ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Хамама Зина

РАЗРАБОТКА, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЛЁНКИ СПЕРМИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ, НА ОСНОВЕ САПОНИНОВ *STYRAX OFFICINALIS L.*

14.04.01 – технология получения лекарств

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук,
доцент Суслина Светлана Николаевна

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 9

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... 15

1.1. Контрацепция на Ближнем Востоке и в том числе среди сирийских женщин 15

1.2. Вагинальная система доставки лекарств..... 18

1.3. Информация о спермицидах и спермицидных препаратах..... 23

1.4. Сапонины- их классификация, химическое строение и свойства…… 30

1.5. Стиракс лекарственный (*Styrax officinalis L.*), как источник сапонинов. 34

Заключение по главе 1..... 40

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... 41

2.1. Материалы исследования..... 42

2.2. Методы исследования..... 44

2.2.1. Фармакогностические анализы сырья..... 44

Макроскопический анализ сырья..... 44

Микроскопический анализ сырья..... 44

Микроструктурный анализ сырья..... 45

2.2.2. Методы определения показателей качества сырья…….. 46

-Определение размеров частиц..... 46

-Определение влажности..... 46

-Определение общей золы и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте..... 46

-Определение коэффициента поглощения воды / экстрагента и расходного коэффициента растительного сырья высушенных околоплодников стиракса лекарственного..... 47

-Определение содержания экстрактивных веществ в сырье -

околоплодники стиракса лекарственного..... 47
2.2.3. Методика выделения и очистки сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного..... 48
2.2.4. Определение растворимости сухого экстракта ……..... 48
2.2.5. Технологическая характеристика сухого экстракта – Степень сыпучести…… 49
2.2.6. Методика определения подлинности сапонинов в сухом экстракте…… 50
2.2.7. Методика количественного определения сапонинов в сухом экстракте – ПМР…… 51
2.2.7.1. Валидация методики количественного определения сапонинов в сухом экстракте – ПМР ……..…… 53
2.2.8. Исследование специфической активности лекарственных форм……. 57
1-Исследование специфической активности сапонинов околоплодников стиракса лекарственного **в опытах *in silico***..... 57
2-Исследование специфической активности экстрактов стиракса лекарственного **в опытах *in vitro***..... 58
А- Изучение спермицидного действия суммы сапонинов сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного *in vitro*……. 58
Б- изучения антимикробной активности жидкого и сухого экстрактов околоплодников стиракса лекарственного в опытах *in vitro*…….. 60
3-Исследование специфической активности и биологической безвредности лекарственных форм в опытах в **опытах *in vivo***..... 62
2.2.9. Изучение стабильности лекарственных форм..... 65
2.2.10. Математические методы и статистическая обработка

результатов анализа..... 67
Заключение по главе 2..... 68

ГЛАВА 3: ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЫРЬЯ «ОКОЛОПЛОДНИКИ СТИРАКСА ЛЕКАРСТВЕННОГО» И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ ЕГО КАЧЕСТВА..... 69

3.1. Разработка раздела «Подлинность» на сырье «Стиракса лекарственного околоплодники»……. 69
3.1.1. Изучение морфологии высушенных плодов стиракса…..... 69
3.1.2. Изучение диагностических признаков в анатомическом строении плодов стиракса лекарственного……..... 74
3.2. Изучение химического состава (БАВ) околоплодников стиракса лекарственного……. 81
3.3. Изучение характеристик сырья «околоплодники стиракса лекарственного» для составления раздела НД "испытания"…….. 83
Определение влажности растительного сырья высушенных околоплодников стиракса лекарственного…….. 83
Определение общей золы и золы, нерастворимой в растворе кислоты хлористоводородной 10%..... 83
Изучение дисперсного состава измельченного сырья околоплодников стиракса лекарственного с помощью ситового анализа…… 84
Определение коэффициента водопоглощения…… 85
Определение коэффициента поглощения летучих экстрагентов……. 85
Количественное определение экстрактивных веществ…….. 85
Выводы по главе 3..... 87

ГЛАВА 4: РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА СТИРАКСА ЛЕКАРСТВЕННОГО ……..... 88

4.1. Определение технологических параметров выделения сухого экстракта из околоплодников стиракса лекарственного..... 88
4.1.1. Обоснование метода экстрагирования …….. 88
4.1.2. Выбор экстрагента……. 88
4.1.3. Изучение влияния степени дисперсности сырья …… 89
4.1.4. Изучение влияния времени экстракции ……..…… 90
4.2. Разработка методики выделения СЭСЛ …… 91
4.3. Изучение химического состава сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного……..… 93
4.3.1. Качественное определение сапонинов в СЭСЛ и выделение суммы сапонинов стиракса методом ТСХ ……..… 94
4.3.2.Регистрация УФ-спектрофотометрия СЭСЛ и ССС …… 95
4.3.3.Изучение СЭСЛ и ССС с помощью ВЭЖХ……... 96
4.3.4. Анализ сапонинов в СЭСЛ с помощью УЭЖХ-МСВР …….. 97
4.3.5. Анализ сапонинов в СЭСЛ с помощью МС-спектрометрии в режиме регистрации позитивных и негативных ионов……. 99
4.4. Стандартизация СЭСЛ…… 110
4.4.1. Описание СЭСЛ……. 110
4.4.2. Определение растворимости СЭСЛ…… 112
4.4.3. Определение степени сыпучести сухого экстракта…… 113
4.4.4. Влажность СЭСЛ…… 113
4.4.5. Количественное определение содержания сапонинов для контроля качества сырья…….. 114
4.5. Изучение стабильности при хранении СЭСЛ…….. 115
4.6. Определение биологических свойств СЭСЛ…… 116
4.6.1. Оценка активности БАВ Styrax officinalis в опытах in silico….. 116
4.6.2.Исследование специфической активности экстрактов стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.) в опытах in vitro…….. 122
4.6.3. Изучение бактериостатической и фунгистатической

активности жидкого и сухого экстрактов околоплодников стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.) в опытах in vitro…….. 123
Выводы по главе 4..... 125

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СПЕРМИЦИДНОЙ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРКТА СТИРАКСА ЛЕКАРСТВЕННОГО……..…. 126

5.1. Разработка состава и технологии спермицидной плёнки, содержащей сапонины стиракса лекарственного……... 126
5.1.1. Обоснование состава пленки на основе СЭСЛ ..…… 126
5.1.2. Разработка технология ВСПЭС ……. 130
5.2. Определение показателей качества вагинальной пленки……. 135
5.2.1. Внешний вид ……..…… 135
5.2.2. Масса пленки (Однородность массы)……... 135
5.2.3. Определение pH …….…… 135
5.2.4. Содержание влаги ……. 136
5.2.5. Время дезинтеграции пленки и время растворения …….... 136
5.3. Методики качественного и количественного определения сапонинов стиракса в пленке …… 137
5.3.1. Определение подлинности ВСПЭС……. 137
5.3.2. Методика количественного определения ССС в ВСПЭС……. 139
5.4. Анализ однородности содержания / дозирования……. 143
5.5. Микробиологическое исследование ВСПЭС…….. 145
5.6. Установление срока годности - исследования стабильности…… 145
5.7. Изучение контрацептивного действия ВСПЭС на основе СЭСЛ в опыте in vivo……. 148
Выводы по главе 5..... 151

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ..... 152

ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 153
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... 154
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... 156
ПРИЛОЖЕНИЯ..... 171

Папа Павел в книге «Humanae Vitae» (лат. человеческой жизни), изданной 25 июля 1968 года, писал: «Самое замечательное в развитии всего следует рассматривать большое продвижение человека в доминировании и рациональной организации сил природы до такой степени, что он стремится расширить этот контроль над каждым аспектом своей жизни - над его телом, его умом и эмоциями, над его социальной жизни, и даже над законами, которые регулируют передачу жизни». По его мнению, отказ от большинства форм контроля рождаемости является необходимым. Из-за запрещения всех форм искусственной контрацепции, эта энциклика стала политической спорной.

Контрацепция - это не только защита от нежелательной беременности, но и сохранение здоровья и путь к рождению здорового ребенка. Решение о том, когда иметь детей и иметь ли их, представляется каждой женщине. Благодаря огромному выбору противозачаточных средств, можно иметь безопасную половую жизнь, желанную беременность, и планировать рождение ребенка, будучи кормящей мамой.

В ряде ближневосточных стран сильная правительственная власть оказывает серьезное влияние на распространение знаний о контрацепции. В некоторых странах доминирующая религия отрицательно относится к контрацепции. Другим важным фактором отношения к контрацепции служит экономическая политика правительства в условиях перенаселения или же в условиях экономического спада.

Сирия является одной из стран с высоким уровнем рождаемости. Причины, с одной стороны, заключаются в самих женщинах, а, с другой стороны, в системе здравоохранения.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Исторически именно растения являются источником многих фармацевтических субстанций с высокой биологической активностью и достаточной безопасностью их использования по сравнению с синтетическими лекарственными средствами. Несмотря на большое разнообразие растений в Сирии и опыт этномедицины, исследования в этой области немногочисленны. Имеется очень мало лекарственных препаратов на основе растительных субстанций, хотя их производство сравнительно простое и недорогое.

Вышеизложенное определяет актуальность исследования растительных продуцентов, произрастающих в Сирии, в частности *Styrax officinalis* L. и использование препарата на его основе в качестве местного контрацептивного средства. Современные натуральные средства местной контрацепции позволяют сохранять здоровье женщин и планировать рождение детей, не нарушая культурных традиций. Использование полученных в работе данных позволит поощрять культивирование лекарственных растений и обеспечит создание новых рабочих мест и будет содействовать медицинскому, социальному и экономическому развитию сирийского общества.

Степень разработанности темы исследования

Авторы U. Zehavi, M. Levy, R. Segal (1986) посвятили свою работу «Fungistatic activity of Saponin A from *Styrax officinalis* L. on plant pathogens» исследованию биологического действия сапонинов *Styrax officinalis* L.. Однако составы на основе сапонинов стиракса в любом виде до настоящего времени не являлись объектом научных исследований. Также отсутствуют какие-либо фармакогностические данные о БАВ *Styrax officinalis* L. произрастающим в Сирии.

Цель и задачи исследования

Цель работы - фармакогностическое изучение нового вида растительного сырья «стиракса лекарственного околоплодники» и разработка состава и

технологии вагинальных спермицидных плёнок с экстрактом стиракса лекарственного (ВСПЭС).

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. На основе сравнительного анализа литературных данных и результатов оценки биологической активности тритерпеноидных сапонинов *Styrax officinalis* L. *in silico* обосновать актуальность разработки местного спермицидного средства;
2. Изучить состав биологических активных веществ (БАВ) и провести фармакогностическую оценку нового вида сырья "околоплодники стиракса лекарственного";
3. Разработать методику получения сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ) и изучить показатели его качества;
4. Разработать состав и технологию ВСПЭС;
5. Разработать методики стандартизации ВСПЭС и изучить стабильность в процессе хранения;
6. Изучить фармацевтическую доступность комплекса сапонинов *in vitro*, контрацептивное действие и биологическую безвредность ВСПЭС на лабораторных животных *in vivo*.

Научная новизна

Впервые выявлены диагностические признаки в анатомическом строении тканей плодов стиракса лекарственного на основании макроскопического и микроскопического анализа и получены объективные данные этих признаков в виде оригинальных микрофотографий.

Впервые плоды стиракса лекарственного изучены с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Результаты этих исследований иллюстрированы оригинальными микрофотографиями.

Впервые разработаны состав и технология вагинальных пленок спермицидного действия содержащих сапонины (ВСПЭС), выделенные из околоплодников стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.), произрастающего на территории Сирии.

Выделен целевой фрагмент метаболома плодов стиракса лекарственного, содержащий сумму сапонинов и изучен с использованием МС, ТСХ, ПМР, УФ - СФМ.

Впервые выявлена спермицидная активность сухого экстракта из околоплодников стиракса лекарственного, произрастающего в Сирии.

Впервые установлена специфическая активность тритерпеноидных сапонинов из околоплоднков стиракса лекарственного в опытах *in silico* и проведена компьютерная оценка плейотропного действия на основе зависимостей (структура-активность).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведенная работа будет содействовать углублению научных исследований по созданию препаратов, в том числе спермицидного действия на основе БАВ стиракса лекарственного и других растений в Сирии.

Подана справка № 017298 по заявке 2018111180 от 29.03.2018 на патент РФ: «Композиция спермицидного действия для вагинального применения, содержащая тритерпеноидные сапонины из *Styrax officinalis* L.». Разработанные спермицидные пленки в дальнейшем могут быть внедрены в фармацевтическое производство в Сирии.

Основные положения, выносимые на защиту

- ✓ результаты фармакогностического исследования нового вида ЛРС "околоплодники стиракса лекарственного";
- ✓ разработка методики выделения и изучение СЭСЛ;
- ✓ разработка состава, технологии и методик стандартизации ВСПЭС;
- ✓ результаты комплекса исследований биологической спермицидной и контрацептивной активности ВСПЭС.

Методология и методы исследования

Методология работы основана на анализе и обобщении научных данных о сапонинах растительного происхождения, их выделении и препаратах на их основе. Морфологические и анатомические характеристики растительного сырья устанавливались методами микроскопии. Изучение состава полученного сухого

экстракта и готовой лекарственной формы проводилось с помощью УФ-спектрофотометрии, ТСХ, ВЭЖХ. Подлинность и количественное содержание действующих веществ определялось методом ЯМР.

Работа содержит сравнительную экспериментальную оценку модельных составов вагинальных пленок, содержащих СЭСЛ.

Для оценки качества лекарственных пленок использованы современные методы анализа и показатели качества, регламентированные ГФ XIII издания РФ (микробиологическая чистота, pH, влажность и др.). Для определения технологических показателей методики пробоподготовки были модифицированы (время дезинтеграции пленки, время растворения пленки, тест однородности дозирования и высвобождение биологически активных веществ в опытах *in vitro*). Специфическая активность определена в соответствии с приказом МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и ФЗ 61 «О лекарственных средствах» (статья 36).

Достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов подтверждена многократной повторностью экспериментов по выделению суммы сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного, разработке составов модельных пленок и технологии их получения с использованием современных физических и физико-химических методов анализа на современном оборудовании, а также статистической обработкой полученных результатов и их сопоставлением с данными литературы.

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на III Международной научно-практической конференции «Современная парадигма научного знания: актуальность и перспективы» (г. Москва, 2015 г.); III Международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях» (г. Казань, 2016 г.); VII Международной научной конференции «Science4Health 2016» (г. Москва, 2016 г.); IV Международной научно-практической конференции «Современная парадигма научного знания:

актуальность и перспективы» (г. Москва, 2016 г.); IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и достижения в медицине» (г. Самара, 2017 г.); V международной научной конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (г. Москва, 2017 г.); VIII международной научной конференции «Science4Health 2017» (г. Москва, 2017 г.); V научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» ФГБНУ ВИЛАР (г. Москва, 2017 г.); XXV Российском национальном конгрессе «Человек и Лекарство» (г. Москва, 2018 г.); Апробация результатов научной работы проведена на кафедре ОФиБМТ ФГАОУ ВО РУДН от 28 августа 2018, протокол 307-04 №1.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от первого этапа - выбора объекта исследования, постановки реализации задач до статистической обработки, обобщения, анализа и обсуждения полученных результатов в научных публикациях и написании диссертационной работы и автореферата.

Внедрение результатов исследования

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН (Акт об использовании в учебном процессе от 10.01.18) и (Акт внедрения от 15.01.18). Разработка состава и технологии изготовления лекарственных полимерных пленок с растительным экстрактом внедрены в ЦКП (НОЦ) РУДН (Акт внедрения от 24.01.18).

Материалы диссертационной работы могут быть использованы в преподавании таких дисциплин, как «Фармацевтическая технология», «Фармакология», «Фармакогнозия», «Биофармация», «Фармацевтическая химия», «Биохимия».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование проведено в соответствии с паспортом специальности 14.04.01-технология получения лекарств. Результаты

диссертационного исследования соответствуют области исследования специальности, пунктам 3, 4, 6 паспорта специальности "технология получения лекарств".

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках Договора № 10 «О создании Научно-образовательного комплекса РУДН–ВИЛАР» от 20.01.2012 г. № темы 0576-2014-0013 «Биофармацевтические аспекты создания инновационных лекарственных средств».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ, 2 из которых в журналах, рекомендуемых для публикации статей по профилю рассматриваемой диссертации. Получена приоритетная справка № 017298 по заявке 2018111180 от 29.03.2018 «Композиция спермицидного действия для вагинального применения, содержащая тритерпеноидные сапонины из *Styrax officinalis* L.».

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 217 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех экспериментальных глав, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 158 источников, в том числе 146 иностранных, 11 приложений. Работа содержит 62 рисунка и 46 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Контрацепция на Ближнем Востоке и в том числе в Сирии

Сирийские женщины как часть культуры Ближнего Востока: Уровень рождаемости в арабских странах был одним из самых высоких в мире - в среднем около 39 рождений на тысячу населения в год. Общий коэффициент рождаемости, более 6,5 рождений на одну женщину (Организация Объединенных Наций) [58, 139, 153]. В последнее время в ряде арабских стран рождаемость начала снижаться (Рис. 1.1.) [139].

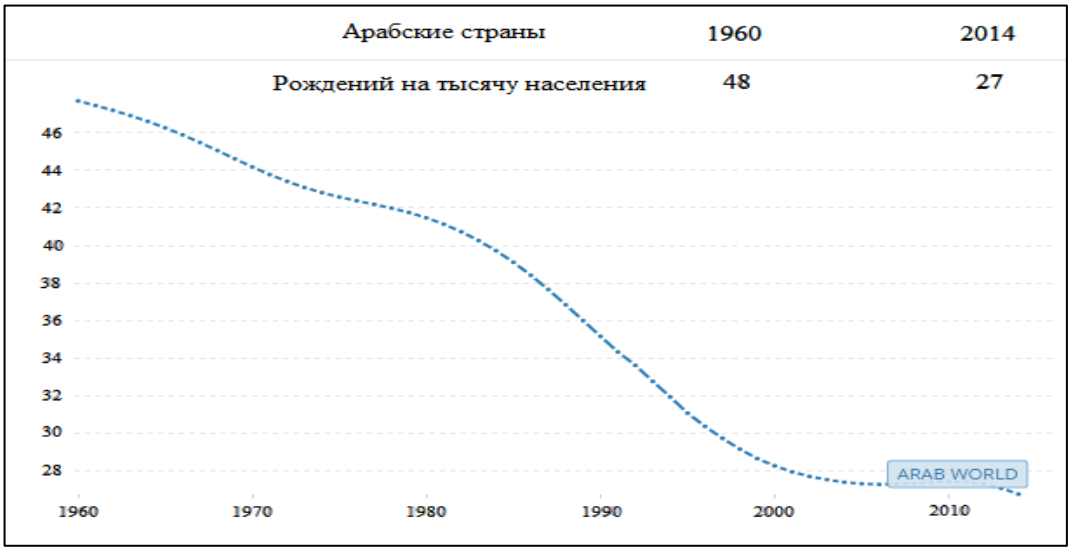


Рисунок 1.1. Коэффициент рождаемости 1960-2014 (на 1000 населения) в Арабских странах

Сирия - сердце Ближнего Востока. Политика Сирийского правительства поощряет ограничение размера семьи [60, 85], но социальные ценности, культурные нормы и религиозные верования выступают против таких ограничений. Тем не менее, воздействие западной идеологии привело к некоторым изменениям в семейной жизни в странах Ближнего Востока [61].

По данным на декабрь 2010 года, распространенность контрацепции среди женщин репродуктивного возраста, состоящих в браке или в отношениях колеблется, в пределах 50,4% в Северной Африке (44,8% Современные методы контрацепции) и 55,1% в Западной Азии (35,8% Современные методы контрацепции) (рис. 1.2.) [79, 152].

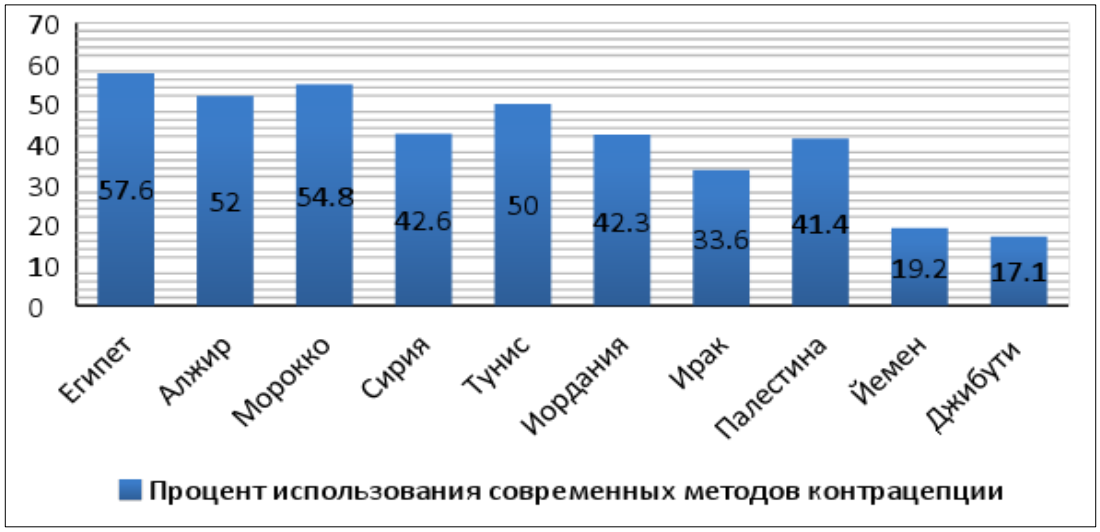


Рисунок 1.2. Процент использования современных методов контрацепции на Ближнем Востоке и в странах Северной Африки среди женщин в возрасте 15-49 лет, которые состоят в браке или в отношениях.

Во всех этих странах оральные контрацептивы, за исключением Египта, наиболее широко используемый современный метод контрацепции, особенно среди младшей возрастной группы. В Египте внутриматочная спираль (ВМС) является наиболее широко используемым современным методом контрацепции Также ВМС используют часть (> 2%) молодых женщин в Сирии, Иордании, Палестины и Ирака. Существует только одна страна, Джибути, где более 2% молодых женщин полагаются на мужской презерватив (Рис. 1.3.) [79].

