90. Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение. – Взамен ГОСТ 17768– 80 ; введ. 1992–01–01. – Москва : Издательство стандартов, 1991. – 11 с.
20. Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением ПБ 10-115-96. (С изменениями и дополнениями, утвержденными Госгортехнадзором России 02 сентября 1997 г.).

Профессор кафедры промышленной  
технологии лекарств с курсом  
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА  
Минздрава России, доктор фарм.  
наук

 Е. И. Молохова

Аспирант кафедры промышленной  
технологии лекарств с курсом  
биотехнологии ГБОУ ВПО ПГФА  
Минздрава России

 Д. Е. Липин

**ПРОТОКОЛ № 1**  
**исследования регенерирующей активности лекарственных форм**  
**серпистена**

Дата 29.12.2013

Помещение (месторасположение) экспериментальная лаборатория кафедры физиологии, температура 19 °С, время 12.00.

**Экспериментальные животные:**

Вид	крысы
Линия, порода	беспородные
Количество	48
Пол	♂, ♀
Масса	180-250 г
Возраст	3 мес
Откуда получены	виварий ПГФА
Содержание до эксперимента:	
Помещение	виварий ПГФА
Освещенность	естественная, искусственная
Температура	(20,4±1,0) °С
Вентиляция	приточно-вытяжная
Клетки	пластмассовые
количество животных в клетке	10
Кормление	натуральные корма в соотв. с установленными нормами
обеспеченность водой	+
частота чисток клеток	ежедневно
Содержание во время эксперимента:	
Помещение	экспериментальная лаборатория каф. физиологии
Освещенность	естественная, искусственная
Температура	19,8±1,2°С
Вентиляция	приточно-вытяжная
Клетки	пластмассовые
Рандомизация	выбор в соотв. с массой
количество животных в группе	6 в опытных, 8 в контрольной
количество животных в клетке	6/8
Кормление	в соотв. с установленными нормами
обеспеченность водой	+
частота чисток клеток	ежедневно
Этический стандарт	соблюдается СанПиН №1045-73
Утилизация животных после эксперимента	в установленном порядке

**Объекты исследования:**

Наименование	Модельный образец мази серпистена	Модельный образец липосомального геля серпистена
Кафедра	Промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии	Промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии
Исполнитель	Липин Д. Е.	Липин Д. Е.
Характеристика	Мазь выполнена на дифильной основе, представляют собой однородную массу бледно-желтого цвета, устойчив при стоянии, при нанесении на кожу равномерно распределяется	Прозрачный гидрофильный гель со слегка голубоватым оттенком, устойчив при стоянии, при нанесении на кожу равномерно распределяется
Количество	30 г	30 г
Хранение	в прохладном темном месте	в прохладном темном месте
Вид активности	Регенерирующая	Регенерирующая
Утилизация	в установленном порядке	в установленном порядке

### *Средства сравнения*

Наименование	Модельный образец мазевой основы	Модельный образец липосомальной гелевой основы
кафедра	Промышленной технологии с курсом биотехнологии	Промышленной технологии с курсом биотехнологии
Характеристика	представляют собой однородную массу белого с желтоватым оттенком цвета, устойчива при стоянии, при нанесении на кожу равномерно распределяется	Представляет собой однородную прозрачную массу с голубоватым оттенком, устойчива при стоянии, при нанесении на кожу равномерно распределяется
Количество	30 г	30 г
Хранение	в сухом, защищенном от света месте	в сухом, защищенном от света месте
Утилизация	в установленном порядке	в установленном порядке

### *Средства сравнения*

Наименование	Актовегин крем 5%	Бепантен мазь 5%
Изготовитель	«Никомед ГмбХ», Австрия	ЗАО «Байер», Германия
Форма	крем для наружного применения 5%	мазь для наружного применения 5%
Характеристика	однородный крем белого цвета	эластичная гомогенная непрозрачная мазь бледно- желтого цвета со слабым запахом
Количество	20 г	30 г
Хранение	в сухом, защищенном от света месте	в сухом, защищенном от света месте
Вид активности	Регенерирующая	Регенерирующая
Утилизация	в установленном порядке	в установленном порядке