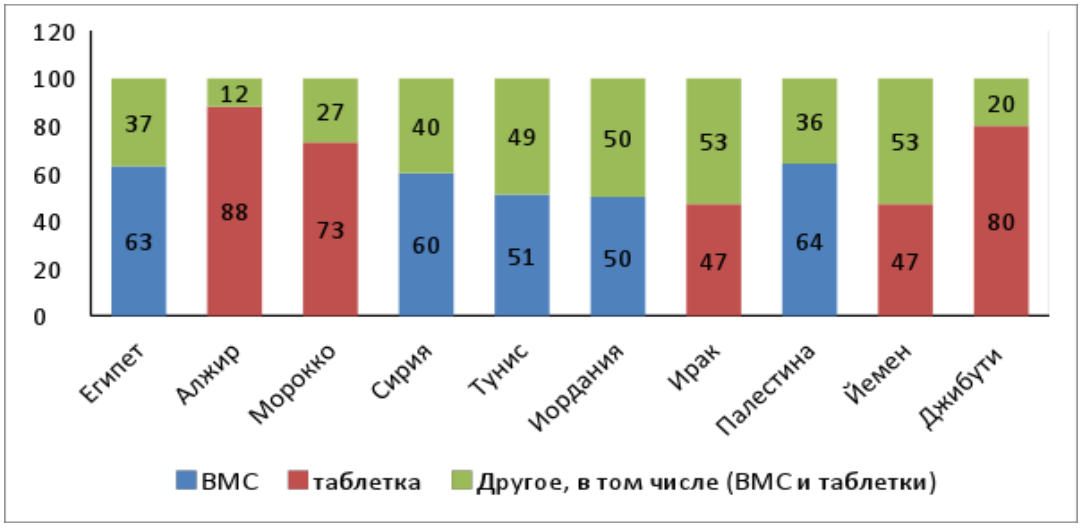


Рисунок 1.3. Процент использования современных методов контрацепции в странах Ближнего Востока и Северной Африки (в % от всех пользователей контрацепции).

Контрацепция, используемая в Сирии: По данным литературы [39, 129, 133] в Сирии наблюдался один из самых высоких уровней рождаемости в мире, общий коэффициент рождаемости 3,0 и суммарный коэффициент рождаемости 24,4% в 2012 г. [152]. Коэффициент рождаемости на тысячу населения снизился от 48,2 в 1960 г. до 23,1 в 2014 г. [140]. Некоторые причины высокой рождаемости обусловлены самими женщинами (желание иметь много детей), а некоторые из-за системы здравоохранения (не информирование или предоставление некачественных контрацептивов) [133].

Исследования показали, что примерно (24%) из опрошенных женщин не используют контрацепцию. Главная причина несогласие мужа, медицинские аспекты, в то время как отказ от контрацепции в связи с религиозными верованиями составляет лишь небольшой процент [13, 133].

Использование контрацептивов характерно для городских женщин, в частности образованных. Кроме того, 52% женщин из сельских районов выступили против использования контрацептивов [85]. К 2010 году процент женщин, которые озабочены планированием семьи, вырос до 64%. Но есть еще 14,5% женщин, которые хотели бы избежать беременности, но не нашли подходящий метод контрацепции [13].

Наиболее распространённый метод контрацепции в Сирии это ВМС (40%) и оральные контрацептивы (37%). Календарный метод также играет важную роль в предотвращении беременности, а мужская стерилизация занимает последнее место в списке методов контрацепции [13, 133].

Некоторых женщин отталкивает использование ВМС из-за стоимости установки и мониторинга в частных клиниках [13]. Одной из причин не использования контрацептивов является их качество и устоявшееся мнение среди женщин о том, что контрацептивы в медицинских центрах некачественные, потому что они импортные. Мужской презерватив еще используется, но в небольшом проценте. Это связано, в первую очередь, с низким качеством

презервативов, доступных на местном рынке и, как говорят женщины, отказ мужчин использовать их, а также ложные слухи о том, что это может вызвать инфекции [13].

Те, кто живет в городах и принадлежит высокому социально-экономическому уровню имеют возможность выбора поставщика контрацептивов, а также полный доступ к процедурам контрацепции; в то время, как жители сельской местности находятся в невыгодном положении и ограничены в выборе контрацепции, и, соответственно, в планировании семьи [85].

1.2. Вагинальная система доставки лекарств

Изучение особенностей использования контрацептивных средств в Сирии показало, что есть неудовлетворенность в ассортименте и видах контрацептивных препаратов. В Сирии недостаточно вагинальных контрацептивов.

Вагинальные системы позволяют вводить противогрибковые, антибактериальные и спермицидные средства. Вагинальные ЛФ обладают рядом преимуществ, например, поступившие таким образом вещества минуют первый этап метаболизма, не требует дополнительных приспособлений, легко вводятся, экономичны. Но существуют и недостатки такие, как провоцирование зуда, раздражение влагалища, сложность применения и непродолжительное время пребывания в месте введения [25].

Среди вагинальных контрацептивов имеются: вагинальные таблетки [115], вагинальный крем [158], вагинальная пена [57], вагинальный гель [43], вагинальные суппозитории [114]. Также в качестве средств контрацепции используются дозированные вагинальные формы с контролируемым высвобождением: управляемые вагинальные таблетки с замедленным высвобождением [94], вагинальное кольцо [95, 116], вагинальные микросферы [17], вагинальные наночастицы [59, 151], вагинальные пленки [71, 143].

Вагинальные пленки:

Вагинальная пленка представляет собой твердую лекарственную форму, при контакте с вагинальной жидкостью быстро растворяется и не вытекает. Эта

лекарственная форма была разработана как простой способ контрацепции и гигиены женских половых органов. Для получения качественной пленки требуются: правильно подобранный состав, сложные процессы для изготовления и валидация качества.

Научный прогресс в области полимеров помог создать тонкие и гибкие пленки, чтобы удовлетворить потребности и требования, предъявляемые к ним для использования в качестве системы доставки лекарственных средств [16, 30]. Вагинальные пленки представляют собой полимерные системы, как правило, в форме квадрата, с гладкой и однородной поверхностью, размером 5-10 см, такие пленки могут быть применены без использования аппликатора. Для облегчения введения во влагалище, они могут складываться [49, 93] (рис. 1.4.).

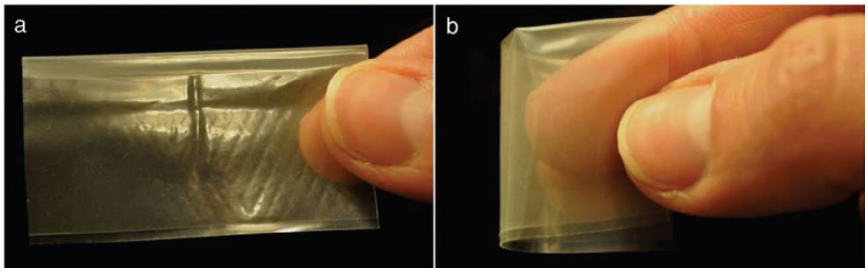


Рисунок 1.4. Вагинальная пленка (VCF): (a) сложенная пополам, (b) помещается над кончиком пальца и зажимается между соседними, для введения.

В состав влагалищных пленок входят действующие вещества и вспомогательные вещества: растворимые в воде полимеры, пластификаторы, наполнители, красители, и ароматизаторы [69]. Выбранные полимеры должны быть нетоксичны, не раздражать слизистую, полностью растворяться, должны обладают хорошими смачивающими свойствами и прочностью на разрыв; и быть недорогими в изготовлении. Полиакрилаты, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт и производные целлюлозы являются лучшим выбором для формирования вагинальных пленок [50].

Такие параметры как механическая прочность и время дезинтеграции пленки зависят от типа полимера и его молекулярной массы. Пластификаторы (например, глицерин, полиэтиленгликоль), обеспечивают гибкость и гарантируют

необходимые текстурные параметры пленок. Разрыхлители (например, кроскармеллоза натрия, ПВП), увеличивают скорость растворения, когда это требуется [54, 70].

Получение пленок и их технологические характеристики:

Производство вагинальных пленок, как правило осуществляется методом выливания и состоит из шести этапов. Ниже приведены иллюстрации процесса (рис.1.5.) [93].

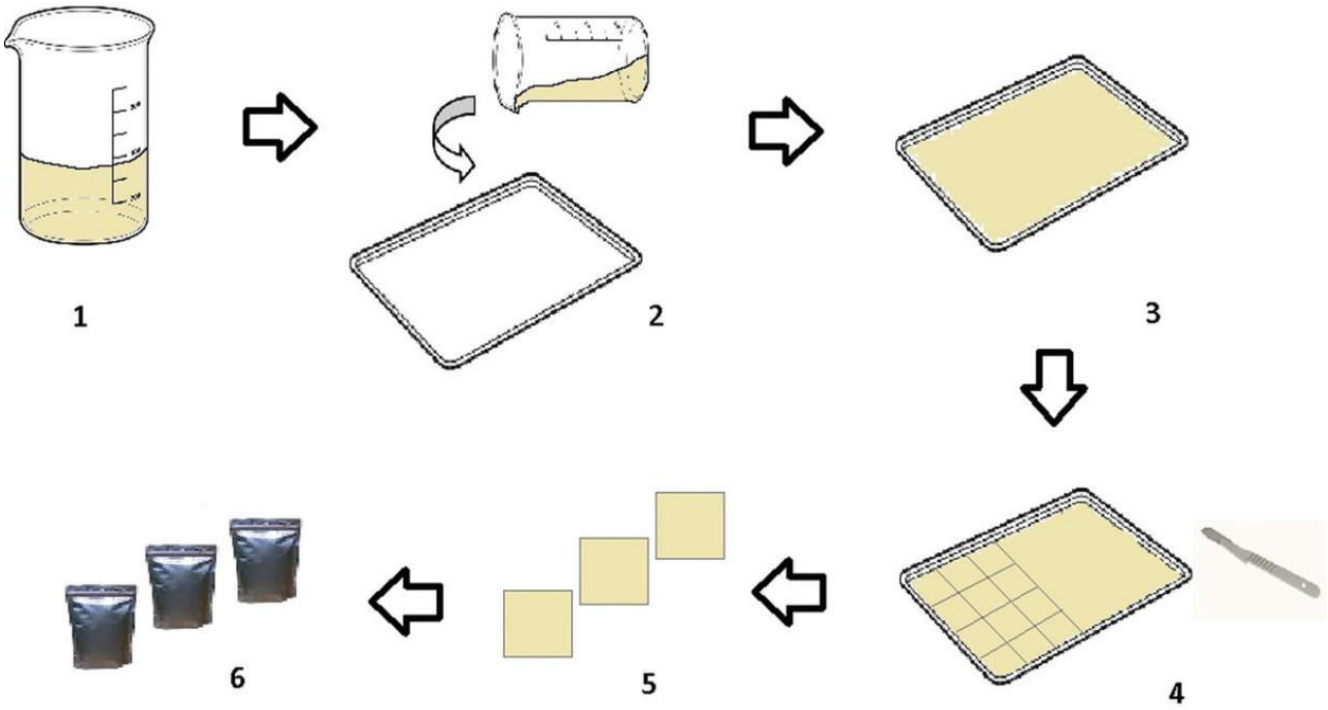


Рисунок 1.5. Схема получения вагинальных пленок.

1 - Приготовление массы для получения пленок; 2 - Переливание массу в форму; 3 - Процесс сушки; 4 и 5 - Нарезка отдельных пленок; 6 - Окончательная упаковка.

Изначально этот процесс требует подготовки массы пленки путем растворения или диспергирования лекарственного средства и вспомогательных веществ, в соответствующем растворителе. Этапы смешивания и гомогенизации могут привести к попаданию воздуха в массу, который может быть устранен с помощью центрифугирования или обработки ультразвуком [54, 70]. После получения массы пленки, ее выливают в подходящую форму, которая позволит

равномерно распределить массу, а также позволит растворителю быстрее испаряться. Процесс сушки может происходить при комнатной температуре или быть ускорен путем прямого нагревания или вакуума в печи. Когда масса высыхает, можно начать стадию резки [16, 54, 70]. В альтернативном варианте, массу можно заливать непосредственно в индивидуальные формы [74]. Наконец, правильно подобранная упаковка обеспечивает необходимые условия хранения для использования в будущем [50, 69, 70, 156].

Наиболее важные показатели качества вагинальных пленок это: гибкость (pliability), толщина (thickness), морфология (morphology), прочность (strength), эластичность (elasticity), содержание воды (water content), био-мукоадгезия (Bio/Mucoadhesion), индекс набухания (swelling index), угол контакта (contactangle), дезинтеграция пленки (film disintegration) / (erosion rate), содержание лекарственного средства, тест на однородность содержания (drug content and test content uniformity), высвобождение лекарственного средства (drug release), вязкость (viscosity), pH, исследования совместимости (compatibility studies), исследования стабильности (stability studies) [42, 68, 88, 98, 109].

Рынок вагинальный пленок.

В европейском патентном ведомстве есть несколько патентов на вагинальные пленки. Это патент авторов Liu, XandKresevic, J. [92] 2009 года на вагинальную биоадгезивную пленку, в состав которой могут входить: эстрогены, антибактериальные препараты, спермициды, прогестины и их комбинации. В качестве вспомогательных веществ используются: пленкообразующие полимеры: ПВА, ПЭО, ГПЦ, ГЭЦ, МЦ, и ГПМЦ, коповидон, желатин, мальтодекстрин, ксантановая камедь, гуаровая камедь, полиметакрилатные, повидон, и их смеси; биоадгезивные полимеры: производные полиакриловой кислоты, производные целлюлозы, вещества природного происхождения (например, хитозан, каррагинан, пектин, альгинат натрия, декстраны, желатин, гиалуроновая кислота и т.д.), а также смеси; другие вспомогательные вещества: глицерин,

полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, маннитол, сорбитол, дибутилфталат, трибутилцитрата, диметилфталат, пирролидоны, а также их смеси.

Автор Staab, R.J. [127], в 2009 году получил патент на пленку, регулирующую pH во влагалище. Ее рекомендуют применять как контрацептив, антисептик, или гомеопатический препарат. В ее состав входят полимеры / биоадгезивные вещества: ПВА, ПЭО, ГПМЦ, КМЦ и их смеси; а также другие вспомогательные вещества: регулирующие pH например, аскорбиновая кислота (витамин С); пластификатор (глицерин является предпочтительным).

Jitian, Y. и Huiming, G. [83] в 2008 году получили патент на вагинальную пленку с лактобактериями /*Lactobacillus.* В качестве полимеров / биоадгезивных веществ, используются: ПВА, хитозан. Также в состав пленки входят другие вспомогательные вещества: эфир жирной кислоты, глицерин. Активным компонентом являются бактерии *Lactobacillus.* Эти пленки рекомендовано применять для профилактики вагинальных инфекций или восстановления флоры влагалища.

Авторами Leon, T. Gabel, P. [87] в 2004 году получен патент на пластичную растворимую пленку. В качестве полимеров / биоадгезивных веществ предлагается использовать: ПВС, метилцеллюлозу, ГПМЦ. Другие вспомогательные вещества, входящие в состав пленки: корригент запаха, смазочный материал (глицерин, гликоль, масла и их комбинации), растворители, консерванты, поверхностно-активные вещества. Эту пленку рекомендовано применять в качестве деозорирующей пленки (vaginal deodorizing film).

На американском рынке есть одна вагинальная контрацептивная пленка, VCF (Dissolving Vaginal Contraceptive Films), которая содержит 70 мг. Ноноксинола (Н-9).

Поскольку вагинальные пленки являются перспективной лекарственной формой, удобной в применении, мы решили разрабатывать новый контрацептив для Сирийского рынка именно в виде вагинальных пленок. В качестве активного компонента необходимо использовать вещество спермицидного действия.

1.3. Обзор спермицидных агентов

Перечислить 1-6 по механизму действия.

1.3.1. Спермициды, действующие за счет изменения pH влагалища

Один из самых старых подходов для достижения спермицидного действия является изменение pH влагалища. Сперматозоиды подвижны в диапазоне pH между 6,7 и 8,5. Нормальное значение pH для влагалища 3,8-4,2. Это естественная кислая среда, поддерживаемая и создаваемая, молочной кислотой, которая продуцируется вагинальной флорой. Когда сперма попадает во влагалище, его pH возрастает до 6,0 и выше, ввиду буферной активности эякулята (pH 7,2-8,0) [18]. Хорошо известно, что сперматозоиды очень чувствительны к низким значениям pH, а кислотный раствор может иммобилизовать сперматозоиды в течение нескольких минут. В качестве веществ, снижающий значение pH влагалища используют: сок лимона, муравьиную кислоту и борную кислоту.

Лимонный сок использовался в качестве традиционного интравагинального контрацептива по всему Средиземноморскому региону в течение сотен лет.

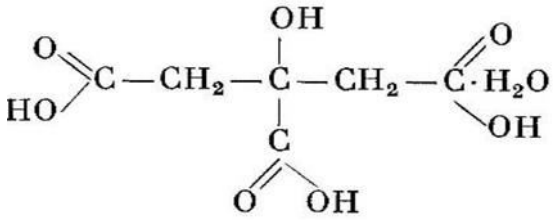


Рисунок 1.6. Структура лимонной кислоты

Спермицидные свойства лимонного сока обусловлены высокой концентрацией лимонной кислоты. В исследованиях [45], было показано, что для необратимой иммобилизации 100% сперматозоидов требуется минимальная концентрация (200 мкл/мл) лимонного сока. Объем эякулята, в среднем, у мужчин, редко превышает 5 мл. По меньшей мере, 1,5 мл лимонного сока являлось бы достаточным для получения необходимой концентрации его во влагалище.

Acidform☆:(Amphora™; Evofem Inc., San Diego, CA, США)**,** препарат муравьиной кислоты**,**является одним из нескольких окисляющих агентов которые в настоящее время находятся в стадии разработки [31]. Acidform – спермицидное средство, представляет собой кислотный, буферный, вагинальный препарат, который поддерживает кислый pH влагалища ниже 5,0 при аккумуляции эякулята во влагалище или при попадании инфекции. У женщин, желаемая кислотность может достигаться 3-5 мл ацидоформа. Ввиду того, что единовременный объем эякулята в среднем составляет 3 мл, потребуется менее 1 мл ацидоформа, чтобы буферизовать сперму до pH менее 5,0. Недавно завершена I фаза клинических исследований безопасности ацидоформа, подтверждающая его безопасность. Не было зарегистрировано ни одной жалобы пациентов при применении ацидоформа интравагинально в течение 6 последующих дней, а также не отмечалось раздражения шейки матки или влагалища при осмотре или кольпоскопии [21]. Acidform- бактерицидное средство, которое демонстрирует *in vitro* спермицидную и антибактериальную активность против некоторых возбудителей ЗППП, таких как (*Neisseria gonorrheoae*) и (*Chlamydia trachomatis*).

Борная кислота (влагалищные свечи Контрацептин Т☆ НИЖФАРМ ОАО, Россия). В состав Контрацептина-Т входит борная кислота. Также Контрацептин-Т включает в себя противомикробное (оксихинолин) и вяжущее (танин) вещества. Контрацептин-Т не содержит гормонов [7].

1.3.2. Синтетические поверхностно-активные вещества

Являются наиболее распространенной и доступной группой вагинальных контрацептивов, но несмотря на это, имеют ограничение в использовании.

Неионные поверхностно-активные вещества

Ноноксинол (Nonoxynol): Патентекс Овал Н☆ (Мерц Фарма Гмб Х и Ко. КГаА, Германия), Ноноксинол☆ (Альтфарм, Россия), Тудэй☆ (Bliss GVS pharma Ltd, Индия). В категории не ионных поверхностно-активных веществ октоксинол

и ноноксинол являются двумя широко известными ПАВ. Ноноксинол является более мощным спермицидом, чем октоксинол. Ноноксинол (Н-9) разрушает клеточные мембраны шейки сперматозоидов, при дозе 50 мкг / мл иммобилизует движение сперматозоидов в течение одной минуты. Хотя, Н-9 используется в качестве контактного спермицида уже более 30 лет и хорошо переносится. Однако появились данные, указывающие на то, что частое использование поверхностно-активных спермицидов может вызывать раздражение слизистой влагалища и поражать эпителий.

Одним из самых частых осложнений, вызываемых применением Н-9, является деэпителизация шейки матки и стенок влагалища, хотя возникновение воспалительных изменений отмечено не было [82].

Катионные поверхностно-активные вещества

Бензалкония хлорид: Фарматекс☆ (Laboratoire Innotech International, Франция). Фарматекс выпускают в нескольких формах — в виде вагинальных свечей (имеют форму шарика), крема, вагинальных таблеток и тампонов. Бензалкония хлорид является бактерицидным катионным ПАВ, производным аммония, который купирует подвижность сперматозоидов сразу после контакта со спермой. В течение 4 секунд после контакта бензалкония хлорида со спермой, средняя часть сперматозоида и его головка разрушаются. Слизистая оболочка влагалища при этом не повреждается. Погибшие сперматозоиды механически препятствуют продвижению остальных, сохранивших подвижность. Но даже те сперматозоиды, которые проникли через двойной барьер (химический и механический), встречают третье препятствие в виде свернувшейся от воздействия бензалкония хлорида слизи, в наружном отверстии шейки матки, обычно значительно облегчающей продвижение сперматозоидов собственно в полость матки.

Недостатками бензалкония хлорида являются аллергические реакции, зуд и жжение во влагалище, отмечаемые примерно у 8 % женщин, а также контактный дерматит [3, 12].

Этоний (Фармак, Украина; Лубныфарм, Украина)**:** Этоний - 1,2-этилен-бис-(N-диметилкарбдецилоксиметил) аммония дихлорид, ранее известный как антисептик с противогрибковым (в отношении Candida) и антимикробным действием и как ранозаживляющее средство.

В настоящее время этоний используется в качестве антимикробного, противовоспалительного и стимулирующего репаративные процессы средства для лечения трещин сосков, вульвовагинитов, зудящих дерматозов, проктитов и сигмоидитов. В качестве спермицидного средства до настоящего времени этоний не использовался. В результате последующих исследований этония обнаружено спермицидное действие, что открывает возможность использования этого препарата в качестве местного противозачаточного средства отечественного производства. Водные растворы этония в концентрации 0,5% вызывают мгновенную гибель сперматозоидов, при этом отмечается полное отсутствие подвижных, активно подвижных и живых сперматозоидов, что свидетельствует о спермицидной активности 0,5% водных растворов этония [2].

1.3.3. Спермициды с дополнительной антимикробной активностью

Хлоргексидин: Хлоргексидина биглюконат - 1,6 Бис - [5 –(пара-хлорфенил) - бигуанидо] – гексана биглюконат, относится к поверхностно-активным соединениям. Хлоргексидина биглюконат (ХГБ), адсорбируясь на поверхности клеток, изменяет её осмотическую регуляцию, увеличивает проницаемость мембран, блокирует внутриклеточные ферменты, вызывает осаждение белков и нуклеиновых кислот и является одним из наиболее активных местных антисептических средств (БИОГЕН НПЦ, Россия).