### Дизайн исследования (описание и схема дизайна)

Моделирование линейной асептической раны кожи
Ежедневная обработка ран животных подопытных групп исследуемыми композициями, мазевой основой и препаратами сравнения
Определение прочности рубца на разрыв на 5 и 7 сутки эксперимента
Регистрация показателей

**Выбор экспериментальных животных.** Для изучения регенерирующей активности использованы белые нелинейные крысы-самцы массой 180-250 г. Необходимо, чтобы опытную и контрольную группы составляли животные одного возраста, пола, массы, полученные одновременно из одного питомника и содержащиеся в одинаковых условиях. Для получения стабильных и достоверных результатов на каждое исследование взято по 6 животных.

**Методика исследования.** Влияние на заживление линейных асептических ран кожи исследовано ранотензиометрическим методом. Под кратковременным эфирным наркозом фиксировали животное, выстригали шерсть, производили 2 разреза кожи до подкожной клетчатки и зашивали раны рядом узловых швов. Раны животных подопытных групп ежедневно обрабатывали исследуемыми составами мази и липосомального геля. В двух контрольных группах раны обрабатывали мазевыми основами аналогичного состава, в одной контрольной группе обработку не производили. В качестве препаратов сравнения использовали крем «Актовегин» и мазь «Бепантен».

На 5-е и 7-е сутки после операции определяли силу разрыва рубца в опытных и контрольных группах. О ранозаживляющем действии мазей судили по изменению прочности послеоперационного рубца на разрыв по сравнению с контролем.

### Результаты исследования ранозаживляющей активности

**на модели линейной асептической раны**

Исследуемый образец	Сила разрыва рубца, г.	
	На 5 сутки	На 7 сутки
Крем с фитоэкидестероидами Серпухи венценосной	355	550
	395	620
	110	54
	255	695
	270	740
	305	380
		440
		800
		590
	580	
M±m	281,6±40,4	593,5±40,7
Основа	185	425
	175	370
	80	595
	145	710
	175	485
	205	705
M±m	160,8±18,0	548,3±58,8
Липосомальный гель с фитоэкидестероидами Серпухи венценосной	95	450
	560	470
	215	365
	276	295
	155	240
	240	500
	510	925
	285	475
	295	780
	425	
M±m	292,3±50,8	492,5±66,3
Основа	225	325
	215	413
	260	240
	155	225
	185	280
	125	195
M±m	194,2±20,1	279,7±32,4
Крем «Актовегин»	295	610
	315	430
	285	440
	375	310
	345	460

M±m	323,0±16,5	450,0±47,8
Мазь «Бепантен»	235	265
	240	285
	200	150
	245	210
	170	357
	205	450
	305	455
		630
M±m	228,6±16,2	334,7±51,1
Контроль (без обработки)	90	110
	112	240
	135	240
	85	160
	195	140
		279
		190
		260
	115	
M±m	123,4±20,0	192,7±21,5

**Метод статистического анализа полученных результатов** Результаты экспериментов с опытной и контрольной группами обрабатывались и сравнивались статистически с использованием критерия Стьюдента при  $p \leq 0,05$ .

**Заключение.**

Все изученные композиции и препараты сравнения оказывают выраженный ранозаживляющий эффект на модели линейных ран кожи

Исполнители \_\_\_\_\_ Липин Д.Е.

к. биол. н. \_\_\_\_\_ Чащина С.В.

Зав. кафедрой,  
д.м.н, проф. \_\_\_\_\_ Сыропятов Б. Я  
Дата 29.12.2013

**ПРОТОКОЛ № 2****исследования ранозаживляющей активности лекарственных форм с серпистеном**Дата 30.12.2013Помещение (месторасположение) экспериментальная лаборатория кафедры физиологии, температура 19<sup>0</sup>С, время 12.00.**Экспериментальные животные:**

Вид	Крысы
Линия, порода	Беспородные
Количество	32
Пол	♂
Масса	190-330 г
Возраст	3 мес
Откуда получены	виварий ПГФА
Содержание до эксперимента:	
Помещение	виварий ПГФА
Освещенность	естественная, искусственная
Температура	20,4±1,0 <sup>0</sup> С
Вентиляция	приточно-вытяжная
Клетки	Пластмассовые
количество животных в клетке	10
Кормление	натуральные корма в соотв. с установленными нормами
обеспеченность водой	+
частота чисток клеток	Ежедневно
Содержание во время эксперимента:	
Помещение	экспериментальная лаборатория каф. физиологии
Освещенность	естественная, искусственная
Температура	19,8±1,2 <sup>0</sup> С
Вентиляция	приточно-вытяжная
Клетки	Пластмассовые
Рандомизация	выбор в соотв. с массой
количество животных в группе	8 в опытных, 8 в контрольных
количество животных в клетке	8
Кормление	в соотв. с установленными нормами
обеспеченность водой	+
частота чисток клеток	Ежедневно
Этический стандарт	соблюдается СанПиН №1045-73
Утилизация животных после эксперимента	в установленном порядке

**Объекты исследования:**

Наименование	Модельный образец	Модельный образец
--------------	-------------------	-------------------

	крема с фитостероидами Серпухи венценосной	липосомального геля с фитостероидами Серпухи венценосной
Кафедра	Промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии	Промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии
исполнитель	Липин Д.Е.	Липин Д.Е.
Характеристика	Крем выполнен на дифильной основе, представляют собой однородную массу бледно-желтого цвета, устойчив при стоянии, при нанесении на кожу равномерно распределяется	Прозрачный гидрофильный гель со слегка голубоватым оттенком, устойчив при стоянии, при нанесении на кожу равномерно распределяется
Количество	40 г	40 г
Хранение	в прохладном темном месте	в прохладном темном месте
Вид активности	ранозаживляющая	ранозаживляющая
Утилизация	в установленном порядке	в установленном порядке

### *Средства сравнения*

Наименование	Актовегин крем 5%
Изготовитель	«НикомедАвстрия ГмбХ» Австрия
Форма	крем для наружного применения 5%
Характеристика	однородный крем белого цвета
Количество	20 г
Хранение	в сухом, защищенном от света месте
Вид активности	Ранозаживляющая
Утилизация	в установленном порядке

### **Дизайн исследования** (описание и схема дизайна)

Моделирование ожоговой раны кожи
Ежедневная обработка ран животных подопытных групп исследуемыми мазями и препаратом сравнения
Измерение площади ожоговой раны через каждые 5 суток в течение 30 суток эксперимента
Регистрация показателей

**Выбор экспериментальных животных.** Для изучения ранозаживляющей активности использованы белые нелинейные крысы с исходной массой 190-330 г.

Необходимо, чтобы опытную и контрольную группы составляли животные одного возраста, пола, массы, полученные одновременно из одного питомника и содержащиеся в одинаковых условиях. Для получения стабильных и достоверных результатов на каждое исследование взято по 8 животных.

**Методика исследования.** Для оценки противоожогового действия мазей использована модель термического ожога кожи у крыс. Применен контактный высокотемпературный способ (устройство на основе электропаяльника. Ожоги спины III степени вызывали прикладыванием на 8с к предварительно депилированной коже разогретой до 200 °С медной пластины размером (2,0×2,0) см<sup>2</sup>. Об общем состоянии животных судили на основании оценки поведенческих реакций, аппетита, массы тела, выживаемости. Наблюдение за процессом заживления ожоговых ран проводили ежедневно, величину ожоговых дефектов измеряли через каждые 5 суток на протяжении исследования.

Раны животных подопытных групп ежедневно обрабатывали исследуемыми составами мази и липосомального геля. В контрольной группе обработку не производили. В качестве препарата сравнения использовали крем «Актовегин» 5%.

О темпах заживления раневых повреждений у крыс из разных групп судили, периодически снимая выкройки ран на пленку, взвешивая их и определяя площадь раны в условных единицах (граммах). Вычисляли степень заживления раны в процентах по отношению к исходной величине. Оценивали состояние раневой поверхности, сроки отторжения первичного струпа и полного заживления.