Значимость ХГБ как спермицидного средства объясняется его эффективностью в отношении возбудителей венерических болезней: трепонем, гонококков, трихомонад. Хлоргексидин проявляет спермицидную активность в дозе 4,81 мг/мл в течение 20 с., однако отмечается гиперчувствительность к хлоргексидину при местном применении [122].

Низин (доклинические исследования): Низин- антимикробный катионный пептид, состоящий из 34 аминокислот, продуцируемый бактериями *Lactococcus lactis*.

Низин используется в качестве консерванта пищевых продуктов во всем мире [24]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), а также Американская Ассоциация Продовольствия и лекарственных средств (FDA), присвоили этому пептиду статус GRAS - в целом признан как безопасный. При дозе 300-400 мкг, наблюдается полное обездвиживание сперматозоидов течение 20 сек. Низин не изменяет морфологию эпителиальных клеток влагалища, а также не вызывает никаких гистологических повреждений в эпителии влагалища при интравагинальном введении в течение 14 дней подряд [24].

Производные зидовудина (доклинические исследования): Зидовудин 3'-азидо-3'-дезокситимидин, сам по себе обладает недостаточной спермицидной активностью. Два его новых производных фенил фосфата WHI-05 [5-бром-6-метокси-5,6-дигидро-3'-азидотимидин-5'-(п-метоксифенил) метоксиаланил фосфат] и WHI-07 [5-бром-6-метокси-5,6-дигидро-3'-азидотимидин-5'-(п-бромфенил) метоксиаланил фосфат], определены как вещества, проявляющие сильную анти-ВИЧ и спермицидную активность.

В отличие от Н-9, спермицидная активность WHI-05 и WHI-07 не связана с цитотоксичностью к эпителиальным клеткам репродуктивных органов [52].

1.3.4. Разжижающие вещества

Высокоэффективное разжижающее свойство представлено ртутью (2,7 мг/мл), нитрофенолом (6,9 мг/мл), нафтила фосфатом натрия и дубильными кислотами. Эти активные вещества обладают способностью мгновенно коагулировать эякулированную сперму, вероятно, посредством денатурирующего влияния на гликопротеины. Тем не менее, индекс безопасности разжижающих агентов в настоящее время слишком мал, чтобы разрешить их использование в фармацевтических препаратах *in vivo* [122].

1.3.5. Ионофоры

Ионофоры - это соединения, которые образуют жирорастворимые комплексы со специфическими катионами и выступают в качестве проводников для транспорта этих катионов через биологическую мембрану. Ионофор кальция, A23187, увеличивает концентрацию внутриклеточного кальция и ингибирует подвижность сперматозоидов человека, в концентрации 20 мкм/мл в течение 120 сек. Тем не менее, местные эффекты ионофоров на ткань влагалища, а также их системные эффекты после всасывания в кровяное русло еще не изучены [56].

1.3.6. Природные поверхностно-активные вещества: сапонины

Сапонины являются естественными поверхностно-активными веществами, они часто встречаются во многих растениях. Сапонины обладают спермицидным действием. Общий липидный бислой, который содержит внешние, внутренние и трансмембранные белки, является основным признаком плазматической мембраны сперматозоидов. Молекулы сапонинов взаимодействуют с липидным бислоем, оказывая влияние на гликопротеины клеточной мембраны и изменяют ионный трансмембранный транспорт, что приводит к изменениям поверхности. Эти изменения, а именно везикуляция, вакуолизация или распад в области головки могут возникать из-за растяжения, ослабления, разрыва мембраны и окончательного удаления акросомы [48, 105, 117].

Растения, сапонины которых используются в качестве спермицидных средств:

Acacia auriculiformis (A. Cunn. Ex Benth.)*:* Смеси двух частично изолированных тритерпеноидных сапонинов из порошка семян *Acacia auriculiformis* (Acaciaside A и B) показали спермицидную активность в концентрации 0,35 мг/мл. Электронно-микроскопическое наблюдение показало, что происходит дезинтеграция плазматической мембраны и полное растворение акросомной части сперматозоида [72, 103].

Sapindus mukorosii (Gaertn.): синонимы: reetha, рехта: препарат - CONSAP☆ (Hindustan Latex Limited, Индия). Сапонины, выделенные из *Sapindus mukorosii,*

показали самое сильное спермицидное действие. Эти сапонины представляют собой мукоросиевые сапонины E1, G, X, Y1, Y2, Z1 и Z2. Не было обнаружено никаких морфологических изменений после инкубации сперматозоидов с сапонинами в концентрации 0,5 мг/мл в течение 1 мин, хотя в той же концентрации наблюдалась иммобилизация сперматозоидов. При более высоких концентрациях сапонинов (1-50 мг/мл) сперматозоиды подвергаются заметному разрушению, вакуолизации, везикуляции и эрозии мембраны, покрывающей область головки. Сапонины, выделенные из *Sapindus mukorosii* были включены в контрацептивный крем под названием CONSAP. Этот крем успешно завершил III этап клинических испытаний в Индии [131, 144].

Molluga pentaphylla (Linn.): Тритерпеноидный сапонин Моллугогенол-А продемонстрировал спермицидную активность в концентрации 300 мкг/мл. Электронная микроскопия показала фрагментацию или потерю плазматической мембраны, везикуляцию периакросомальной мембраны и растворения органелл в целом, демонстрируя дегенерацию сперматозоидов [112, 125].

Другие растения, содержащие сапонины, обладающие спермицидной активностью: *Phytolacca dodecadra (*L' Herit), *Calendula officinalis* (L.), *Acacia caesia* (L.)*, Acacia concinna* (Willd.), *Trigonella foenum-graecum* (L.), *Chenopodium album* (L.) and *Cestrum parqui* (L' Herit) [122].

Gossypium species L. Препарат Госсипол (Shaanxi Sinuote Biotech Co., Ltd, Китай: порошок) (TimTec, США: порошок): Госсипол-дизесквитерпен альдегид, выделенный из семян хлопчатника (*Gossypium species* L.), заявляется как спермицидный агент. Концентрация, необходимая для иммобилизации 100% сперматозоидов в течение 20 с., составляет 40 мг/мл. Госсипол ингибирует подвижность сперматозоидов, блокируя образование и потребление АТФ. Он воздействует на митохондрии, подавляя потребление кислорода, ингибируя активность пируватдегидрогеназы и АТФазы. Госсипол был оценен в качестве местного спермицида. Тем не менее, эти исследования, как представляется, не

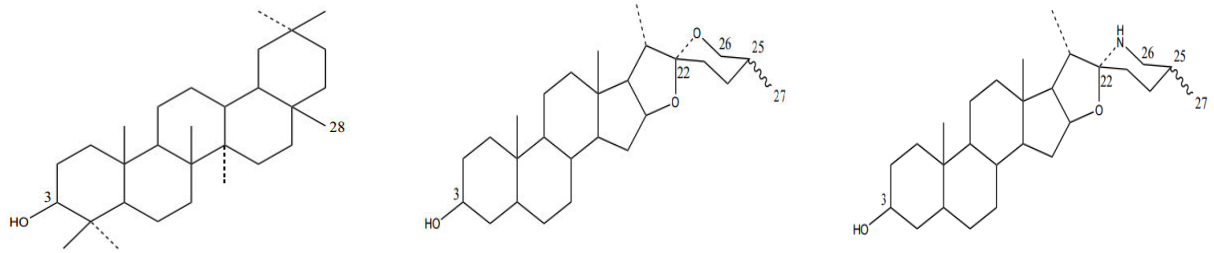
были продолжены, и госсипол продается на рынке в качестве лекарственного сырья [73].

Многие БАВ показали высокую спермицидную эффективность, но до сих пор они не прошли достаточные клинические испытания, например БАВ из таких растении как: *Aloe barbadensis, Azadirachta indica, Allium sativum, Curcuma longa, Stephania hernandifolia и Achyranthes aspera*, экстракт семян *Carica papaya*, комплексные растительные препараты Праним (Praneem polyherbal cream - Индия, Национальный институт иммунологии), и также парабены (метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен и бутилпарабен), цинка ацетат, гели-микроэмульсии [122].

1.4. Сапонины - их классификация, химическое строение и свойства

Роль сапонинов в природе: Сапонины присутствует в растениях и других организмах. Они известны своей множественной фармакологической активностью [104, 132, 145, 149]. Название происходит от латинского сапо (sapo) – мыло [35], что характеризует поверхностно-активные свойства этих веществ и их способность образовывать пену [46, 63, 101, 102].

Химическая структура: Сапонины являются гликозидами с высокой молекулярной массой и состоят из полициклической агликоновой части, соединенной с одним или несколькими сахарными остатками обычно это (D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-арабиноза, L-рамноза, L-фруктоза, D-глюкуроновая и D-галактуроновая кислоты). Агликон - часть, которая также называется сапогенин, представляет собой либо тритерпен (C30) (а), либо стероид (C27) (б) либо стероидный алкалоид (с) [14, 78, 81, 118].



А Б с

Рисунок 1.7. Химические структуры агликонов сапонинов
а- тритерпен, б- стероид, с- стероидный алкалоид

Физико-химические свойства сапонинов:

Физические свойства: Сапонины - бесцветные или желтовато-белые аморфные вещества. В кристаллическом состоянии выделены гликозиды, имеющие в углеводной цепи до 4 моносахаридов. Сапонины обладают жгучим раздражающим вкусом и вызывают раздражение слизистой, покраснение глаз и аллергию. Вещества оптически активны.

Растворимость в воде как стероидных, так и тритерпеновых сапонинов, зависит от числа сахарных остатков: при 4 и более - хорошо растворимы в воде; при 2 - 4 - плохо растворимы в воде, но хорошо в метаноле, а также в (60-70%) спиртах даже при низких температурах, а в больших концентрациях этих спиртов (80-95%) – только при нагревании, а при охлаждении они выпадают в осадок. Нерастворимы в эфире, бензоле, ацетоне, хлороформе и других органических растворителях. Свободные сапогенины не растворяются в воде и хорошо растворимы в органических растворителях.

В зависимости от pH водных растворов сапонины подразделяется на:

Нейтральные - стероидные и тетрациклические тритерпеновые сапонины;

Кислые - пентациклические тритерпеновые сапонины. Их кислотность обусловлена наличием карбоксильных (-COOH) групп в структуре агликона и присутствием уроновых кислот в сахарных остатках [9, 10].

Химические свойства: Сапонины гидролизуются под влиянием ферментов и кислот. Производные мевалоновой и глицинритиновой кислот гидролизуются под воздействием щелочей. При взаимодействии с кислотными реагентами ($SbCl_3$, $SbCl_5$, $FeC1_3$, конц. H_2SO_4) образуют окрашенные продукты. Кислые сапонины образуют нерастворимые комплексы с солями тяжелых металлов (Ba, PЬ). Сапонины способны образовывать комплексы с белками, стеринами, липидами, фенольными соединениями [29, 134]. В составе комплексов сапонины не обладают гемолитической и поверхностной активностью [53, 128, 148]. Сапонины, имеющие в своей основе стероидное ядро, вступают в специфическую реакцию Либермана-Бурхарда [9, 10].

Пенное число: Это наименьшая концентрация извлечения из 1 г. сырья, при встряхивании которого в течение 15 с. образуется пена, устойчивая в течение 15 мин.

Гемолитический индекс -наименьшая концентрация извлечения из 1 г. сырья или раствора чистого сапонина, которая вызывает гемолиз эритроцитов, содержащихся в 1 мл 2% раствора дефибринированной крови барана. Извлечение сапонинов и разведение проводят изотоническим раствором. Готовится серия разведений и определяется наименьшая концентрация. При работе с кровью других животных параллельно ставят контроль со стандартным сапонином (0,02 % раствор дигитонина). Результаты выражаются соотношением массы сырья (1 г.) к разведению. Напр. 1 : 5000, 1 : 20000 и т.д.

Извлечение и анализ сапонинов: Методы экстракции сапонинов из свежего и из высушенного сырья отличаются. Процесс экстракции из высушенного сырья является сложным и состоит из диализа, растворения и диффузии, протекающих одновременно.

Сапонины образуют не растворимые в воде молекулярные комплексы со стеринами, липидами, дубильными веществами, белками. Эти комплексы разрушаются при нагревании с хлороформом. Поэтому перед выделением сапонинов из сырья, его рекомендуют предварительно экстрагировать хлороформом в аппарате Сокслета в течение 2 часов. Процесс выделения сапонинов состоит из нескольких стадий: экстракция сапонинов из сырья, очистка полученного извлечения, разделение на индивидуальные компоненты. Экстрагируют сапонины полярными растворителями: метанолом и спиртом различной концентрации, водой, 0,9%-ным раствором натрия хлорида. Иногда сырье перед экстракцией обрабатывают петролейным эфиром, четыреххлористым углеродом, диэтиловым эфиром для разрушения нерастворимых в полярных растворителях комплексов сапонинов со стеринами, белками, фенольными соединениями. Очистку полученных извлечений проводят различными способами, это зависит от структуры сапонинов.

Полярные сапонины плохо растворимы в этиловом и метиловом спиртах, выпадают в осадок при охлаждении, длительном стоянии спиртового экстракта или при добавлении этанола.

Гликозиды с небольшой углеводной цепочкой обычно плохо растворимы в воде и выпадают в осадок при разбавлении спиртовых экстрактов водой.

Кислые тритерпеновые сапонины растворимы в водных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении. Также, из спиртовых растворов тритерпеновые сапонины можно осаждать диэтиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом, иногда бутиловым и изоамиловым спиртами.

Полученные сапонины очищают от полярных сопутствующих веществ: моно- и олигосахаридов, фенольных соединений, органических кислот и др. повторным переосаждением [5, 8].

Значительное распространение нашли хроматографические методы очистки суммы сапонинов. Гликозиды, содержащие свободные карбоксильные группы, могут быть отделены от сопутствующих веществ, в том числе и от минеральных примесей, с помощью ионообменной хроматографии. Хроматографическую очистку суммы сапонинов проводят на оксиде алюминия, силикагеле, активированном угле [4].

Распространение в природе: Сапонины достоверно обнаружены в представителях примерно 40 семейств растений. Более широко распространены тритерпеновые сапонины. Чаще всего они встречаются у растений сем. *Caryophyllaceae*, *Fabaceae* (солодка, астрагал шерстисто цветковый) [64], *Araliaceae* (женьшень, аралия маньчжурская) [27, 41, 86, 91], *Hippocastanceae* (каштан конский), *Polygonaceae* (сенега), *Rosaceae* (лапчатка прямостоячая, кровохлебка лекарственная), *Asteraceae* (календула лекарственная), *Polemoniáceae* (Синюха голубая) [20, 34, 99], *Lamiáceae* (Ортосифон тычиночный), *Polygaláceae* (Истод тонколистый), *Papilonaceae* (Астрагал шерстистоцветковый) и др. Стероидные сапонины чаще встречаются у растений сем. *Dioscoreaceae* (диоскорея ниппонская, диоскорея дельтовидная) [15, 22, 28],

Agavaceae (агавы, юкки), *Liliaceae* (ландыш), *Scrophulariaceae* (наперстянки), *Zygophyllaceae* (якорцы стелющиеся) [38, 75, 113] и др. [5, 8, 55, 100, 126].

1.5. Стиракс лекарственный (*Styrax officinalis* L.), как источник сапонинов

Систематика

- Отдел: *Magnoliophyta*
- Класс: *Magnoliopsida*
- Порядок: *Styracales*
- Семейство: *Styracaceae*
- Род: *Styrax*
- Вид: *officinalis* L.

Народные названия: Франция: Aliboufier, Италия: Storace, Англия: Storax, Германия: Styrax, Россия: Стирах, Арабские страны: Abhar; Istark; Hoz; Lbna; maiha [130, 138].

Семейство стираксовое насчитывает 11 родов и около 180 видов. Они наиболее широко представлены в Восточной и Юго-Восточной Азии, особенно в Китае. Самым известным представителем этого семейства является род стиракса, более распространенный и насчитывающий около 130 видов. Многие виды стиракса служат источником ароматной бензойной смолы, применяемой в медицине и косметологии [67, 47, 106].

Вид - стиракс лекарственный (*Styrax officinalis* L.):Стиракс лекарственный широко распространен в таких странах Средиземноморья как Италия, Греция, Турция, Сирия и Палестина [33, 67, 142] и на юго-востоке Франции [51, 62, 89]. В калифорнийских регионах *Styrax officinalis* L. раньше не выделялся как подвид, но исследования доказали, что стиракс лекарственный калифорнийский является отдельным подвидом [66, 65].

Описание. Невысокое дерево (от 4 до 6 метров). Листья простые, круглой или овальной формы, белые, опушенны с нижней стороны волосками. Дерево цветет в конце весны (с апреля по июнь). Цветы маленькие белые. Число лепестков 5 - 8. Чашечка зеленая, венчик белый. Размер цветка 20 мм. Число тычинок 8-16. Большое количество нектара в цветах привлекает к ним насекомых. Поэтому дерево известно, как медоносное. Плоды созревают с сентября по ноябрь

[135, 130]. Сначала они зеленые, а потом желтеют. Плод стиракса покрыт волосками и имеет форму шара диаметром в 15 мм с заостренной вершиной. Внутри плода одно коричневое семя, которое окутано зеленой пульпой, очень горькой на вкус [80, 96, 138].

В литературе есть данные о том, что пульпа плодов является токсичной для рыбы, мышей [26, 76] и улиток [40, 97, 123, 137]. Также плоды использовались при изготовлении яда для. Водно-спиртовые экстракты стиракса лекарственного токсичны в больших дозах и показали противоопухолевую активность [142, 141, 150] (Рис. 1.8.).

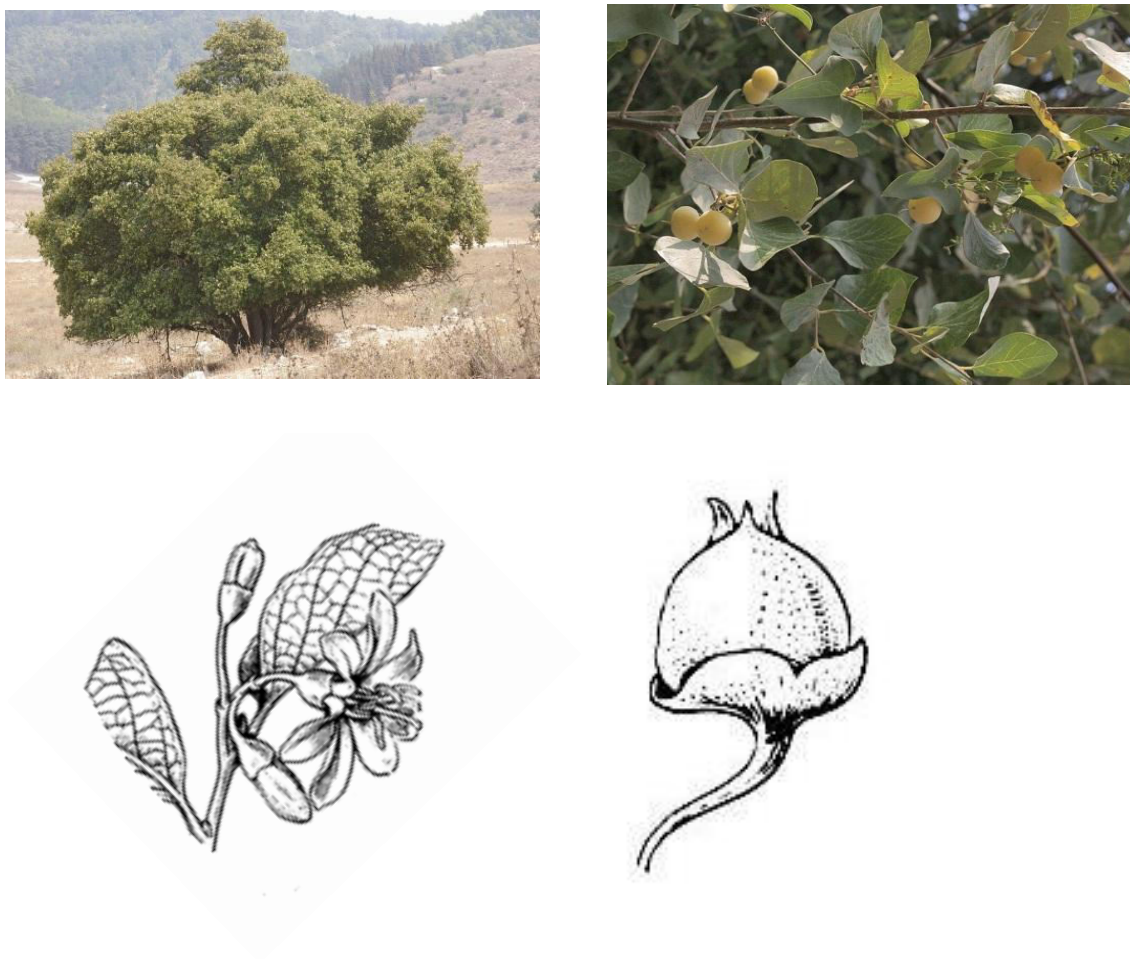


Рисунок 1.8. Стиракс лекарственный (*Styrax officinalis* L.)

В литературе существуют противоречивые данные о смоле стиракса лекарственного. Polunin et al. (1965) и Y. Vardar et al. (1973) сообщали, что стиракс лекарственный известен своей смолой с древних времен, ее использовали римляне, египтяне и финикийцы в качестве благовония и лекарства. Однако в

настоящее время смола стиракса используется только в римско-католических Церквях в Европе [110, 147]. Dalal Ibrahim et al. (2011) установили, что смола, которая выделяется из ствола, применяется для лечения инфекций кожи и входит в состав лекарственных средств от кашля [80]. А другие ученые придерживаются противоположного мнения: Adel Mohammed et al. (2007) считает, что стиракс не имеет смолы [96]. В работе Ибн аль-Байтара (1197-1248 гг.) говорится, что стиракс в Сирии называется (Abhar, Al-istark и Al-maiha), и что это дерево вообще не имеет камеди или смолы [37]. В статье Vincent Blondel (2016) об использовании стиракса написано: «мне кажется, что *aliboufiers / Styrax officinalis* L. не имеют смолу» [130].

В русской литературе можно встретить название “стиракс”, но оно указывает на другие виды стиракса или продукцию на их основе. Род стиракс насчитывает более 130 видов, три из которых служат основой для производства растительного фиксатора запахов в парфюмерной промышленности России: *Styrax tonkinensis*, *Styrax benzoin* и *Styrax benzoides*. При повреждении их коры выделяется ароматическая камедь. Все вышеперечисленные виды получили одно и то же название - стиракс [6].