### Результаты оценки массы животных в течение эксперимента

Исследуемый	Масса животных, г
-------------	-------------------

образец	Исх.	5 сут.	10 сут.	15 сут.	20 сут.	25 сут.	30 сут.
Крем с фитоэкдистер оидами Серпухи венценосной	270	270	250	258	252	248	272
	272	280	270	284	264	258	276
	260	254	242	244	230	226	242
	260	284	282	286	280	286	290
	256	254	240	250	246	240	260
	270	290	270	270	268	258	268
	250	268	254	262	250	244	272
	280	288	280	282	270	264	286
M±m	264,7 ±3,5	273,5 ±5,1	261,0± 5,9	267,0± 5,7	257,5± 2,5	253,0± 6,4	270,6± 5,3
Липосомальн ый гель с фитоэкдистер оидами Серпухи венценосной	230	250	240	220	224	210	206
	320	364	360	340	364	322	326
	240	294	280	270	288	250	260
	210	230	226	228	232	216	214
	330	340	314	314	320	290	290
	230	254	240	244	270	232	240
	190	230	216	212	224	190	205
	210	232	224	216	232	204	210
M±m	247,5 ±19,9	274,3 ±18,6	262,5± 18,2	255,5± 17,1	269,3± 18,3	239,3± 16,2	243,9± 15,9
Крем «Актовегин»	218	227	210	208	200	198	215
	180	200	194	186	178	174	190
	292	310	300	294	284	275	296
	310	324	310	310	302	298	284
	245	250	240	226	220	204	192
	246	280	275	280	278	272	290
	232	220	200	172	пгб		
	282	315	300	314	304	302	300
M±m	250,6 ±15,0	265,7 ±16,9	253,6± 17,1	248,7± 20,3	252,3± 19,6	245,3± 19,5	252,4± 19,2
Контроль (без обработки)	252	288	280	270	268	262	260
	242	268	256	270	250	252	265
	168	190	160	150	132	пгб	
	275	310	318	308	300	284	290
	205	240	232	204	200	206	212
	306	358	340	326	326	330	330
	200	242	230	230	216	214	212
	214	260	244	230	234	235	236
M±m	232,8 ±15,8	269,5 ±17,9	257,5± 19,8	248,3± 20,1	240,7± 21,4	254,7± 16,2	254,8± 16,2

**Результаты исследования ранозаживляющей активности  
на модели ожоговой раны**

Исследуемый образец	Площадь ожоговой раны, усл. ед.						
	Исх.	5 сут.	10 сут.	15 сут.	20 сут.	25 сут.	30 сут.
Крем с фитоэкдистер оидами Серпухи венценосной	15	17	14	8	6	4	3
	14	16	7	2	1	0	0
	15	15	15	10	6	3	2
	12	16	11	3	1	0	0
	13	16	8	5	4	2	3
	12	12	12	7	3	2	1
	11	14	11	3	1	0	0
	18	19	10	4	2	1	1
M±m	13,7± 0,8	15,6± 0,7	11,0±0, 9	5,3±1,0	3,0±0,7	1,5±0,5	1,3±0,4
Липосомальн ый гель с фитоэкдистер оидами Серпухи венценосной	12	14	8	6	2	4	2
	9	9	8	4	2	1	1
	12	11	7	7	3	2	2
	10	13	10	2	2	1	0
	15	16	10	7	2	1	0
	12	11	9	5	3	1	1
	12	12	9	6	6	2	2
	10	9	7	4	1	1	1
M±m	11,5± 0,6	11,9± 0,9	8,5±0,4	5,1±0,6	2,6±0,5	1,6±0,4	1,1±0,3
Крем «Актовегин»	12	12	11	5	3	2	1
	11	11	7	4	1	2	0
	14	11	13	9	6	3	2
	16	13	11	6	5	2	0
	11	12	11	6	3	2	1
	12	11	7	4	3	2	1
	12	10	11	7	пгб		
	12	12	8	4	3	1	1
M±m	12,5± 0,6	11,5± 0,3	9,9±0,8	5,6±0,6	3,4±0,6	2,0±0,2	0,8±0,2
Контроль (без обработки)	8	9	8	6	3	4	4
	7	7	6	5	2	2	2
	11	9	7	7	6	пгб	
	11	8	11	6	3	1	1
	9	8	9	7	6	4	6
	14	11	11	6	6	4	2
	10	10	11	6	3	2	0
	11	11	8	6	3	2	3
M±m	10,1±0, 8	9,1± 0,5	8,9±0,6	6,1±0,2	4,0±0,6	2,7±0,5	2,6±0,8

**Метод статистического анализа полученных результатов** Результаты экспериментов с опытной и контрольной группами обрабатывались и сравнивались статистически с использованием критерия Стьюдента при  $p \leq 0,05$ .

**Заключение.**

Исследуемые композиции оказывают выраженный эффект при лечении ожоговых ран, значительно уменьшают площадь раневой поверхности по сравнению с контролем. По выраженности ранозаживляющего действия не уступают препарату сравнения.

Исполнители \_\_\_\_\_ Липин Д.Е.

к. биол. н. \_\_\_\_\_ Чащина С.В.

Зав. кафедрой,  
д.м.н, проф. \_\_\_\_\_ Сыропятов Б. Я

Дата 29.12.2013

Значения ФПД состава 7, найденные с помощью КФК-2

	Концентрация фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФП Д	3,33				1,396	2,250	2,028	2,564	2,501
	1,67			1,088	1,812	1,859	2,257	2,458	2,566
	1,11	0,23 0	0,536	1,246	1,577	1,965	2,133	2,509	2,600
	0,83	0,36 5	0,801	1,216	1,713	1,910	2,191	2,458	2,490
	0,67	0,53 3	0,959	1,305	1,670	1,959	2,500	2,339	
Относительная погрешность, %		141,74	98,05	20,79	23,96	19,04	19,79	8,40	5,71
Диаметр липосом, нм		1565,0			172,7	137,0	119,2	102,2	110,9

Таблица 2

Значения ФПД состава 7, найденные с помощью Biowave-II

	Концентрация фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33					2,426	2,571	2,627	2,767
	1,67				2,039	2,293	2,439	2,455	2,636
	1,11				2,037	2,223	2,388	2,540	2,513
	0,83				2,081	2,239	2,382	2,445	2,411
	0,67			1,846	2,116	2,271	2,173	2,383	2,344
Относительная погрешность, %					5,03	8,75	14,93	9,47	16,74
Диаметр липосом, нм		1565,0			172,7	137,0	119,2	102,2	110,9

Таблица 3

## Значения ФПД состава 8, найденные с помощью КФК-2

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33	1,486	1,498	1,609	1,647	1,702	1,782	2,067	2,050
	1,67		1,602	1,624	1,647	1,782	1,751	1,953	2,050
	1,11	1,365	1,610	1,669	1,691	1,748	1,761	1,917	2,031
	0,83	1,369	1,633	1,673	1,673	1,747	1,809	1,940	2,012
	0,67	1,587	1,662	1,646	1,720	1,757	1,740	1,969	2,029
Относительная погрешность, %		23,26	10,79	4,71	5,15	4,61	4,30	8,17	2,19
Диаметр липосом, нм		193,2	179,7	170,7	165,5	159,2	163,0	146,9	153,3

Таблица 4

## Значения ФПД состава 8, найденные с помощью Biowave-II

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33								2,329
	1,67	1,557	1,730	1,952	1,962	2,027	2,050	2,246	2,257
	1,11	1,636	1,827	1,972	1,983	1,976	1,992	2,259	2,291
	0,83	1,655	1,862	1,904	1,967	2,006	2,052	2,217	2,202
	0,67	1,650	1,835	1,972	1,985	2,017	1,935	2,173	2,213
Относительная погрешность, %		8,89	8,85	4,57	1,58	3,11	7,73	4,79	6,53
Диаметр липосом, нм		193,2	179,7	170,7	165,5	159,2	163,0	146,9	153,3

Таблица 5

## Значения ФПД состава 9, найденные с помощью КФК-2

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33			1,418	1,451	2,163	1,665	2,412	2,214
	1,67		1,424	1,798	1,659	1,77	2,052	2,13	2,454
	1,11	0,23	1,28	1,556	1,641	1,781	1,891	2,171	2,399
	0,83	0,557	1,429	1,593	1,702	1,808	1,969	2,191	2,45
	0,67	0,545	1,416	1,715	1,77	1,095	2,091	2,289	2,484
Относительная погрешность, %		179,6 3	16,43	25,27	20,17	62,54	24,27	14,08	12,57
Диаметр липосом, нм		1681, 0	168,7 6	161,1 4	146,5 2	135,8 4	124,0 4	116,7 4	145,38