Химические исследования частей растений:

1. **Содержание тритерпеновых сапонинов в околоплоднике:**

В ходе изучения околоплодников стиракса, были выделены тритерпеновые сапонины [155, 120, 121]. Сапогенин стиракса было 21-бензоил баринтогенол С (21-benzoy barringtogenol C) [23, 120]. В 2002 году Yayla et al. опубликовал исследование о выделении и идентификации сапонинов-стиракса (А, В, С и дезацилсапонин стиракса) из околоплодников стиракса лекарственного. Их структура была изучена с помощью ЯМР и масс-спектрометрии [155].

- Сапонин стиракса А является аморфным порошком с эмпирической формулой $C_{61}H_{96}O_{27}$. Химическое название сапонина А (*22-О-ацетил- 21- О- тиглил-3- О-[α- L- рамнопиранозил(1→2)-* β- *D- глактопиранозил (1→2)]-[*β*-D-глюкопиранозил(1→4)]-*β*-D- глюкуронопиранозилбаринтогенол С*).

- Сапонин стиракса B был выделен в виде аморфного порошка. Сапонин B имеет на 22 массовые единицы больше, чем сапонин A. Эмпирическая формула Сапонина B - $C_{63}H_{94}O_{27}$. Химическое название сапонина B (*22-O- ацетил -21-O- бензоил -3-O-*[α- *L- рамнопиранозил(1→2)*-β-*D-галактопиранозил(1→2)]-[*β-*D- глюкопиранозил (1→4)]*-β-*D-глюкуронопиранозилбарингтогенол C*).
- Сапонин стиракса C имеет эмпирическую формулу $C_{62}H_{98}O_{27}$ и химическое название (*22-O- ацетил-21-O-(2- гексеноил)-3-O-[*α- *L- рамнопиранозил(1→2)*-β-*D-галактопиранозил(1→2)]-[*β-*D- глюкопиранозил (1→4)]*-β-*D-глюкуронопиранозилбарингтогенол C*) [155].

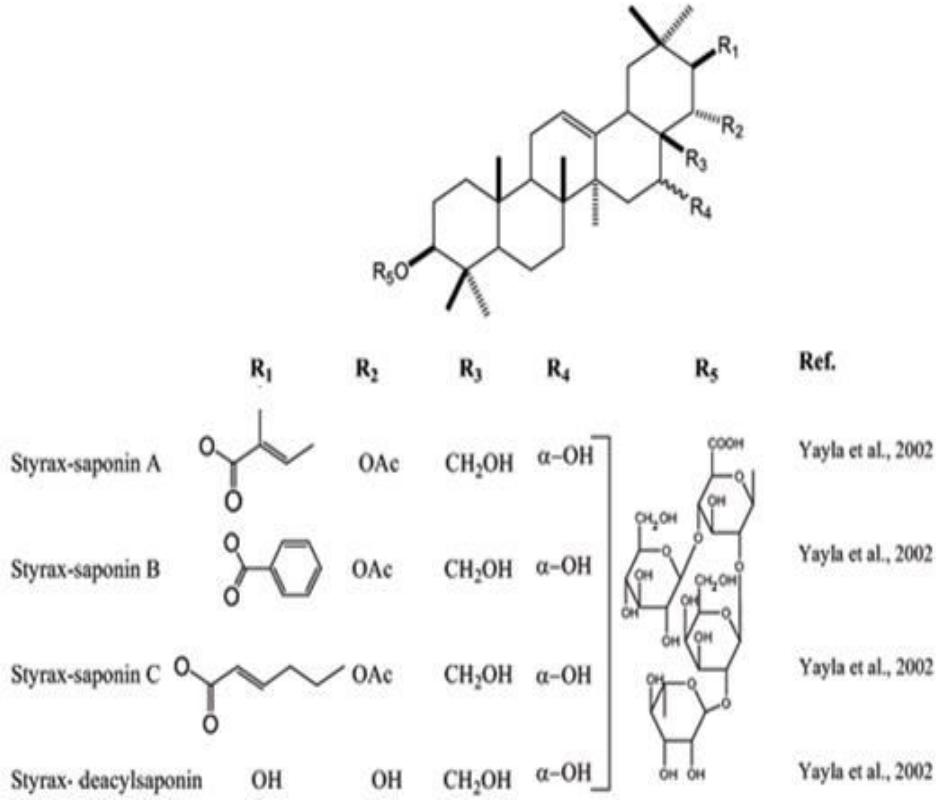


Рисунок 1.9. Структурные формулы сапонинов стиракса (A, B, C) и дезацилсапонин стиракса [155]

Сапонин A является очень сильным пенообразователем, он обладает высокой гемолитической активностью в концентрации равной 1,42 мкг/мл (50% эритроцитов человека гемолизируется). Сапонин B не имеет гемолитической активности в тест-системах *in vivo* [120, 119].

2. Состав эфирного масла листьев, стеблей и цветков стиракса лекарственного:

Эфирное масло содержит терпеноиды, которые были получены из листьев (42,2%), из стеблей (41,2%) и из цветков (48,7%). Основные компоненты эфирного масла листьев: (E)-2-гексенала 17,6%, линалоол 11,9% и гераниал 5,5%. Линалоол является основным компонентом (26,4%) в эфирном масле цветков. Также там содержатся: тридеканал (9,8%) и додекане (9,6%); в то время как α-терпинеол (17%) и эвгенол (9,9%) являются основными компонентами эфирного масла стеблей [135, 136].

В состав эфирного масла листьев стиракса лекарственного входят: (E)-2-гексенал, гексанол, а-пинен, 6-метил-5-гептен 1, (E)-2-гептенол, октанал, (E, E)-2,4-гептадиен, лимонен, бензиловый спирт, октанол, транс-линалоол оксид, 2,3-октадиенон, линалоол, нонанал, 2-фенилэтанол, этилбензоат и другие [135, 136, 111]. Результаты ГХ показали, что (E)-2-гексенал, октанол и гераниол были основными компонентами в этом эфирном масле [135].

3. Химический состав эндокарпия:

Из эндокарпа были выделены пять компонентов: американин А, эгонололиат, эгонол-2'''-метил бутаноат, эгинолгентиобисайд и гомоэгонолгентиобисайд [107, 90, 108, 154].

4. Липофильная фракция семян стиракса лекарственного:

Hocking (1955), Zeybek (1963), Kayacik (1966) andBaytop (1967) сообщили, что в стираксе лекарственном очень высокий уровень содержания масла в семенах [32, 77, 84]. Жирное масло стиракса - это вязкая жидкость, желтоватого цвета, без запаха, со специфическим вкусом. Это масло можно использовать в мыловаренной промышленности и на некоторых пищевых производствах. Тем не менее, из-за низкого йодного числа его нельзя использовать в индустрии красителей [147]. Характеристики масла стиракса: число омыления 182; йодное число 72; кислотное число 2,43; показатель преломления 1,48 [146, 147].

В работе Yayla Y. и Anil H., вместе с четырьмя компонентами, известными ранее, были изолированы два новых бензофуранов компонента [154].

Характеристика и активность БАВ стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.):

1- Противогрибковая активность сапонина А стиракса лекарственного исследована на растительных патогенах

Была изучена противогрибковая активность сапонина А из стиракса и производного из него сапонина (В) на нескольких патогенах растений. Сапонины продемонстрировали активность против Триходермы зеленой (*Trichoderma viride*), Фузариума (*Fusarium oxysporum*), Аспергилла чёрного (*Aspargillus niger*) и (*Rhizopus mucco*). Но в тестируемой концентрации у сапонина В была низкая активность только на Триходермы зеленой (*Trichoderma viride*) [157].

2- Эффективность против свекловичного блошиного жука (*Chaetocnem atibialis)*: эффективность экстракта черешков и листьев стиракса лекарственного была проверена в тесте против свекловичного жука (*Chaetocnem atibialis)* (Illiger) в течение 2008 и 2009 годов, результаты показали, что экстракт стиракса лекарственного, который содержит бензоин и формальдегид, проявляют среднюю эффективность (31,35%) [19, 36, 124].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 1

Анализ литературы по проблеме использования контрацепции в Сирии и странах Ближнего Востока показал, что большая часть женщин полагается на традиционные методы такие, как прерывание полового акта, отказ от сексуальных отношений во время овуляции и в период лактации. Высокий процент женщин в Сирии, неудовлетворенных методами контрацепции, свидетельствует о необходимости совершенствования лекарственной помощи, в частности, разработке препаратов для местного применения, соответствующих реальным потребностям женщин и пожеланию мужей.

Одной из современных лекарственных форм для вагинального применения являются пленки. Анализ литературы показал, что данная лекарственная форма только начинает завоевывать рынок средств для контрацепции. В фармакопеях всех стран отсутствует информация о вагинальной лекарственном форме - пленки. Поэтому разработка состава и технологии получения вагинальных пленок является актуальной.

Были изучены данные литературы о свойствах сапонинов. Многие авторы показали, что эти соединения обладают спермицидной активностью. В Государственном реестре лекарственных средств РФ и за рубежом отсутствуют спермицидные препараты, содержащие сапонинов стиракса лекарственного. Поскольку данное растение произрастает на территории Сирии, и по данным литературы содержит сумму сапонинов в околоплодниках, мы выбрали его в качестве объекта нашего исследования. Околоплодники стиракса лекарственного - перспективный вид сырья – отечественный источник сапонинов для производства местных контрацептивных средств.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проведены на базе кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии и ЦКП ФГБАОУ «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Дизайн диссертационного исследования представлен в блок-схеме на рисунке 2.1.

Рисунок 2.1. Дизайн диссертационного исследования.

2.1. Материалы исследования

Объектом исследования являлось растительное сырье - околоплодники дикорастущего многолетнего кустарника или невысокого дерева стиракса лекарственного *Styrax officinalis* L., собранные в Сирии с августа по октябрь в 2014-2016 гг. в качестве источника активных фармацевтических субстанций (АФС).

Идентификация растительного материала была проведена профессором Юсефом АЛ-Амори (**Yousef AL-Amori**), отдел ботаники, фармацевтического факультета, Университет аль-Баас – Сирия, а также профессором Рамезом Рустом (**Ramez Roustom)**, отдел фармакологии, генеральный директор фармацевтической компании LEM Ltd - Сирия. Сертификат анализа – таксономическая идентификация растительного материала (Приложение № 1).

В экспериментальной работе использовались околоплодники *Styrax officinalis* L., измельчали свежее сырье на электрической мясорубке Nova Meat Grinder (Китай), а сухое на аналитической мельнице Ika (Германия). Сушку сырья проводили воздушно–теневым способом (ГФ XIII, Общие методы анализа) номинальная скорость вращения 28000 об/мин. при температуре 25°С, полезный объем макс. 80мл. Измельченные сухие частицы просеивали через ряд 5 сит с различным размером отверстий от 2,50 мм до 0,25 мм. Использованные сита отвечают требованиям ТУ 23.2.2068-89.

В работе использовали стандартный образец - Purified Quillaia Saponin HRS (EP standart), производства (Sigma-Aldrich, Германия).

Вспомогательные вещества (ВВ): полимер акриловой кислоты Carbopol™ 980 NF, Carbopol™ ETD 2020 NF (Lubrizol, США), Метилцеллюлоза (МЦ-100) (Benecel A15C Pharm, Великобритания), полиэтиленгликоль ПЭГ-1500, ПЭГ-400, ПЭГ-6000 (Dow Chemical, Германия), Спирт поливиниловый (ПВС) Mowiol® 6-98 (Sigma-Aldrich, Германия).

В качестве реактивов и вспомогательных веществ, использовали вещества, представленные в таблице 2.1.

Таблица 2.1. – Реактивы и вспомогательные вещества

Наименование вещества	**НД**	**Назначение**
Purified Quillaia Saponin HRS	EP standart	Стандартный образец
Ацетон	ГОСТ 2768-84	Растворитель
Бутанол-1	ГОСТ 6006-78	Растворитель
Вода очищенная	ФС.2.2.0020.15	Растворитель
Глицерин	USP/EP	Пластификатор
Диметилсульфоксид	ТУ 2635-114-44493179-08	Растворитель
Карбопол 980/Карбомер980	USP/NF	Пленкобразователь
Карбопол ETD 2020	EP	Пленкобразователь
Кислота серная	ГОСТ 4204-77	Реактив
Кислота уксусная	ГОСТ 61-75	Реактив
Метанол	(Merk, Германия) EP	Растворитель, экстрагент БАВ
Метилцеллюлоза (МЦ-100)	USP	Пленкобразователь
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328-77	Реактив
Н-гексан	ТУ 6-09-3375-78	Растворитель
Пропиленгликоль	EP	Пластификатор
ПЭГ-1500	ТУ 2483-008-71150986-2006	Пластификатор
ПЭГ-400	ТУ 2483-007-71150986-2006	Пластификатор
ПЭГ-6000	ТУ 2483-008-71150986-2006	Пластификатор
Р-р HCl	ГФХIII	Регулятор pH
Спирт поливиниловый (ПВС)	ГОСТ 10779-78	Пленкобразователь
Спирт этиловый 95% ректификованный	ФС 42-3072-00	Экстрагент БАВ, растворитель
Триэтаноламин (ТЭА)	ТУ 2423-005- 78722668-2010	Нейтрализующий агент
Трометамол	ЛСР-001567/08-140308, 2008	Нейтрализующий агент
Хлороформ	ГОСТ 20015-88	Растворитель
Этилацетат	ГОСТ 8981-78	Растворитель

2.2. Методы исследования

2.2.1. Фармакогностический анализ сырья

Макроскопический анализ сырья стиракса лекарственного выполняли визуально. Фотографии делали с помощью цифрового фотоаппарата CasioExlim 16,1 Мп, зум 5х (оптический), 4х (цифровой), 4,6-23,0 mm, 1:3,2-6,5.Размеры определяли с помощью линейки или сантиметровой ленты используя методику ГФ XIII.Фотографии обрабатывали в программе AdobePhotoshop CS6.

Микроскопический анализ цельного сырья проводили согласно статье ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ XIII изд. на микроскопе Ломо, МИКМЕД (Россия).

Были приготовлены поверхностные, продольные и поперечные срезы семян, семенной кожуры и околоплодников *Styrax officinalis* L.

Изготовлению микропрепаратов предшествовал этап размачивания, состоящий из помещения исследуемых растительных образцов на сутки в воду, затем в смесь глицерин : вода : этанол (1 : 1 : 1) на 3 суток.

Микропрепарат экзокарпа получали, отрезая с помощью скальпеля или лезвия узкие лоскуты околоплодника, шириной около 2 мм, движением от верхушки к основанию плода, после чего осторожно снимали тонкий слой экзокарпа, как можно полнее отделяя его от ткани мезокарпа. Полученные срезы быстро переносили на предметное стекло и добавляли каплю воды или раствора хлоралгидрата, осторожно расправляли препаровальными иглами и накрывали покровным стеклом.

Микропрепараты мезокарпа готовили с помощью препаровальной иглы и пинцета. Кусочки мякоти плода помещали на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или воды, осторожно прижимали препаровальной иглой, после чего накрывали покровным стеклом.

Для изготовления микропрепарата из семенной кожуры необходимо иметь под рукой нож или ножницы, пинцет и препаровальные иглы. Поскольку семенная кожура стиракса остаётся очень твердой даже после недели

вымачивания в растворе (глицерин : вода : этанол) (1:1:1), невозможно делать срезы, поэтому при помощи ножа или ножниц отламывали маленькие кусочки которые помещали в каплю воды или раствора хлоралгидрата.

Наличие крахмала определяли обрабатывая микропрепататы раствором Люголя.

Обнаружение жирных масел проводили под микроскопом по реакции окрашивания с раствором Судана III: готовые срезы помещали в 2 -3 капли раствора Судана III, накрывали покровным стеклом и нагревали.

Микроскопический анализ анатомических особенностей плодов стиракса лекарственного проводили с помощью микроскопа «Ломо, МИКМЕД – 1» с объективами х 3,2; х 9; х 40; и окуляром 10х. Микрофотосъемка проводилась с помощью цифрового фотоаппарата Canon powershot A85 – Ai AF (zoomlens 3x-5,4-16,2 mm, 4,0 mega pixels) на микроскопе с различными объективами. Фотографии обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS6.

Изучение анатомии высушенных плодов стиракса лекарственного

В Государственной фармакопее XIII издания описана техника микроспопического анализа ЛРС методом оптической микроскопии (ОМ). Для более подробного и углубленного изучения анатомических особенностей в строении плодов стиракса лекарственного мы, помимо оптической микроскопии использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ).

В настоящее время, в НД на ЛРС, принято приводить в качестве материала микрофотографии [1]. Анализ научной литературы и нормативной документации по ЛРС показывает, что фотографии имеют большую практическую ценность и, что, немаловажно, должны в обязательном порядке быть снабжены информацией об использованных объективах и окулярах, т.е. об увеличениях [11]. При умножении увеличения объектива на увеличение окуляра рассчитывается общее увеличение, оно и подписывается на все публикуемые рисунки и фотографии. Также с применением цифровых фотоаппаратов нужно обязательно учесть увеличение объектива фотоаппарата для расчета окончательного значения

увеличения. Для удобства масштабирования и интерпретации полученных нами фотографий мы размещали на них масштабную линейку. С ее помощью можно легко провести определение размеров анатомических признаков.

Микроструктурный анализ (Электронная микроскопия)

Исследование проводили в ЦКП (НОЦ) РУДН на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM – 6490LV при 30kV, детекторе SEM, размере электронного пучка 30, в высоком вакууме. Благодарим канд. фарм. наук Хомик А.С. за помощь и содействие проведенных исследований.

Образцы перед проведении съемки покрывались слоем платины (24 нм) (50 сек при 40 мА) в автоматическом коутере JEOL (JFC – 1600).

2.2.2. Методы определения показателей качества сырья

• **Размеры частиц** измельченного растительного сырья (околоплодников стиракса) определяли, с помощью набора сит с отверстиями размером: 2,5; 2; 1; 0,5; 0,25 мм и диаметром 14 см. Просев осуществляли с помощью автоматического вибропривода в течении 5 минут.

• Определение влажности

Анализ проводился согласно ОФС.1.5.3.0007.15. Для определения влажности измельченных высушенных околоплодников стиракса лекарственного был использован влагомер термографический инфракрасный (Аквилон АВ-50).

• Общая зола и зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте

На основании общих фармакопейных статей ОФС.1.2.2.2.0013.15 и ОФС.1.5.3.0005.15 ГФ XIII, проводили определение общей золы измельченных (до размера частиц не более 2 мм) и с использованием около 5,0000 г высушенных околоплодниках стиракса (точная навеска). Определение золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте проводили на остатке после определения золы общей с использованием беззольного фильтра (Белая лента, МЕЛИОР XXI, масса золы одного фильтра не более 0,00029 г.).

• **Определение коэффициента поглощения воды/экстрагента и расходного коэффициента растительного сырья высушенных околоплодников стиракса лекарственного**

Определение проводили согласно ОФС.1.5.3.0012.15. Для определения коэффициента поглощения различных экстрагентов, около 10,0 г (точная навеска) измельченных высушенных околоплодников заливали экстрагентом: водой очищенной/ метанолом/ спиртом 96% с отношением сырьё:экстрагент (1:10). В соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» и с ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки». Полученные извлечения фильтровали и отжимали оставшееся сырье в перфорированном стакане, после чего измеряли объем полученного извлечения.

Коэффициент эктрагент-поглощения: $\mathbf{К_{эп}} = \frac{V_1 - V_2}{а}$;

где: V_1– объем эктрагента, мл; V_2– объем извлечения, который был получен после отжатия сырья, мл; а – навеска сырья, г.

• **Определение содержания экстрактивных веществ в сырье - околоплодники стиракса лекарственного**

Для определения содержания суммы биологически активных и балластных веществ в сырье околоплодники стиракса лекарственного, использовали согласно ОФС.1.5.3.0006.15 метод 2 – многократную экстракцию.

Методика: Около 6,0 г (точная навеска) высушенных (с определенной влажностью W%) измельченных (с размерами частиц не более 1 мм) околоплодников стиракса лекарственного, помещают в колбу вместимостью 250 мл, 30 мл метанола растворителя. Колбу взвешивают и проводят первичную мацерацию сырья в течении 1 ч, после чего присоединяют обратный холодильник и нагревают на водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения взвешивали колбу с содержимым и восполняли растворителем потерю в массе. Затем взбалтывают колбу и фильтруют содержимое через бумажный фильтр. Эту процедуру повторяют 3 раза, каждый раз прибавляя фильтрат обратно в колбу. Фильтраты объединяют, отбирают 10,0 мл и высушивают пробы досуха при температуре

100 °С, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе и взвешивают сухой остаток (m).

Содержание экстрактивных веществ в сухом сырье околоплодников стиракса лекарственного рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100 \cdot (30 \cdot 3)}{6 \cdot (100 - W) \cdot 10};$$

где: m — масса сухого остатка, г;

W — влажность сырья, %.

2.2.3. Методика выделения и очистки суммы сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного

Выделение суммы сапонинов осуществлялось с использованием циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета. Около 60,0г (точная навеска) измельченного сырья помещали в патрон из фильтровальной бумаги, и экстрагировали метанолом (400 мл) в течение 10 ч. Затем экстракт упаривали на роторном испарителе Heidolph® Laboratory 4002 control (337 мБар, температура 40 ± 5°С) до получения густого экстракта. Затем, густой экстракт очищали этилацетатом и н-бутанолом. Густой экстракт обрабатывали этилацетатом (1:10 вес / объем) в течение 6 часов при перемешивании, полученную смесь фильтровали. Этилацетат удаляли с помощью роторного испарителя (температура 40°С, 240 мБар). Остаток обрабатывали н-бутанолом 10% в пропорции (1:30 вес / объем) в течение 3 часов при перемешивании. Затем после удаления слоя н-бутанола проводили переосаждение сапонинов при подкислении концентрированным раствором хлористоводородной кислоты до pH = 1,0. Осадок сапонинов отделяли фильтрацией с последующей сушкой [Брежнева Т. А., 2003].

2.2.4. Определение растворимости сухого экстракта (групп БАВ)

Для изучения растворимости БАВ (суммы сапонинов) сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного использовали полярные и неполярные органические растворители такие как вода очищенная, метанол, спирт этиловый, глицерин, пропиленгликоль, ацетон, диметилсульфоксид, полиэтиленгликоль-400,

хлороформ, н-бутанол. Проводили изучение растворимости по методике ГФ XIII (ОФС 1.2.1.0005.15), с постепенным добавлением растворителя в соотношении 1:1, 1:10, 1:30, 1:100 и 1:1000.

2.2.5. Определение технологических характеристик сырья

Определение степени сыпучести сухого экстракта

Степень сыпучести порошка зависит от дисперсности, формы частиц и остаточной влажности. Мы определяли эту комплексную технологическую характеристику по двум критериям: сыпучесть и насыпной объем. Определение степени сыпучести порошка сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного проводили по методике ГФ XIII (ОФС 1.4.2.0016.15) на аппарате **ERWEKA Granulate Flow Testers GT** (Германия) в лаборатории ЦКП (НОЦ) РУДН. Навеску порошка массой 50 г, полученную путем экстракции суммы БАВ стиракса лекарственного, помещали без уплотнения в воронку аппарата Erweka GT с закрытым выходным отверстием (10, 15, 25 мм). Затем открывали выходное отверстие воронки и определяли время, за которое весь образец пройдет через отверстие воронки. Процесс повторили 3 раза.

Определение насыпного объема проводили по методике ГФ XIII (ОФС 1.4.2.0016.15) на аппарате **ERWEKA SVM 101/201 Tapped Density Tester** (Германия) в лаборатории ЦКП (НОЦ) РУДН. В сухой цилиндр помещали (без уплотнения) навеску 33,39 г порошка сухого экстракта стиракса лекарственного и определили насыпной объем V_0 мл, который был равен 78 мл. Затем производили 10, 500 и 1250 соскоков цилиндра и фиксировали объемы после уплотнения V_{10}, V_{500}, V_{1250}. Полученные результаты можно использовать для вычисления показателей:

Объёмная плотность (Bulk density):

$$P_0 = \frac{m}{V_0}$$; где

m— масса сыпучего материала, г;

V_0—объем порошка передуплотнения, мл.

Насыпная плотность (Tapped density):

$$P_{\text{н}} = \frac{m}{V}\text{; где}$$

m— масса сыпучего материала, г;

V—объем порошка после уплотнения, мл.

Коэффициент прессуемость (Carr's Index - CI%):

$$\text{К}_{\text{пр}} = \frac{\text{Р}_{\text{н}} - \text{Р}_{0}}{\text{Р}_{\text{н}}} . 100 = \frac{V_0 - V}{V_0} . 100\text{ ; \%}$$

Соотношение Хауснера (Hausner Ratio):

$$\text{Х} = \frac{\text{Р}_{\text{н}}}{\text{Р}_{0}} .$$

2.2.6. Качественное определения сапонинов в СЭСЛ

Для подтверждения наличия сапонинов в сумме экстрагируемых веществ, проводились реакции идентификации.

1. Качественная реакция, основанная на физических свойствах сапонинов - Реакция пенообразования: довольно характерная реакция, так как других веществ, обладающих способностью к пенообразованию кроме сапонинов, в растениях не встречается. Методика: по 0,5 мл водного раствора экстракта околоплодников стиракса лекарственного помещают в две пробирки (мерные, с одинаковым диаметром). В одну из пробирок помещают 5 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,1М, в другую - 5 мл раствора натрия гидроксида 0,1М. Обе пробирки интенсивно встряхивают в течение 1 мин. Проводят измерение высоты столбика пены в обеих пробирках [8, 9].

2. Качественная реакция, основанная на биологических свойствах сапонинов - Реакция гемолиза. Методика: 0,2 г сухого экстракта стиракса лекарственного растворяют в 5 мл изотонического раствора натрия хлорида, добавляют полученный раствор к 1 мл взвеси дефибринированной крови. В контрольную пробирку к 1 мл взвеси дефибринированной крови добавляют 5 мл изотонического раствора натрия хлорида [8, 9].

Раствор для гемолиза готовится следующим образом: полученная от добровольца кровь обрабатывается раствором антикоагулянта – натрия стеарата 3,2% (Vacuette, greiner bio-one), подвергается центрифугированию, после чего сливается надосадочная жидкость – плазма. Далее добавляют физиологический раствор и пробирку аккуратно переворачивают несколько раз таким образом, чтобы не допустить механического разрушения. Затем полученную смесь центрифугируют (2500-3000 об / мин в течение примерно 1-2 минут) и производят замену физиологического раствора на чистый, так как предыдущий содержит белки, лейкоциты и другие компоненты крови. Процедуру повторяют до момента, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной и чистой.

3. Качественные реакции, основанные на химических свойствах сапонинов

К 0,2 г. сухого экстракта СЭСЛ прибавляют 1 мл хлороформа и 5 капель концентрированной серной кислоты. Появиться желтое окрашивание, постепенно переходящее в красное окрашивание (тритерпеновые сапонины) [ТУ 9377-075-04868244-2008].

Другие качественные реакции, основанные на химических свойствах сапонинов (Цветные реакции) мы проводили с реактивами: раствором кислоты серной концентрированной, раствором ванилина и кислоты серной концентрированной при нагревании (реакция Санье), хлороформом с кислотой серной концентрированной (реакция Сальковского) [8, 9].

2.2.7. Методика количественного определения сапонинов в сухом экстракте – ^{1}H ЯМР

На основании ГФ XIII (ОФС.1.2.1.1.0007.15), количественная спектроскопия ^{1}H ЯМР считается надёжный методом определения содержания ЛС в отсутствие стандартного образца с использованием сигналов введенного в аналит любого калибровочного соединения в известной концентрации.

В ходе исследований была использована методика ^{1}H ЯМР для количественного определения сапонинов в сухом экстракте. Исследование проводились на приборах ^{1}H ЯМР - спектрометр (JEOL, Япония) «Jeol JNM-ECA

600» и «Jeol JNM-ECS 400», на базе Центра коллективного пользования ЦКП (НОЦ) РУДН. Благодарим Ивлева В. А. за помощь в количественном определении.

Методика: Проведен анализ сухого экстракта стиракса лекарственного на содержание сапонинов методом количественной спектроскопии ЯМР1Н. К точной навеске 46,3 мг сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ) добавляют 1 мл DMSO-d6, встряхивают в течение 1 минуты, центрифугируют в течение 5 минут при 14000 об/мин. Раствор переносят в стандартную ампулу для ЯМР d=5 мм. Регистрируют спектр ^{1}H ЯМР при следующих условиях: 90º импульс, смещение 5 м.д., развертка 15 м.д., 32 К точек на спектр, 32 повторений, задержка между импульсами 40 с.

Определение содержания сапонинов проводят сравнением интегральной интенсивности откалиброванного по остаточному содержанию протонсодержащего изотопа DMSO-d_6, и сигналов сапонинов, описанных в статье Y. Yayla et al. (2002 г.) (Таб. 2.2.). Условия регистрации спектра ЯМР ^{1}H сапонинов образца были такими же, как и для стандартного образца в статье.

Таблица 2.2. – Результаты 1Н ЯМР сапонинов стиракса А, В, С и дезацилсапонин - Y. Yayla 2002 г.

	1 стиракс сапонин А	**2** стиракс сапонин В	**3** стиракс сапонин С	**4** стиракс деацил сапонин
	^{1}H	^{1}H	^{1}H	^{1}H
1	0.88, 1.51	0.88, 1.52	0.88, 1.51	0.88, 1.51
2	1.96, 1.56	1.96, 1.56	1.96, 1.56	1.95, 1.56
3	2.97	2.97	2.97	2.96
4	–	–	–	–
5	0.70	0.70	0.70	0.70
6	1.49, 1.34	1.49, 1.33	1.48, 1.34	1.51, 1.35
7	1.46, 1.23	1.46, 1.23	1.46, 1.23	1.46, 1.22
8	–	–	–	–
9	1.56	1.56	1.56	1.56
10	–	–	–	–
11	1.82, 1.82	1.82, 1.82	1.82, 1.82	1.82, 1.82
12	5.26	5.25	5.26	5.28
13	–	–	–	–
14	–	–	–	–
15	1.20, 1.58	1.21, 1.58	1.20, 1.58	1.20, 1.58
16	3.93	3.97	3.93	4.20
17	–	–	–	–
18	2.45	2.45	2.45	2.55
19	2.52, 1.10	2.52, 1.10	2.52, 1.10	
20	–	–	–	–
21	5.74	5.94	5.73	4.19
22	5.41	5.56	5.41	3.89
23	0.98	0.98	0.98	0.98
24	0.79	0.79	0.79	0.76
25	0.89	0.89	0.89	0.85

Для сапонина В был выбран сигнал при 5.94 м.д., для сапонинов А и С выбрана совокупность сигналов в области 5.70-5.8 м.д и 5.41 м.д. Сигналов дезацилсапонина, не перекрывающихся другими сигналами, не обнаружено.

Для количественного определения измерют интегральную интенсивность сигналов сапонинов стиракса. Процентное содержание каждого сапонина в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество (*X,* % масс) вычисляют по формуле:

$$X,\ \%_{\text{масс}} = 100 \cdot (S'/S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100/(100 - W)],$$ где

S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

M – молекулярная масса определяемого вещества;

M_0 – молекулярная масса;

a – навеска испытуемого образца;

a_0 – навеска вещества-стандарта;

W – содержание влаги, %.

2.2.7.1. Валидация методики количественного определения сапонинов в сухом экстракте – ЯМР ^{1}H

Проводимое нами исследование требует разработки новых методик контроля качества полученной лекарственной субстанции, обязательным требованием к которым является их валидация.

Проведенная валидация демонстрирует, что методика количественного определения сапонинов в сухом экстракте с помощью ^{1}H ЯМР- спектроскопии пригодна и соответствует заложенным критериям приемлемости.

Валидацию проводили по следующими аналитическими параметрам:

- **Специфичность (Specificity)**

Способность методики однозначно оценивать активные вещества (сапонины стиракса) в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце.

Критерии приемлемости и их оценка:

1- Примесные соединения:

А) Должны отсутствовать пики, которые мешают определению анализируемых веществ. Оценка критерия: на хроматограмме – ЯМР^{1}Н суммы сапонинов стиракса нет никаких сигналов, мешающих определению пиков сапонинов стиракса A, B, C.

Б) На ^{1}Н ЯМР – спектре образца сапонинов не должно быть пиков, принадлежащих растворителю и имеющих такие же сигналы (м.д.).

Оценка критериев была достигнута при использовании сухого экстракта сапонинов и DMSO-d_6 в качестве растворителя для подготовки образцов для ^{1}Н ЯМР.

2) Содержание основных веществ: интенсивность сигналов спектра ЯМР^{1}Н испытуемого образца, должна соответствовать интенсивности сигналов стандартного спектра ЯМР^{1}Н.

Оценка критерия: на ^{1}Н ЯМР – спектре образца сапонинов, сигналы в области 5,41-5,74 м.д. и при 5,73 м.д. соответствуют сапонинам стиракса 1(A) и 3 (C). Сигналы при 5,94 м.д. соответствуют сапонину стиракса 2 (B). Условия регистрации стандартного спектра ЯМР^{1}Н (Y.Yayla et al. / Fitoterapia 73 (2002) 320-326) были такими же, как и для наших образцов (^{1}Н ЯМР-спектрометры, 500 MHz и 125 MHz, растворитель DMSO-d_6).

- **Сходимость/повторяемость (convergence)**

Критерий сходимости характеризует прецизионность методики при ее выполнении в одних и тех же условиях с одним и тем же аналитиком в течение небольшого промежутка времени. В течение одного дня, один лаборант-исследователь проводил 5 измерений количественного содержания сапонинов в экстракте для одного и того же образца с помощью ЯМР-^{1}Н.

Критерии приемлемости и их оценка

Относительное стандартное отклонение ($S_{r\%}$) при оценке сходимости полученных результатов определения содержания сапонинов стиракса в сухом экстракте должно быть ≤ 5 % (α=0,05).

Результаты определения количественного содержания сапонинов стиракса и их статистической обработки представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3. – Математическая обработка результатов измерений и испытания сходимости методики

Показатели	**№ образца x_i**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Массовое содержание сапонинов стиракса в сухом экстракте, %	28,3	29,1	29,4	28,7	29,3
$\bar{x}$-среднее массовое содержание сапонинов стиракса в сухом экстракте, %	28,96				
$(x_i - \bar{x})^2$	0,435	0,019	0,193	0,067	0,115
Стандартное отклонение S	$\sqrt{\frac{0,829}{4}} = 0,455$				
Относительное стандартное отклонение $S_{r\%}$	$\frac{0,455}{28,96} \times 100 = 1,571$				
Приемлемость результатов	$S_{r\%} \leq 5$ → удовлетворяет требованиям				

- **Точность (Accuracy)**

Методика количественного определения сапонинов в сухом экстракте должна обеспечивает требуемую точность оценки показателей. Для определения точности методики готовили 5 параллельных образцов и проводили количественное определение сапонинов в сухом экстракте методом ЯМР ^{1}Н.

Критерии приемлемости и их оценки

Относительное стандартное отклонение ($S_{r\%}$) при оценке точности полученных результатов определения содержания сапонинов стиракса в сухом экстракте должно быть ≤ 5 % (α=0,05).

Результаты определения количественного содержания сапонинов стиракса в 5 параллельных образцов и их статистической обработки представлены в таблице 2.4.

Таблица 2.4. – Математическая обработка результатов измерений и испытания точности методики

Показатели	**№ образца x_i**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Массовое содержание сапонинов стиракса в сухом экстракте, %	30,4	30,1	29,3	28,3	29,7
$\bar{x}$-среднее массовое содержание сапонинов стиракса в СЭСЛ, %	29,56				
$(x_i - \bar{x})^2$	1,587	0,291	0,705	0,019	0,067
Стандартное отклонение S	$\sqrt{\frac{2,669}{4}} = 0,816$				
Относительное стандартное отклонение $S_{r\%}$	$\frac{0,816}{29,3} \times 100 = 2,7$				
Приемлемость результатов	$S_{r\%} \leq 5$ → удовлетворяет требованиям				

- **Воспроизводимость (Reproducibility)**

Воспроизводимость результатов анализов отражает близость результатов измерений, выполняемых в различных условиях по данной методике. Например, в различное время, в различных местах или на различных приборах.

Для определения воспроизводимости нашей методики проводили анализ количественного определения сапонинов стиракса из одного и того же образца на двух разных ЯМР-спектрометрах, «Jeol JNM-ECA 600» и «Jeol JNM-ECS 400».

Критерии приемлемости и их оценки

Относительное стандартное отклонение ($S_{r\%}$) при оценке воспроизводимости полученных результатов определения содержания сапонинов стиракса в сухом экстракте должно быть ≤ 5 % (α=0,05).

Результаты определения количественного содержания сапонинов стиракса на двух разных ЯМР-спектрометрах и их статистическая обработка представлены в таблице 2.5.

Таблица 2.5. – Математическая обработка результатов измерений и испытания воспроизводимости методики

Показатели	**ЯМР-спектрометр**	
	Jeol JNM -ECA 600	**Jeol JNM -ECS 400**
Массовое содержание сапонинов стиракса в сухом экстракте, %	29,4	30,1
$\bar{x}$-среднее массовое содержание сапонинов стиракса в сухом экстракте, %	29,75	
Стандартное отклонение S	0,494	
Относительное стандартное отклонение $S_{r\%}$	$\frac{0,494}{29,75} \times 100 = 1,66$	
Приемлемость результатов	$S_{r\%} \leq 5$ → удовлетворяет требованиям	

Вышеуказанные тесты подтверждают достоверность данной методики для количественного определения сапонинов в сухом экстракте с помощью ЯМР-^{1}Н.

2.2.8. Исследование биологической активности БАВ и полученных от них препаратов

Исследование специфической активности сапонинов околоплодников стиракса лекарственного в опытах *in silico*

Разработка методов оценки безопасности и эффективности на основе технологий биоинформатики и компьютерного конструирования лекарств считается одним из перспективных направлений медицинской науки. В связи с этим мы выбрали этот метод для предварительной характеристики сапонинов из стиракса лекарственного на этапе обоснования разработки ЛП.

Использован комплекс программного обеспечения, находящегося в свободном доступе в сети Интернет. Одним из основных сайтов является база данных PDB (Protein Data Bank), сайт, который содержит банк данных

кристаллических форм многих белков и соединений (ферменты, нуклеиновые кислоты и др.).

Компьютерные программы, использованные в исследованиях

1- Создание действующих химических структурных формул сапонинов стиракса /Drawing the chemical structures of styrax saponins

- **Программа Marvin Sketch** 17.1.23.0 (http://www.Chemaxon.com/)

2- Прогнозирование биологической активности созданных химических структур сапонинов стиракса / Prediction of activity for chemical structure of styrax saponins

- **Программа PASS** (Prediction of activity spectra of substances):

Использовался свободно доступный веб-ресурс PASS Online на сайте http://www.way2drug.com/ для предсказания спектров биологической активности органических соединений на основе анализа связей структура–активность, со средней точностью свыше 95%.

Исследование специфической активности экстрактов стиракса лекарственного в опытах *in vitro*

А- Изучение спермицидного действия суммы сапонинов сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного

Материалы исследования: эякуляты, полученные у 12 мужчин с нормозооспермией в возрасте около 30 лет. Концентрацию спермиев, число подвижных спермиев, число активно подвижных спермиев, время переживания спермиев, pH оценивали согласно лабораторному руководству ВОЗ для обследования и обработки спермы человека, пятое издание (WHO laboratory manual, 2010 г.) до и после эквилибрации спермы с водными растворами сапонинов.

Методика: Образцы семени сжижают при 37 °C в течение 30 минут, затем сперму анализируют с помощью цитоморфологического метода в камере Makler для подсчета сперматозоидов (Jiangsu Joymed TechCo., Шанхай, Китай) на световом микроскопе при ×200. В основании камеры имеется отверстие с

прозрачным стеклянным диском внутри, на 10 микрон ниже поверхности пластины. Когда верхняя часть устройства покрыта покровным стеклом, камера с постоянной глубиной 10 микрон готова. К измерениям Камера Makler имеет глубину 0,01 мм. Площадь сетки в центре покровного стекла составляет 1 × 1 мм и делится на 100 меньших квадратов, каждый из которых составляет 0,1×0,1 мм.

5 мкл спермы загружают в камеру и покрывают покровным стеклом. Избыток жидкости спермы стекает вниз в зазор между донным стеклянным диском и верхней стеклянной пластиной. Чтобы обеспечить постоянный подсчет, в каждой камере подсчитывается не менее 200 сперматозоидов.

Количество сперматозоидов определяется путем подсчета клеток в 10 или более квадратах в разных областях сетки, а затем вычисляют среднее значение; это значение затем умножают на 100 000, чтобы получить концентрацию в миллион на мл единицы (м/мл).

Принятые для исследования образцы соответствовуют значениям нормального эякулята в последнем ВОЗ рекомендации (1-10-2011) (Таб. 2.6.).

Таблица 2.6. – Показатели нормального эякулята

Показатель		**Значение**
1.	Объем эякулята, мл	< 1,5
2.	Общее количество спермиев.	$< 40 \times 10^6$
3.	Концентрация спермиев, м/мл	< 20
4.	Число подвижных спермиев, %	< 43
5.	Число активно подвижных спермиев, %	<32
6.	Живые сперматозоиды, %	< 58
7.	pH спермы	< 7,2

После исследования нативных образцов спермиев, добавляют водные растворы различных концентраций сапонинов стиракса в хлориде натрия 0,9% (физиологическом растворе). Сперма и исследуемые растворы сапонинов используются в равных объемах. Оценивают результаты активности водных растворов сапонинов стиракса моментально после их добавления к спермам,

затем через 30 и 60 с, далее через 10, 15 и 30 мин после инкубации. В контроле используют физиологический раствор (хлорида натрия 0,9%). Результаты обработали с помощью программы Statistica MS Exsel.

Б - изучения антимикробной активности сухого экстрактов околоплодников стиракса лекарственного *Styrax officinalis* L. в опытах *in vitro*

Изучение бактериостатической и фунгистатической активности

Эксперименты проведены в лаборатории микробиологических исследований ФГБНУ ВИЛАР, благодарим зав. лабораторией микробиологических исследований ВИЛАР, к.б.н. Фатееву Т.В. за помощь в исследованиях.

При изучении бактериостатической и фунгистатической активности в опытах *in vitro* использовали метод двукратных серийных разведений препаратов в жидких питательных средах.

- **Микроорганизмы:**

В качестве тест-микроорганизмов использовали патогенные грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 209-P (ATCC 6538), грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, дрожжеподобные грибы *Candida albicans*ATCC 10231 и мицелиальные грибы *Microsporum canis* 252.

- **Среды:**

При определении бактериостатической активности исследуемых образцов использовали мясо-пептонный бульон (МПБ). При определении фунгистатической активности – жидкую среду Сабуро.

- **Методики экспериментов:**

1)-Определение бактериостатической активности

С целью изучения жидких экстрактов готовят ряд опытных пробирок с 2 мл среды (МПБ). В 1-ю пробирку добавляют 2 мл изучаемого образца экстракта, изначально разведенного 1:2, и получая таким образом исходное разведение 1:4.

Затем, путем последовательного разведения исследуемого экстракта в питательной среде в 2 раза готовят ряд убывающих разведений.

При изучении сухого экстракта навеску препарата около 32 мг (точная навеска) взвешивали на торсионных весах, переносят в стерильную пробирку и стерилизуют в течение 1 часа 96% спиртом (субстанция должна быть полностью покрыта спиртом). Затем в эту пробирку добавляют соответствующую питательную среду в количестве 4,0 мл, необходимую для создания исходной концентрации препарата – 8000 мкг/мл. В остальные пробирки добавляют по 2 мл питательной среды и затем, путем двукратных разведений, готовят ряды убывающих концентраций препарата (опытные пробирки). Последняя пробирка с чистой средой (без добавления экстракта) служит контролем. После этого все пробирки (опытные и контрольные) засевают культурами микроорганизмов.

Взвеси грамположительных и грамотрицательных бактерий готовят в изотоническом растворе натрия хлорида по бактериальному стандарту мутности ОСО 42-28-85-2014 (10 МЕ) (10^9 микробных тел/мл). Из первой пробирки, содержащей 10^9 микробных тел/мл, путем десятикратных разведений в изотоническом растворе натрия хлорида готовят ряд убывающих концентраций микроорганизмов: 10^8, 10^7 10^6, 10^5 , 10^4. Затем, в каждую опытную пробирку, вносят по 0,2 мл взвеси, содержащей 10^4 микробных тел/мл (рабочая микробная нагрузка). Посевы инкубируют в термостате при температуре 37°С в течение 24 часов. Опыты проводят в трех повторностях.