Таблица 6

## Значения ФПД состава 9, найденные с помощью Biowave-II

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	Относительная погрешность, %		22,48	8,09	8,27	10,84	10,61	9,45	8,70
	1,67				2,036	2,237	2,326	2,466	2,647
	1,11		1,751	2,054	2,124	2,179	2,306	2,539	2,565
	0,83		1,876	2,109	2,144	2,223	2,271	2,439	2,633
	0,67		1,942	2,13	2,159	2,263	2,329	2,418	2,548
Диаметр липосом, нм		1681, 0	168,7 6	161,1 4	146,5 2	135,8 4	124,0 4	116,7 4	145,38

Таблица 7

Значения ФПД состава 10, найденные с помощью КФК-2

	Концентрация фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин						
		5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33		1,702	1,924	2,156	2,594	2,59	2,677
	1,67	0,906	1,702	1,972	2,216	2,557	2,431	2,419
	1,11	0,821	1,705	2,007	2,231	2,388	2,233	2,365
	0,83	0,894	1,698	2,115	2,206	2,31	1,996	2,458
	0,67	0,880	1,723	2,070	2,185	2,252	2,011	2,500
Относительная погрешность, %		13,7	1,57	10,48	3,65	17,28	32,08	13,31
Диаметр липосом, нм		671,6	147,1	120,4	100,3	90,1	84,6	78,4

Таблица 8

Значения ФПД состава 10, найденные с помощью Biowave-II

	Концентрация фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин						
		5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33		2,051	2,379	2,637	2,868	2,902	2,987
	1,67		2,073	2,398	2,574	3,098	2,54	2,469
	1,11		2,061	2,408	2,548	2,576	2,361	2,738
	0,83	0,922	2,063	2,344	2,28	2,553	2,139	2,78
	0,67	1,048	2,071	2,452	2,598	2,527	1,891	3,198
Относительная погрешность, %		28,94	1,18	4,56	15,65	25,55	45,27	26,91
Диаметр липосом, нм		671,6	147,1	120,4	100,3	90,1	84,6	78,4

Таблица 9

## Значения ФПД состава 11, найденные с помощью КФК-2

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33		1,973	2,466	2,936	2,71	2,863	2,947	3,29 3
	1,67	0,992	1,942	2,551	2,847	2,803	2,97	3,004	
	1,11	1,018	1,995	2,573	2,946	2,900	2,72	3,053	
	0,83	1,048	2,125	2,641	2,855	2,702	2,68	2,972	
	0,67	1,051	2,14	2,567	2,798	2,736	2,576	2,891	
Относительная погрешность, %		8,52	12,45	6,8	6,10	8,29	15,63	5,70	

Таблица 10

## Значения ФПД состава 11, найденные с помощью Biowave-II

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33		2,391	2,679	3,053	3,492	3,479	3,638	3,80 3
	1,67		2,196	2,838	2,747	3,474	3,637	3,885	
	1,11		2,291	2,488	3,032	3,762	4,086	7,421	
	0,83	0,797	2,477	2,275	4,409	3,895	4,263	10,3	
	0,67	0,953	2,466	2,819	4,185	6,388	3,993	5,363	
Относительная погрешность, %		160,3 2	14,08	25,27	60,22	81,7	23,18	126,2 2	
Диаметр липосом, нм		1523, 0	745,2	141,4	104,9	93,8	89,3	83,0	71,2

Таблица 11

Значения ФПД состава 12, найденные с помощью КФК-2

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33								
	1,67				0,694	1,121	1,225	1,324	1,22 2
	1,11	0,278	0,561	1,000	1,127	1,095	1,149	1,264	1,48 3
	0,83	0,426	0,950	1,061	1,018	1,106	1,340	1,344	1,47 0
	0,67	0,669	0,865	1,033	1,100	1,228	1,300	1,299	1,44 3
Относительная погрешность, %		185,4 6	111,0 1	12,76	64,42	17,23	21,43	8,41	27,8 1
Диаметр липосом, нм			462,0	383,4		226	231,6	184,1	211, 9