2)- Определение фунгистатической активности

С целью изучения жидких экстрактов готовили ряд опытных пробирок с 2 мл среды (Сабуро) и в 1-ю пробирку добавляли 2 мл изучаемого экстракта, изначально разведенного 1:2, и получая таким образом исходное разведение 1:4. Затем, путем последовательного разведения экстракта в питательной среде в 2 раза готовили ряд убывающих разведений.

Методика: При изучении сухого экстракта навеску препарата около 32 мг (точная навеска) взвешивают на торсионных весах, переносят в стерильную пробирку и стерилизовали в течение 1 часа 96% спиртом (чтобы субстанция была полностью покрыта спиртом). Затем в эту пробирку добавляют соответствующую питательную среду в количестве 4,0 мл, необходимым для создания исходной концентрации препарата – 8000 мкг/мл. В остальные пробирки добавляют по 2 мл питательной среды и затем, путем двукратных разведений, готовят ряды убывающих концентраций препарата (опытные пробирки). Последняя пробирка с чистой средой (без добавления экстракта) служит контролем. После этого все пробирки (опытные и контрольные) засевают культурами микроорганизмов.

Взвесь грибов готовят в изотоническом растворе натрия хлорида по бактериальному стандарту мутности ОСО 42-28-85-2014 (10 МЕ) (10^9 микробных тел/мл), затем полученную взвесь разводят изотоническим раствором натрия хлорида в 20 раз. В опытные и контрольные пробирки засевают по 0,2 мл полученной взвеси. Посевы инкубируют при температуре 30-32°С: дрожжеподобные грибы – в течение 48 часов, мицелиальные грибы − в течение 10 – 14 суток. Опыты проводят в трех повторностях.

Бактериостатический и фунгистатический эффект определяли по минимальному, подавляющему рост бактерий и грибов разведением экстракта, при котором визуально не наблюдали роста микроорганизмов.

Исследование специфической активности и биологической безвредности лекарственных форм в опытах *in vivo*

А- Изучение контрацептивного действия лекарственного средства на основе сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного

На базе Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр) (ЦКП (НОЦ)) РУДН и вивария РУДН, проведено изучение контрацептивного действия и биологической безвредности (отсутствие местнораздражающего действия) образцов лекарственных препаратов на основе

сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного. Благодарим к.в.н. Карамян А. С. за помощь в работе.

Эксперименты выполнялись на крысах.

Условия содержания животных: стандартные условия вивария, размещение группами в промаркированных клетках с регулярно заменяемым подстилом, со свободным доступом к воде и пище, в условиях стандартизованного светового и температурного режимов.

Каждая группа состоит из 10 особей (5 самцов, 5 самок). Экспериментальная группа (опыт) состоит из 15-ти особей (5 самцов, 10 самок). Выбор доз осуществлялся, согласно результатам изучения спермицидной активности средства в опытах *in vitro*.

Вид:	Белые крысы
Источник:	ООО «КролИнфо»
Масса тела к началу:	180-200 г
Возраст:	30-32 нед.
Количество:	50
Пол:	самцы, самки

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты.

Световой режим: 12 часов — свет, 12 часов — темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 19–25°С, относительная влажность — 50–70 %. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. При изменении погодных условий контролировался воздухообмен в помещении с

помощью анемометра и путем измерения содержания в воздухе углекислого газа и аммиака. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO_2 не более 0.15 объемных %, аммиака — не более 0.001 мг/л.

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных. При введении препарата осмотр проводился примерно через 1 час после введения.

Было изучено контрацептивное действие удобного для введения полуфабриката- геля ВСПЭС с 1,5 % содержанием СЭСЛ в опытах *in vivo* на 45 половозрелых крысах (25 самок и 20 самцов) массой 200 ± 50 г., Возраст: 8 месяцев. Животные самки были распределены на 4 группы (Животные распределялись по группам случайным образом методом рандомизации):

1. контроль I (5 самок): интактные животные (без введения препаратов);
2. контроль II (5 самок): экспериментальные животные, которым вводили вагинально основу геля «Плацебо-гель»;
3. подопытная группа с препаратом - сравнения (5 самок): экспериментальные животные,
   которым вводили вагинальный крем Фарматекс® (лаборатория Иннотек-Франция);
4. подопытная группа (10 самок): экспериментальные животные, которым вводили вагинально 1,5 % гель сапонинов стиракса.

При изучении контрацептивного действия *in vivo* на крысах препараты вводили самкам интравагинально перед помещением их с самцами в количестве 1 мл препарата с помощью зонда (катетера ректального, Ассомедика, Беларусь) и инсулинового шприца (BD Micro-Fine Plus) 1,0 мл (одна самка крысы с пятью самцами крыс в каждой клетке) в течение 15 дней. При отсутствии коитуса через 1 часа введение препаратов повторялось.

Для полного подтверждения беременности или ее отсутствия ориентировались на ожидаемый срок беременности крыс и только при отсутствии

впоследствии родов (по истечению срока) делали заключение о контрацептивном действии препаратов.

Б- Исследование биологической безвредности ВСПЭС в опытах *in vivo* (отсутствие местнораздражающего действия)

Для исследования местнораздражающего действия ВСПЭС, у животных в группе контроля II «гелевая основа» и подопытной группе до и после эксперимента, и перед каждым нанесением разрабатываемой лекарственной формы (гель с 1,5 % содержанием сухого экстракта стиракса лекарственного) и гелевая основа обследовали для выявления раздражений, гиперемий или любых возможных повреждений, кожных инфекций.

Результаты данного изучения представлены в главе 6.

2.2.9. Изучение стабильности лекарственных форм

Одним из обязательных требований при разработке новых лекарственных форм является исследование их стабильности при хранении. За это время не должны образовываться токсичные продукты разложения или изменяться физико-химические свойства лекарственного вещества или лекарственного препарата.

Исследования стабильности вагинальных пленок, содержащих сумму сапонинов, выделенных из околоплодников стиракса лекарственного в процессе хранения проводились по показателям: описание, растворимость, подлинность, pH, количественное содержание суммы БАВ, микробиологическая чистота и масса содержимого упаковки.

Хранение вагинальных пленок, содержащих суммы сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного, осуществляли при температуре 15-30 °С и относительной влажности окружающего воздуха 60±5%в термостате ТС-1/20 СПУ (Россия).

Микробиологическое исследование лекарственной формы

Для исследования микробиологической чистоты лекарственной формы (пленки) при интравагинальном применении использовали требования ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» категории 2: общее число на 1 пленке допускается не более 100 колониеобразующей единицы суммарно

аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов, при отсутствии *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, энтеробактерий, устойчивых к желчи и *Candida albicans.*

По результатам анализа антимикробной активности сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного *Styrax officinalis L.* в опытах *in vitro* (результаты данного изучения представлены в главе 6), было установлено, что сухой экстракт стиракса лекарственного обладает антимикробным действием. Поэтому была проведена нейтрализация антимикробного действия (разведение на мембране). После фильтрации через мембранные фильтры (номинальный размер пор не более – 0,45 мкм) фильтры переносили на поверхность агаризованных питательных сред и инкубировали. Подсчет выросших колоний проводили на 1, 2 и 3 день инкубации.

Определение микробиологической чистоты проведено с использованием мембранных фильтров с размером пор – 0,22 мкм, диаметром 90 мм (ФИЛЬТР-ГАРАНТ, Россия) и микробиологических экспресс-тестов (Биоконтроль, Россия) для определения КМАФАнМ, дрожжей/грибов, плесени, сальмонеллы, стафилококков, листерий, кишечных палочек. Условия инкубации при определении микробиологической чистоты представлены в таблице 2.7. Результаты данного исследования представлены в главе 6.

Таблица 2.7. – Условия инкубации при определении микробиологической чистоты

Название микроорганизмов	**Время инкубации (час)**	**Температура инкубации (ºС)**
КМАФАнМ	24	при комнатной температуре (+22 - +25ºС)
Грибки, дрожжи, плесень	72	при комнатной температуре (+22 - +25ºС)
Salmonella / Listeria monocytogenes	48	при +35 ºС
Staphylococcaceae	48	при +35 ºС
Listeria monocytogenes	48	при +35 ºС
E.coli	24	при +35 ºС

2.2.10. Математические методыи статистическая обработка результатов анализа

Результаты обработатывали с помощью программы StatisticaMSExsel.

n – число измерений;

x_i – данные отдельных измерений;

$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$ – среднее значение из n измерений;

f = n – 1 – число степеней свободы;

$S = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$ – стандартное отклонение;

$S_r\% = \frac{S}{\bar{X}} . 100$ – относительное стандартное отклонение;

P –коэффициент надежности (доверительная вероятность);

T (p, f) – критерий Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 2

1. Сапонины стиракса лекарственного изучались современными методами.

2. Для разработки и изучения лекарственных форм спермицидного действия в качестве активной фармацевтической субстанции выбрана сумма сапонинов стиракса лекарственного сухого экстракта.

3. Вспомогательные вещества для разработки новых дозированных лекарственных форм с сапонинами стиракса представлены различными ингредиентами, разрешенными для фармацевтического использования и выпускаемые предприятиями фармацевтической отрасли.

4. В работе использованы современные методики анализа при разработке лекарственных форм и всестороннее изучении активности *in silico*, *in vitro* и *in vivo*.

ГЛАВА 3. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЫРЬЯ «ОКОЛОПЛОДНИКИ СТИРАКСА ЛЕКАРСТВЕННОГО» И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ ЕГО КАЧЕСТВА

Ввиду того, что создание контрацептивных средств для Сирийских женщин из отечественного сырья является актуальным, дальнейшей нашей задачей было фармакогностическое изучение сырья, составление разделов НД на новый вид сырья и последующее выделение из него суммы сапонинов.

Прежде чем заниматься разработкой технологии лекарственного препарата необходимо получить активную субстанцию. А если активная субстанция – сумма БАВ выделенных из лекарственного растительного сырья, то прежде всего необходимо стандартизовать сырье, разработать нормативную документацию.

НД на ЛРС состоит из трех больших разделов: Подлинность, Определение основных БАВ и Испытания.

3.1. Разработка раздела «Подлинность» на сырье: «Стиракса лекарственного околоплодники»

Раздел Подлинность состоит из 2-х подразделов: Внешние признаки и микроскопические признаки. Чтобы составить описание стиракса лекарственного в соответствии с этими разделами было проведено изучение морфологических и анатомических особенностей высушенных плодов.

3.1.1. Изучение морфологии высушенных плодов стиракса

В современной ботанической литературе отсутствует описание высушенных плодов стиракса лекарственного. В соответствии с рекомендациями ГФ XIII, при изучении мы обращали внимание на форму плодов, размеры, цвет, характер поверхности и запах.

Плоды стиракса были собраны с августа по октябрь 2015 года с растений, произрастающих в окрестностях города Латакия в Сирии.

Высушенные плоды (рисунок 3.1.) - многосемянные ягоды шарообразной формы разного размера. Апекальный конец плода чаще всего заострен (рисунок 3.3, Б). Место прикрепления плода к укороченному побегу (дистальный конец) более округлый. Размеры плодов: диаметр от 7 до 25мм. Поверхность покрыта

желтовато-коричневыми звездчатыми волосками или мелкими чешуйками. Окраска плодов варьирует: от светло-коричневого до светлого сероватого-зеленого.

Рисунок. 3.1. Внешний вид высушенных плодов.

Апекальные концы зрелых плодов открываются, показывая семена. На дереве плоды открываются до тех пор, пока семена не выпадут на землю. Различные степени открытия зрелых плодов, собранных одновременно с одного дерева показаны на рисунке 3.2.

Рисунок. 3.2. Верхушка плода (дистальный конец).

Рисунок. 3.3. Место прикрепления плода к ветке – проксимальный конец плода (А). Проксимальный (слева) и дистальный конец-верхушка плода (справа) (В)

Высохшие плоды стиракса жёсткие, разламываются трудно. Один плод может содержать 1 или 2, иногда 3 крупных яйцевидных семени (рисунок 3.4).

Рисунок. 3.4. Вид высушенного плода

Среди тканей околоплодника чётко различаются несколько слоев (рисунок 3.5.): светло-коричневая с сероватым оттенком иногда зеленоватая наружная часть плода – экзокарп; желтовато-коричневая, светлая, блестящая внутренняя часть плода – эндокарп; и прозрачный желтоватый слой мезокарпа между ними (рисунок 3.5.).

Экзокарп – наружная часть плода шероховатая, покрыта складками, пупырышками, мелкими чешуйками и густо опушена волосками. Цвет варьируется от светло-коричневого до землисто-серого и зеленовато-серого.

Эндокарп – внутренняя часть плода (рисунок 3.5.) представляет собой достаточно плотный, светло-коричневый рыже-коричневый или бежевый слой, отслаивающийся как от семени, так и от высохшей мякоти мезокарпа.

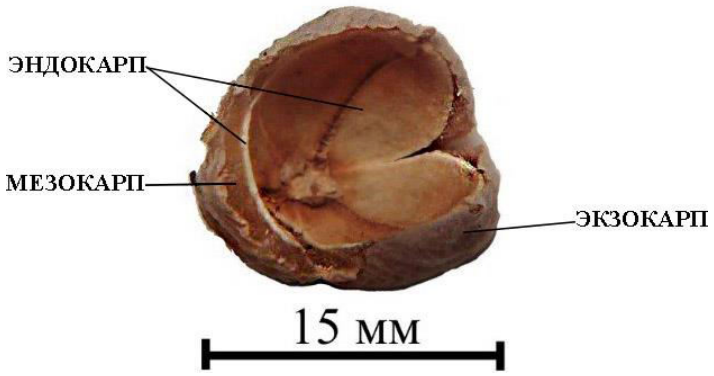


Рисунок. 3.5. Вид отделенного от семени околоплодника

Во фрагментах околоплодника после разрушения плода присутствуют темно-зеленые или светло-желтые ткани экзо - и мезокарпа, а также ткани светло-коричневого или желтого цвета (плотные), отслаивающиеся от других частей околоплодника и семени – эндокарп (рисунок .3.6).

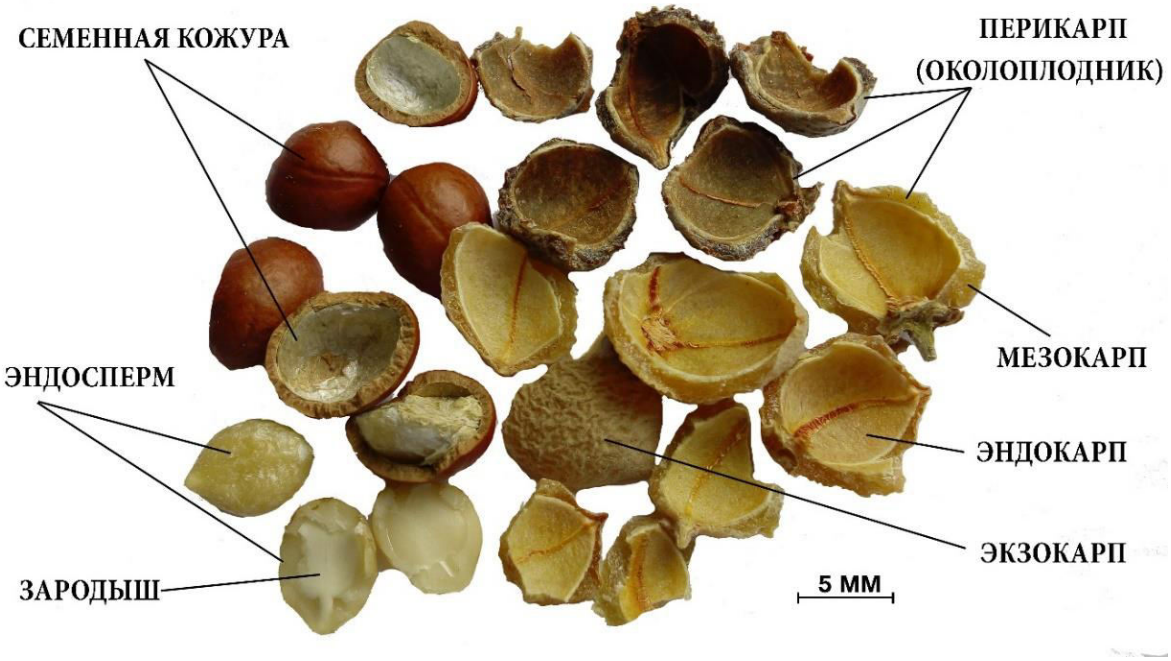


Рисунок. 3.6. Вид высушенных плодов стиракса лекарственного после их разрушения

При изучении морфологии семян стиракса лекарственного, установлено, что форма семян овально-яйцевидная или шаровидная, иногда удлиненная. Поверхность гладкая, блестящая или матовая, от светло-коричневого до бордово-коричневого цвета (рисунок 3.7). Диаметр от 5 до 15 мм.

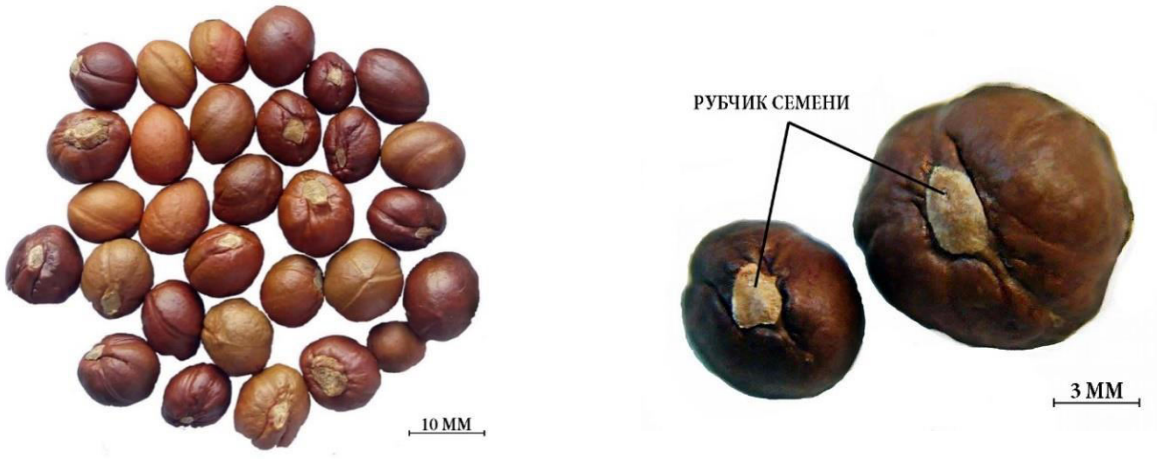


Рисунок. 3.7. Образцы типичных семян из изученного образца плодов

На рисунке (3.8, А) видны характерные полосы, которые расходятся во все стороны от верхушки семени. На рисунке (3.8, Б) виден рубчик – место прикрепления семени к внутренней стенке околоплодника.

Рисунок. 3.8. Вид дистальных концов А и проксимальных концов семян Б

При раскалывании или при распиливании семян видно, что семенная кожура желтовато-коричневого или бежевого цвета, имеет толстые стенки (рисунок 3.9.). Внутренняя поверхность семенной кожуры имеет тонкую мембрану серебристого цвета – тегмен (рисунок 3.9, а).

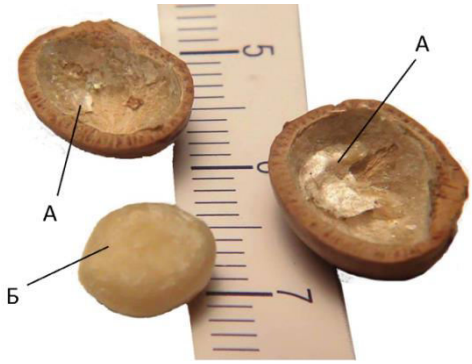


Рисунок 3.9. Вид на внутреннюю сторону семени и на зародыши
А-тегмен, Б-зародыш

На поверхности эндосперма с одной из сторон расположены пучки проводящей системы (рисунок 3.10).

Рисунок 3.10. Внешний вид эндосперма с пучками проводящей системы

На рисунке (3.11, А) показан эндосперм, покрытый слоем тегмена. Этот слой трудно удалить (рисунок 3.11, Б).

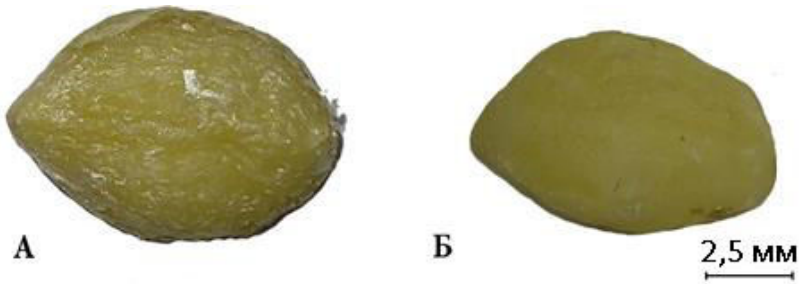


Рисунок. 3.11. Внешний вид и размеры эндосперма семян стиракса лекарственного: А- внешний вид эндосперма покрытый тегменом; Б- внешний вид аналогичного эндосперма без тегмена

Для стиракса лекарственного характерна моноэмбриония и в семени растения происходит развитие единственного зародыша. Чаще всего при распиливании семян вдоль или поперек, виден один созревший семязачаток, в котором находится один зародыш (рисунок 3.12.). Сплюснутый и округлый эндосперм семени стиракса лекарственного, освобожденный от семенной кожуры, с одного конца заостренный, с другого - округлый. Размеры эндосперма: длина от 4 до 11 мм, толщина - от 1 до 3мм, ширина – от 3 до 8 мм. Внутри эндосперма виден один зародыш белого цвета.

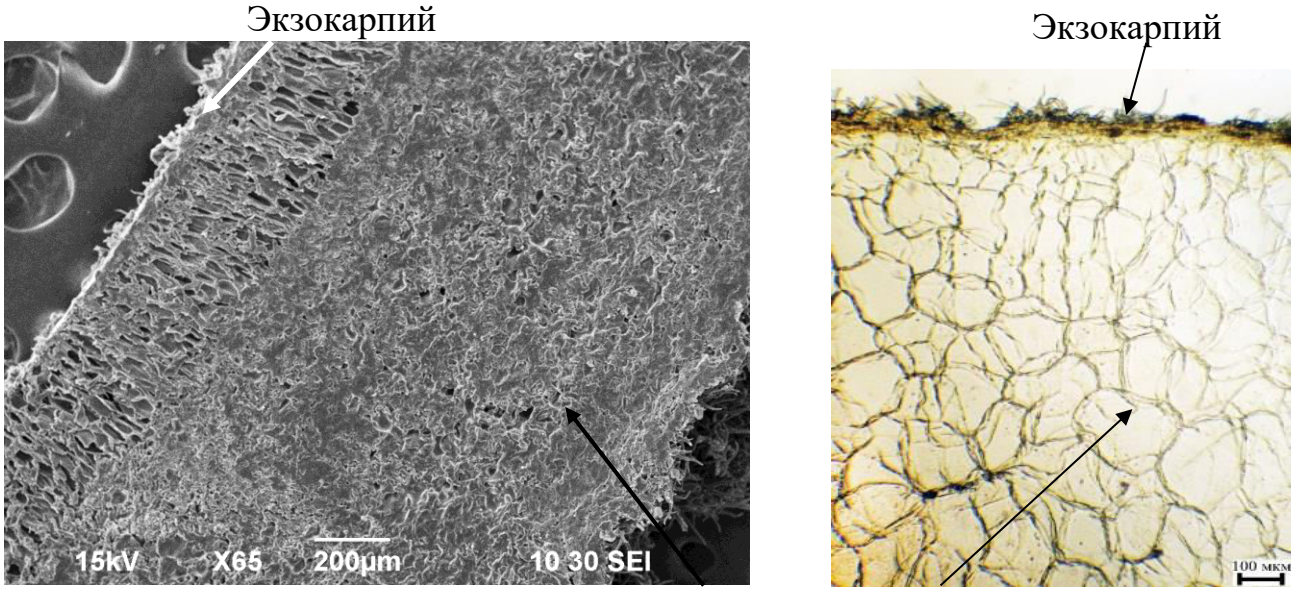
Рисунок 3.12. Эндосперм с зародышем

Разработан нами проект НД на изученное сырье (Околоплодники стиракса лекарственного) представлены в приложении № 4.

3.1.2. Изучение диагностических признаков в анатомическом строении плодов стиракса лекарственного

Раздел «Микроскопия» является обязательной частью НД на ЛРС для установления его подлинности. При изучении нового вида сырья, с целью выявления его диагностических признаков, нами была получена общая картина анатомического строения различных тканей плода изучаемого растения.

Изучение анатомического строения плодов стиракса показывает, что перикарпий состоит из трёх слоёв: экзокарп, мезокарп и эндокарп. Экзокарп представлен слоем наружной эпидермы (рис. 3.13: а, б).

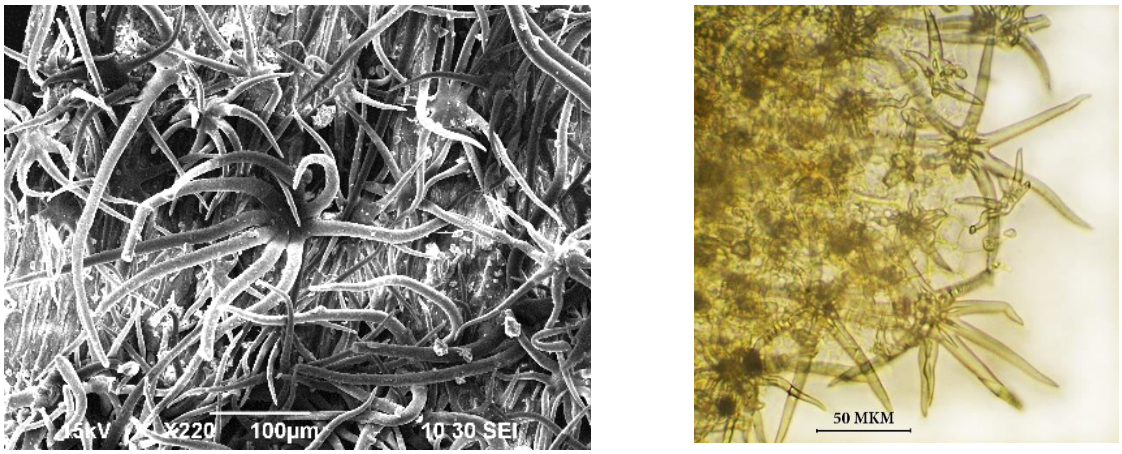


а (СЭМ) б (ОМ)

Рисунок. 3.13. Поперечный срез экзокарпия и мезокарпия плода Стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.)

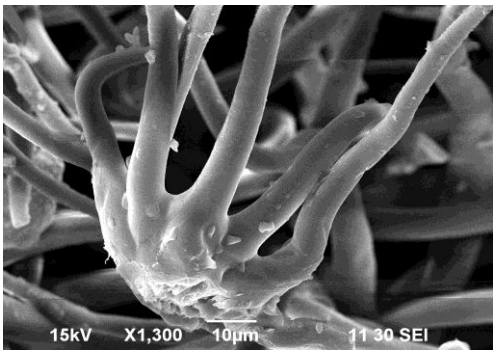
1. **<u>Экзокарп:</u>**

Наружная поверхность плода густо покрыта звёздчато-лучистыми трихомами. Клетки экзокарпа мелкие, толстостенные, расположены в 2-4 слоя. (рис. 3.14: а, б). Волоски состоят из 4-12 заостренных клеток, выходящих из одного основания в разные стороны толщиной 6-9 мкм (рис. 3.15: а, б, с).

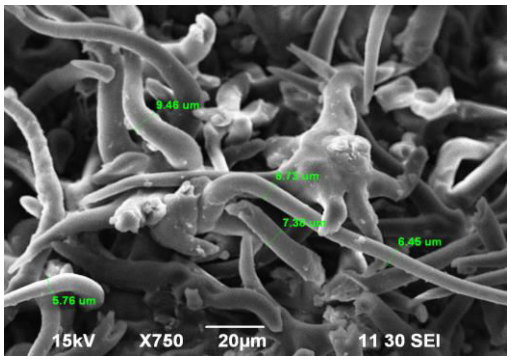


а (СЭМ) б (ОМ)

Рисунок. 3.14. Многочисленные звезчатые трихомы на поверхности экзокарпа



а (СЭМ)



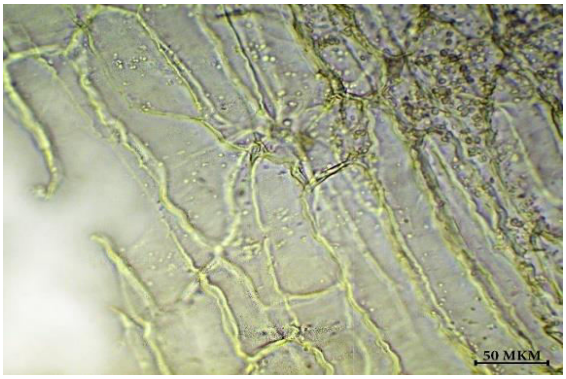
б (СЭМ)

Рисунок. 3.15. Звезчато-лучистые трихомы

с

2. <u>Мезокарп</u>

Мезокарп состоит из крупных, округлых к наружной части и вытянутых со слабо извилистыми стенками к внутренней части околоплодника клеток. В верхней части мезокарпа встречаются кубические кристаллы. Проводящие элементы расположены в мезокарпе ближе к внутренней поверхности околоплодника. Рядом с ними встречаются одиночные склеренхимные клетки или их группы по 2-3 клетки (рис. 3.16: а, б, с, д). В примыкающих к экзокарпию клетках содержатся хлоропласты, а клетки, примыкающие к эндокарпию, нередко служат местом накопления крахмальных зёрен (рис 3.17: а, б).

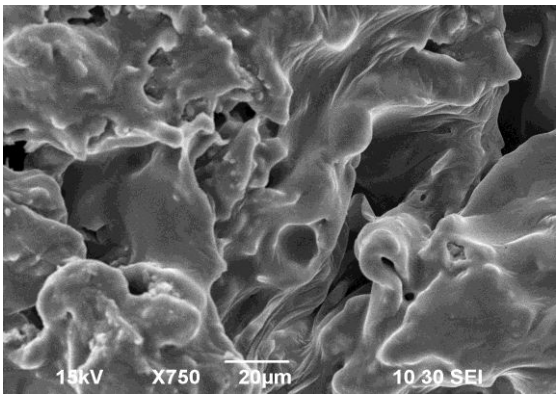


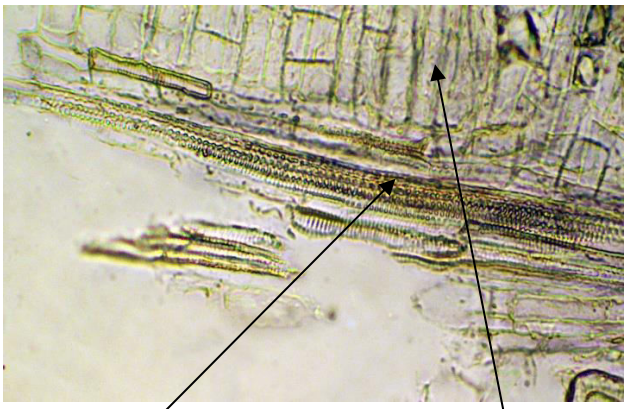
а (ОМ)

Продольный разрез

б (ОМ)

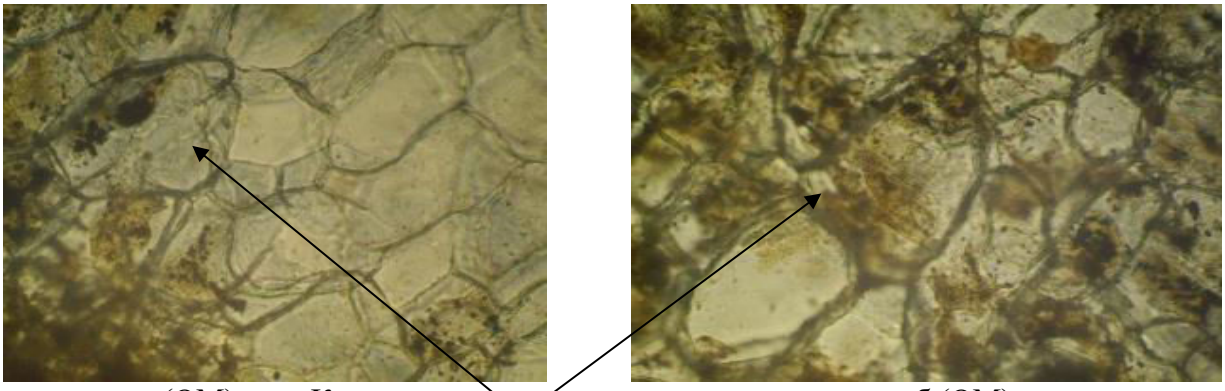
Поперечный разрез





с (СЭМ) д (ОМ)

Рисунок. 3.16. Срез мезокарпия плода Стиракса лекарственного



а (ОМ) Крахмальные зёрна б (ОМ)

Рисунок. 3.17. Крахмальные зёрна в мезокарпе Стиракса лекарственного (после окрашивания раствором Люголя)

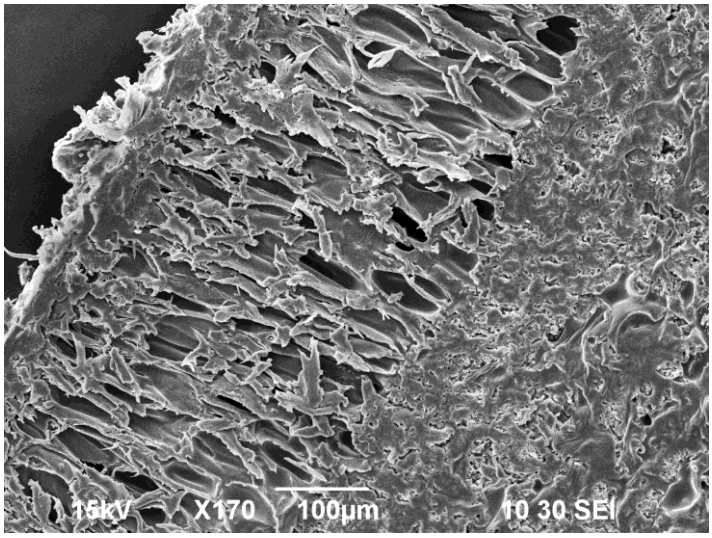
3. <u>Эндокарп:</u>

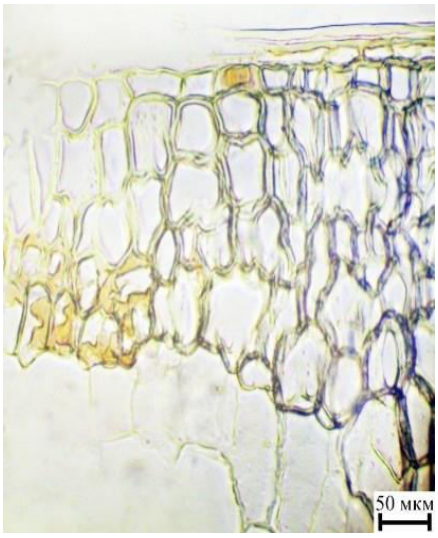
Эндокарп представлен толстостенными пористыми клетками, расположенными в несколько слоев и уменьшающимися в размерах к внутренней части околоплодника (рис. 3.18: а, б).

Поверхность эндокарпа ровная, местами с выемками, имеющими размеры клеток 30х50 мкм. Главная часть эндокарпа представлена склеренхимой, клетки которой непосредственно примыкают к мезокарпию. Часть эндокарпа, обращённая к полости плода - внутренний эпидермис. На внутреннем эпидермисе плода имеется губчатый слой – аэренхима (рис. 3.18: а, б).

На эндокарпе также имеются трихомы. Они состоят из одной или нескольких длинных заостренных клеток, выходящих из одного основания.

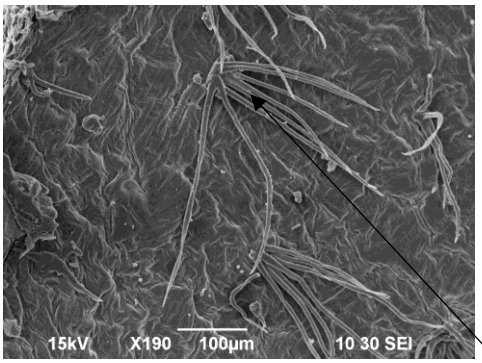
В отличие от трихом экзокарпия они расположены спорадически (рис. 3.19: а, б, с, д).

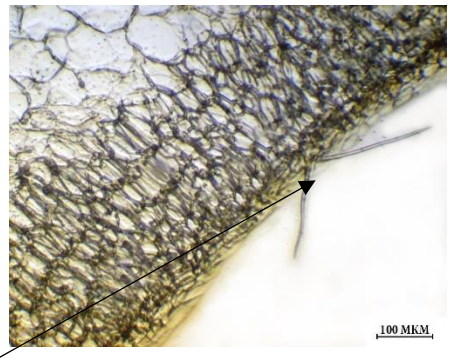




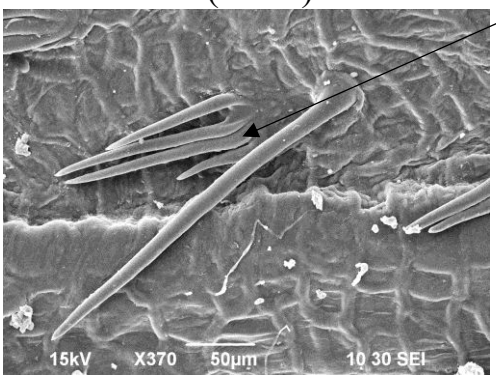
а (СЭМ) б (ОМ)

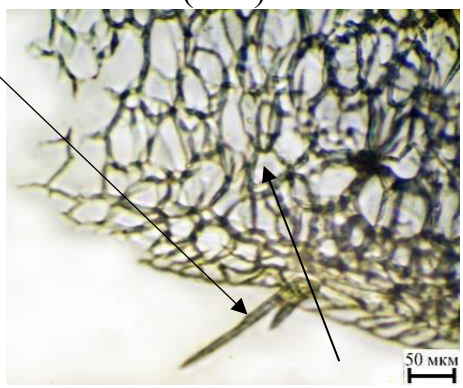
Рисунок. 3.18. Поперечный срез эндокарпия плода Стиракса лекарственного





а (СЭМ) Трихомы б (ОМ)





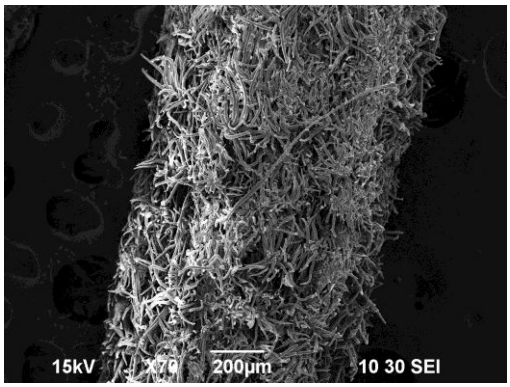
Паренхима эндокарпия

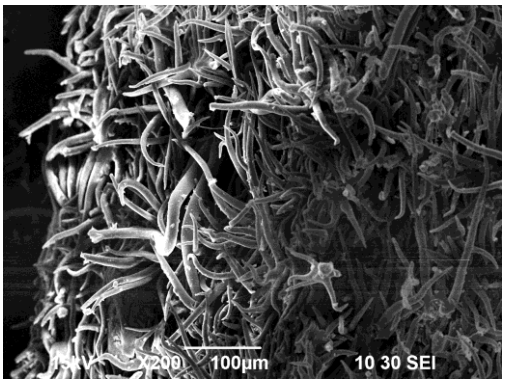
с (СЭМ) д (ОМ)

Рисунок. 3.19. Эндокарп в плане (а,с) и поперечные срезы эндокарпа (б, д)

4. <u>Плодоножка:</u>

Плодоножка имеет цилиндрическую форму и густо покрыт звезчатыми трихомами (рис. 3.20: а, б).



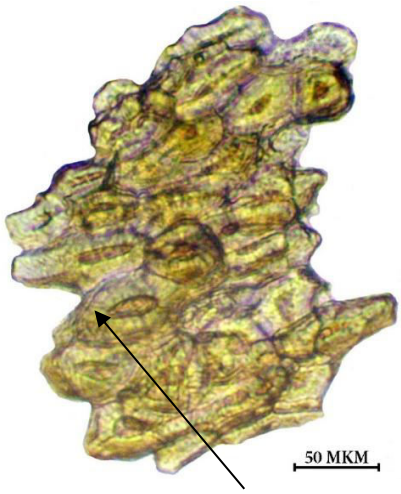


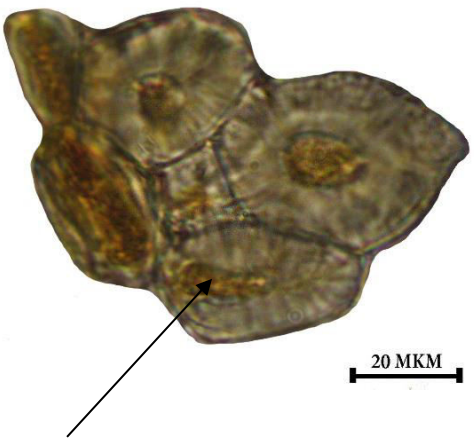
а (СЭМ) б (СЭМ)

Рисунок. 3.20. Плодоножка покрыта волосками.

5. <u>Семенная кожура:</u>

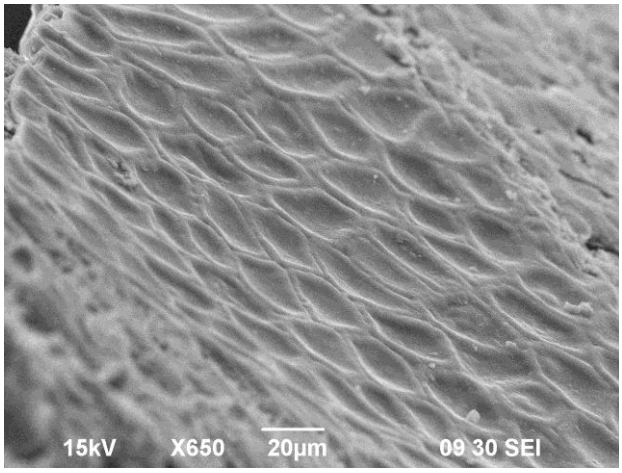
Семенная кожура очень твердая и даже после размачивания микропрепараты из нее можно приготовить только соскабливанием с помощью скальпеля. Клетки семенной кожуры крупные, толстостенные, вытянутые по форме и заостренные с 2-х концов. (рис. 3.21: а, б, рис.3.22: а). Внутренняя часть семенной кожуры (соскобленные кусочки были перевернуты) состоит из полигональных, иногда округлых клеток с хорошо заметными порами (рис. 3.22: б).



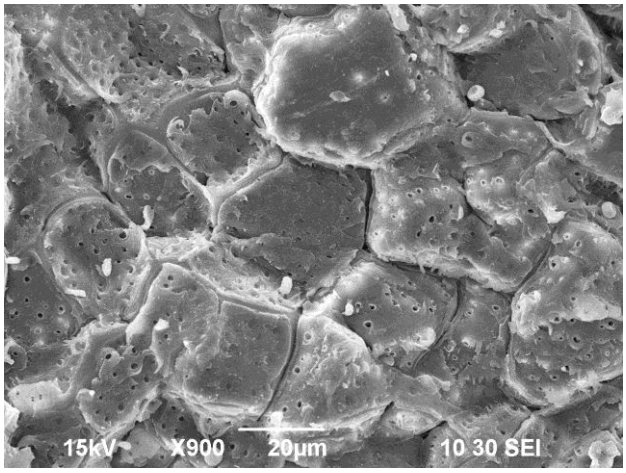


Клетки, формирующие слой семенной кожуры

Рисунок. 3.21. Клетки семенной кожуры Стиракса лекарственного



а – наружная поверхность (СЭМ)



б – внутренняя структура (СЭМ)

Рисунок. 3.22. Семенная кожура.

6. Эндосперм и зародыш:

Эндосперм покрыт тегменом, тонкой пленкой, выполняющей механическую функцию (рис 3.23.).