Таблица 12

Значения ФПД состава 12, найденные с помощью Biowave-II

	Содержание фосфолипида, мг/мл	Время гомогенизации, мин							
		0	5	10	15	20	25	30	35
ФПД	3,33								
	1,67								
	1,11								1,833
	0,83						1,651	1,766	1,909
	0,67				1,402	1,631	1,800	1,776	1,943
Относительная погрешность, %							77,65	4,78	12,7
Диаметр липосом, нм			462,0	383,4		226,0	231,6	184,1	211,9

## Влияние факторов на значение рН

$X_1/ X_2$	$B_1$	$B_2$	$B_3$	$B_4$	$A_i$	$A_{i\text{ ср.}}$	$A_i^2$
$A_1$	6,59	5,69	6,35	6,20	24,83	6,2075	616,5289
$A_2$	6,51	6,55	6,36	6,60	26,02	6,5050	677,0404
$A_3$	6,29	6,14	6,49	6,39	25,31	6,3275	640,5961
$A_4$	6,26	6,08	6,35	6,65	25,34	6,3350	642,1156
$B_i$	25,65	24,46	25,55	25,84			
$B_{i\text{ ср.}}$	6,4125	6,1150	6,3875	6,4600			
$B_i^2$	657,9225	598,2916	652,8025	667,7056			
Эффекты уровней фактора С					$C_q$	$C_{q\text{ ср.}}$	$C_q^2$
$C_1$	6,59	6,55	6,49	6,65	26,28	6,570	690,6384
$C_2$	6,51	5,69	6,35	6,39	24,94	6,235	622,0036
$C_3$	6,29	6,08	6,35	6,60	25,32	6,330	641,1024
$C_4$	6,26	6,14	6,36	6,20	24,96	6,240	623,0016
Эффекты уровней фактора D					$D_i$	$D_{i\text{ ср.}}$	$D_i^2$
$D_1$	6,59	6,08	6,36	6,39	25,42	6,3350	646,1764
$D_2$	6,26	5,69	6,49	6,60	25,04	6,2600	627,0016
$D_3$	6,51	6,14	6,35	6,65	25,65	6,4125	657,9225
$D_4$	6,29	6,55	6,35	6,20	25,39	6,3475	644,6521

Таблица 14.

## Влияние факторов на кислотное число

$X_1/ X_2$	$B_1$	$B_2$	$B_3$	$B_4$	$A_i$	$A_{i\text{ ср.}}$	$A_i^2$
$A_1$	0,28	0,17	0,22	2,75	3,42	0,8350	11,6964
$A_2$	0,11	0,73	0,39	0,17	1,40	0,3500	1,9600
$A_3$	0,34	0,62	0,22	0,11	1,29	0,3225	1,6641
$A_4$	0,79	0,28	0,22	0,11	1,40	0,3500	1,9600
$B_i$	1,52	1,80	1,05	3,14			
$B_{i\text{ ср.}}$	0,3800	0,4200	0,2625	0,7850			
$B_i^2$	2,3104	3,2400	1,1025	9,8596			
Эффекты уровней фактора С					$C_q$	$C_{q\text{ ср.}}$	$C_q^2$
$C_1$	0,28	0,73	0,22	0,11	1,34	0,3350	1,7956
$C_2$	0,11	0,17	0,22	0,11	0,61	0,1525	0,3721
$C_3$	0,34	0,28	0,22	0,17	1,01	0,2525	1,0201
$C_4$	0,79	0,62	0,39	2,75	4,55	1,3575	20,7025
Эффекты уровней фактора D					$D_i$	$D_{i\text{ ср.}}$	$D_i^2$
$D_1$	0,28	0,28	0,39	0,11	1,06	0,2650	1,1236
$D_2$	0,79	0,17	0,22	0,17	1,35	0,3375	1,8225
$D_3$	0,11	0,62	0,22	0,11	1,06	0,2650	1,1236
$D_4$	0,34	0,73	0,22	2,75	4,04	1,0100	16,3216