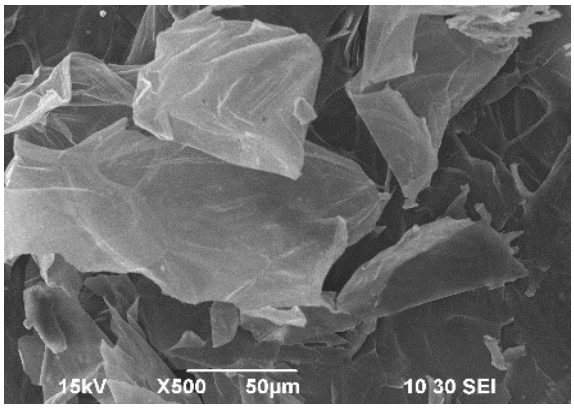
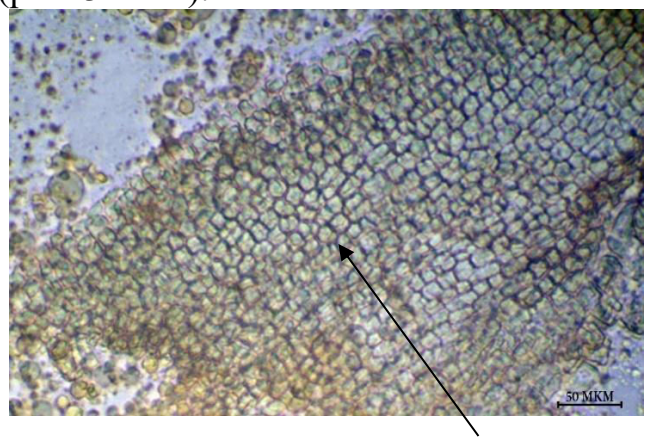
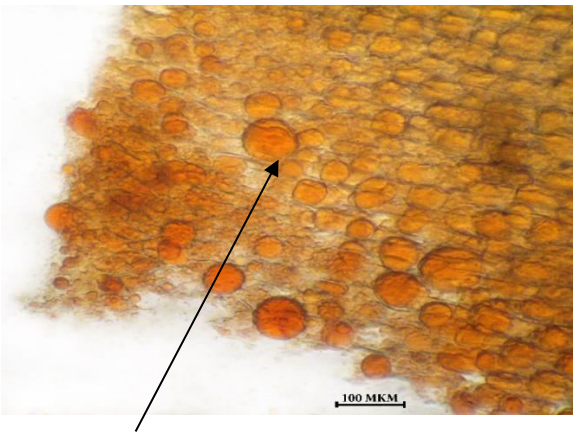


Рисунок 3.23. Тегмен эносперма

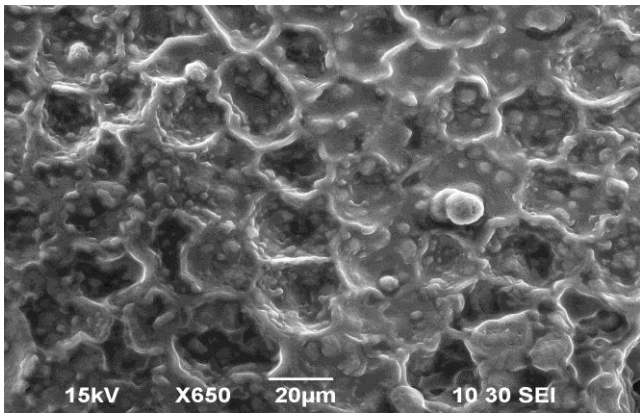
Клетки эндосперма мелкие, полигональные, содержат капли масла масла (рис. 3.24: б).

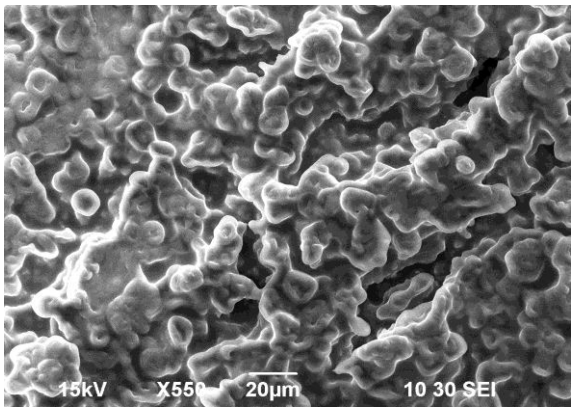


а (ОМ) Клеткиэндосперма



Капли масла б (ОМ)





с (СЭМ) д (СЭМ)

Рисунок.3.24. Эндосперм и зародыш Стиракса лекарственного.

7. Пленка между семенами

Пленка между семенами состоит из сильно вытянутых тонкостенных клеток под которыми ведны очертания подлежащих тканей (рис 3.25).

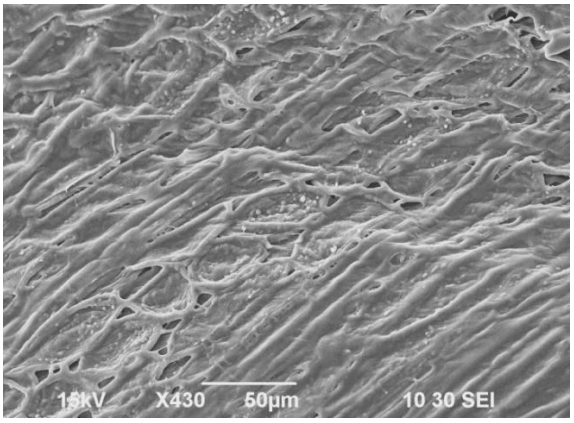


Рисунок. 3.25. Пленка между семенами

Полученные нами данные представлены в проекте НД на изученное сырье (Околоплодники стиракса лекарственного) представлены в приложении 4.

Следующий, после раздела «Подлинность» в ФС на ЛСР идет раздел «Определение основных групп биологически активных веществ» (БАВ). Для разработки этого раздела мы применили различные современные методы химического и физико-химического анализа состава БАВ в околоплодниках стиракса лекарственного.

3.2. Изучение химического состава околоплодников стиракса лекарственного

Нормативная документация разрабатывается нами для того, чтобы сырье стиракса лекарственного можно было использовать в качестве источника для получения растительной субстанции – сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного, содержащего сумму сапонинов.

Нами были проведены основные качественные реакции на БАВ в околоплодниках стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L). Условия пробоподготовки: Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 1 г измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл и прибавляют 20 мл спирта этилового 70%. Содержимое колбы нагревают на водяной бане в течение 30 мин с обратным холодильником. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через складчатый бумажный фильтр в пробирку вместимостью 20 мл. Результаты представлены в таблице (3.1).

Таблица 3.1. – Качественное определение наличия БАВ в околоплодниках стиракса лекарственного

Группа БАВ	**Вид реакции**	**Результат позитивной реакции**	**Наличие группы БАВ**
Сапонины	реакция пенообразования	образование пена	**+**
	реакция гемолиза	образовалась лаковая кровь	**+**
Алкалоиды	Шейблера	желтоватый осадок	**-**
	Драгендрофа	оранжево-бурая окраска	**-**
	Вагнера-бушарда	бурый цвет	**-**
	Раствор танина 1%	белый осадок	**-**
	Натрия нитропруссид	красновато-коричневый осадок	**-**
Флавоноиды	С железа (III) хлоридом	темно-зеленое окрашивание	**+**
	С раствором щелочи	желтое окрашивание	**+**
	Цианидиновая реакция по Брианту	разделение на 2 фазы: водный слой – более интенсивное окрашивание	**+**
Дубильные вещества	С раствором белка (желатина)	проявление мути	**+**
	С железоаммониевыми квасцами	черно-зеленого окрашивания	**+**

Как видно из представленной таблицы, реакции подтверждающие наличие сапонинов – положительные, а также флавоноидов и дубильных веществ.

3.3. Изучение характеристик сырья «околоплодники стиракса лекарственного» для составления раздела НД "испытания".

Раздел ФС Испытания, состоит из нескольких покозателей: Влажность; зола общая; зола, нерастворимая в 10 % растворе хлористоводородной кислоты; размер частиц; посторонние примеси; тяжелые металлы; радионуклиды; остаточные количества пестицидов; микробиологическая чистота; количественное определение; упаковка, маркировка и транспортирование; хранение.

Мы изучили характеристики сырья и разработали нормы для некоторых из этих показателей. Работа над созданием норм остальных показателей будет продолжена.

Определение влажности растительного сырья высушенных околоплодников стиракса лекарственного

Проведены измерения показателя влажность для 5-ти проб измельченного сырья стиракса лекарственного. Максимальное значение влажности составило 5,2% (таб. 3.2.).

Таблица 3.2. – Результаты определения влажности околоплодников стиракса лекарственного

n=15	p=0,95	f	Tp,f	$\bar{x}$, %	S	Sr , %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
B%		14	2,145	3,775	0,74	19,6	0,41	3,8±0,41

В НД на измельченный околоплодник стиракса лекарственного предлагаем ввести норму влажности – не более 4,5 %.

Определение общей золы и золы, нерастворимой в растворе кислоты хлористоводородной 10%

Согласно методу, приведенному в п.2.2.2.3, нами получены результаты испытаний общей золы и золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте для 4 образцов. Данные представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3. – Результаты определения золы сырья околоплодников стиракса

n=4	p=0,95	f	$\bar{x}$, %	S	Sr , %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
общая зола		3	0,93	0,04	4,31	0,06	0,93±0,06
зола нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты		3	0,096	0,017	17,516	0,027	0,096±0,027

В НД на измельченный околоплодник стиракса лекарственного предлагаем ввести норму общей золы – не более 1,0 %, золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте – не более 0,1 %.

Изучение дисперсного состава измельченного сырья околоплодников стиракса лекарственного с помощью ситового анализа

Для контроля качества лекарственного растительного сырья обязательно надо регламентировать степень его измельченности. Этот показатель нужен с целью недопущения излишнего измельчения сырья на этапе разработки технологических процессов. Для установления нормы «степень измельченности» сырья околоплодников стиракса лекарственного необходимо провести ситовой (дисперсный) анализ. Нами применялась аналитическая проба массой 250 г от каждой опытной партии. Ситовой анализ проводили в 6 повторностях.

В результате дисперсного анализа нового вида ЛРС «Околоплодники стиракса лекарственного измельченные», было установлено, что основную фракцию составляют частицы размером менее 2,5 мм, таблица (3.4.).

Таблица 3.4**.** – Фракционный состав частиц в опытных партиях околоплодников стиракса лекарственного, %

Размер частиц	Количество частиц (%)	
	Партия 1	Партия 2
Частиц на сите 2,5 мм	0,013±0,008	0,020±0,009
Частиц на сите 2 мм	11,637±0,453	13,406±0,387
Частиц на сите 1 мм	36,599±0,399	35,406±0,312
Частиц на сите 0,5 мм	22,165±0,179	20,027±0,214
Частиц на сите 0,25 мм	14,946±0,297	18,223±0,235
Частиц сквозь сито 0,25 мм	14,643±0,411	12,979±0,349

Основная масса частиц при ситовом анализе остается на ситах 1 и 0,5 мм. Таким образом, нами предложено установить норму измельченности: частиц размером более 2 мм, не более 15%; частиц размером менее 0,25 мм, не более 20%.

Коэффициент водопоглощения: определяли в соответствии с требованиями ГФ XIII РФ - ОФС 1.5.3.0012.15, результаты представлены в таблице (3.5.).

Таблица 3.5. – Определение коэффициента водопоглощения

проба	1	2	3	4	$\bar{x}$	S	S_r, %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Квп	2,35	2,4	2,3	2,15	2,3	0,108	4,696	0,172	2,3±0,17

В результате проведенных исследований (таблица 3.5.) определен коэффициент водопоглощения ЛРС, равный 2,3 ±0,17.

Определение коэффициента поглощения летучих экстрагентов: определяли для метанола и спирта 96%, после получения извлечения в соответствии с ГФ XIII РФ - ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки».

Таблица 3.6. – Определение коэффициента поглощения метанол/спирт 96%

экстрагент	**Кпэ (мл/г)**				
	$\bar{x}$	**S**	S_r, %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Метанол	0,77	0,012	1,590	0,019	0,77 ± 0,019
спирт 96%	0,73	0,011	1,521	0,017	0,73 ± 0,017

Таким образом, установлено, что измельченное сырье – околоплодники стиракса лекарственного имеют Кпэ (метанол) – 0,77, и Кпэ (спирт 96%) – 0,73 (табл. 3.6)

Количественное определение экстрактивных веществ:

Для определения содержания суммы биологически активных и балластных веществ в сырье околоплодники стиракса лекарственного, использовали согласно ГФ XIII РФ - ОФС.1.5.3.0006.15 метод 2 – многократную экстракцию (см. Г2, П.

2.2.2). Анализ проводили в 4 повторностях и результаты представлены в таблице (3.7).

Таблица 3.7 – Содержание экстрактивных веществ в сырье

экстрагент	**Содержание экстрактивных веществ в сырье (%)**				
	$\bar{x}$	**S**	S_r, %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Метанол	60,2	0,553	0,919	0,017	60,2 ± 0,017

Поэтому при установлении нормативных требований к содержанию экстрактивных веществ, предлагаем ввести следующие нормы: для околоплодников стиракса лекарственного, при проведении экстракции метанолом – не менее 60 %.

Полученные нами данные представлены в проекте НД на изученное сырье (Околоплодники стиракса лекарственного) представлены в приложении № 4.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Проведен макроскопический и микроскопический анализ растительного сырья плодов и околоплодников стиракса лекарственного, выявлены диагностически значимые признаки в анатомическом строении, позволяющие устанавливать подлинность сырья. Результаты проиллюстрированы оригинальными микрофотографиями.

2. Впервые с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изучены и иллюстрированы оригинальными микрофотографиями плоды стиракса лекарственного. В том числе изучены особенности архитектуры поверхности околоплодника и поперечного среза через экзокарп, мезокарп и эндокарп, диагностические признаки семени и семенной кожуры.

3. В околоплодниках стиракса лекарственного установлено наличие сапонинов, что подтверждено качественными реакциями.

4. Изучены показатели сырья «околоплодники стиракса лекарственного» в соответствии с требованиями ГФ XIII: влажность – не более 4,5 %, общая зола – не более 1,0 %, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 0,1 %.

5. Установлен фракционный состав сухих измельченных околоплодников стиракса лекарственного и предложны нормы для контроля измельченности: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм не более 20%, размером более 2 мм, не более 15%.

6. Разработан проект НД на изученное сырье «Околоплодники стиракса лекарственного» по ряду показателей: внешние признаки, микроскопические признаки, определение основных групп биологически активных веществ, влажность, зола общая, зола не растворимая в 10% растворе HCl, измельченность, коэффициент водопоглощения, количественное определение экстрактивных веществ.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА СТИРАКСА ЛЕКАРСТВЕННОГО

В целях создания контрацептивных средств для Сирийских женщин из местного сырья были изучены околоплодниках стиракса и подтверждено наличие сапонинов. Следующим этапом явилось выделение и очистка суммы сапонинов в виде сухого экстракта, стандартизация и характеристика его биологических свойств.

4.1. Определение технологических параметров выделения сухого экстракта из околоплодников стиракса лекарственного

Поскольку методика выделения сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного разрабатывалась впервые в качестве основных технологических параметров рассматривали: метод экстрагирования, экстрагент, дисперсность растительного материала и время экстрагирования.

4.1.1. Обоснование метода экстрагирования:

Циркуляционные экстрагирование с помощью аппарата Сокслета является одним из широко распространенных способов извлечения целевых БАС. Благодаря постоянной циркуляции летучего экстрагента достигается максимальный выход экстракта при небольшом расходе экстрагента. Прибор занимает мало места и имеется почти в каждой химической и технологической лаборатории. В связи с вышесказанным, мы выбрали именно этот вид экстракции.

4.1.2. Выбор экстрагента:

При выборе экстрагента для получения **с**ухого **э**кстракта околоплодников **с**тиракса **л**екарственного (СЭСЛ) исходили из литературных данных о растворителях, обладающих высокой способностью растворять сапонины – это этанол и метанол. Был оценен выход СЭСЛ в пересчете на абсолютно сухое сырье при экстрагировании метанолом и спиртом этиловым с содержанием этанола 70%, 90% и 96 %, результаты приведены в таблице 4.1.

В ходе эксперимента нами установлено, что максимальный выход СЭСЛ наблюдался при использовании метанола (без разбавления).

Таблица 4.1. – Выход СЭСЛ в пересчете на абсолютно - сухое сырье % (w/w) с использованием разных растворителей с различными концентрациями.

Экстрагент		метанол	спирт 96%	спирт 90%	спирт 70%
выход СЭСЛ %	1	39,35	31,50	32,17	35,70
	2	39,50	31,70	33,09	35,17
	3	39,55	32,10	32,62	34,80
	Ср. знач.	39,46	31,76	32,62	35,22

Из данных таблицы 4.1. следует, что оптимальная концентрация этилового спирта для экстрагирования сапонинов 70% и обеспечивает самый высокий выход сухого экстракта, по сравнению с другими концентрациями спирта. При том, что выход СЭСЛ при извлечении метанолом 78,90%, а при извлечении 70% спиртом - 70,45%, последний выбран в качестве экстрагента из соображений безопасности.

4.1.3. Изучение влияния степени дисперсности сырья:

Поскольку полнота извлечения БАВ зависит, в том числе, и от степени дисперсности экстрагируемого материала, была проведена оценка влияния размера частиц околоплодника стиракса на выход СЭСЛ. Измельченные с помощью ножевой лабораторной мельницы околоплодники стиракса просеивали на виброустановке через набор сит с отверстиями 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 мм. Основная масса частиц при ситовом анализе оставалась на ситах 1,0 и 0,5 мм. Частиц, не проходящих сквозь сито с размером отверстий 2,0 мм, менее 15%; частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,25 мм, менее 16% (Таблица 3.4.).

В ходе экстракции, среднее значение выхода СЭСЛ-36,99% наблюдается для фракции частиц 0,25-0,5 мм. Близкие к максимальному выходу значения мы получили для фракций 1,0-2,0 мм –35,06% и 0,5-1,0 мм – 32,38%. Работа с крупными частицами удобней, особенно при использовании аппарата Сокслета, поскольку экстрагирование сырья с размером частиц меньше 0,25 мм приводило к уплотнению материла, что являлось препятствием проникновению растворителя, поэтому мы наблюдали среднее значение минимального выхода 8,35% (Рис. 4.1.).

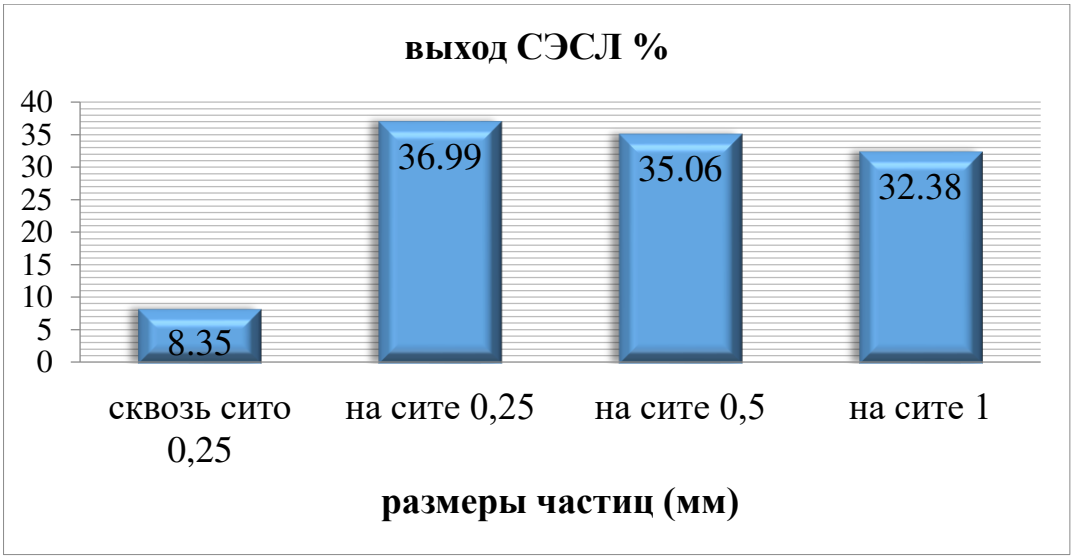


Рисунок 4.1. Среднее значение выхода СЭСЛ в пересчете на абсолютно - сухое сырье% (w/w) из сырья с различной степенью измельченности

Дальнейшая работа проводилась с сырьем измельченном до показателя: частиц размером более 2 мм, не более 15%; частиц размером менее 0,25 мм, не более 20%.

4.1.4. Изучение влияния времени экстракции:

Поскольку существенным экономическим показателем технологического процесса является скорость экстракции, была оценена полнота извлечения в зависимости от времени и количества сливов. Об истощении материала мы судили по отсутствию окраски сливающегося раствора. Первый слив был насыщенного коричневого цвета. Скорость прохождения одного цикла экстракции составляла 1 слив в 40 минут (1,5 слив/час).

В ходе эксперимента было установлено, что обесцвечивание вытяжки наступает к 8-10 циклу, что соответствует 6-7 часам экстрагирования, с использованием ТСХ для оценки полноты экстракции. Для этого промежутка времени установлен максимум выхода СЭСЛ. При продолжительности экстракции менее 6 часов мы фиксировали низкий выход сухого экстракта, и при увеличении времени экстракции до 8, 9, 10, 11, 13 часов, не происходило повышения выхода СЭСЛ, что говорит о нерентабельности увеличения времени экстракции. Результаты данного исследования представлены в таблице (4.2.).

Таблица 4.2. – Выход СЭСЛ в пересчете на абсолютно - сухое сырье % (w/w)

Время экстракции, часы	Выход СЭСЛ, %
4	30,70
5	31,81
6	34,07
8	34,29
9	34,66
10	34,64
11	34,58
13	34,43

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что оптимальное количество циклов экстракции 8-10 и время 6-7 часов.

4.2. Разработка методики выделения СЭСЛ

За основу методики принята циркуляционная экстракция в аппарате типа Сокслета и ранее установленные технологические параметры: степень измельченности сырья и время экстракции, а в качестве экстрагента использован 70% этанол.

Масса навески измельченных высушенных околоплодников стиракса лекарственного составляла 60,0 г. Объем растворителя по отношению к сырью 1:5. Точную навеску измельченного сырья помещали в патрон из фильтровальной бумаги и опускали в экстрактор аппарата Сокслета с рабочим объемом 250 мл. Экстракцию проводили при температуре 55-60°С до полного извлечения экстрактивных веществ, которое контролировалось по обесцвечиванию сливов. Полученную в колбу-приемник смесь полностью упаривали на ротационном испарителе в вакууме (230 мБар) при 66°С. Густой экстракт последовательно обрабатывали этилацетатом (1:10 вес/объем) и н-бутанолом (1:30 вес/объем). При подкислении концентрированной хлористоводородной кислотой выпадал осадок, который отфильтровывали на воронке с бумажным фильтром и сушили на

воздухе при комнатной температуре в течение 24 ч в сухую погоду и до 48 ч при влажном воздухе до полного испарения растворителей.

Технологическая схема отражает этапы экстракции и очищения сапонинов из сырья «околоплодники стиракса лекарственного» и представлена в виде схемы (рис. 4.2.).

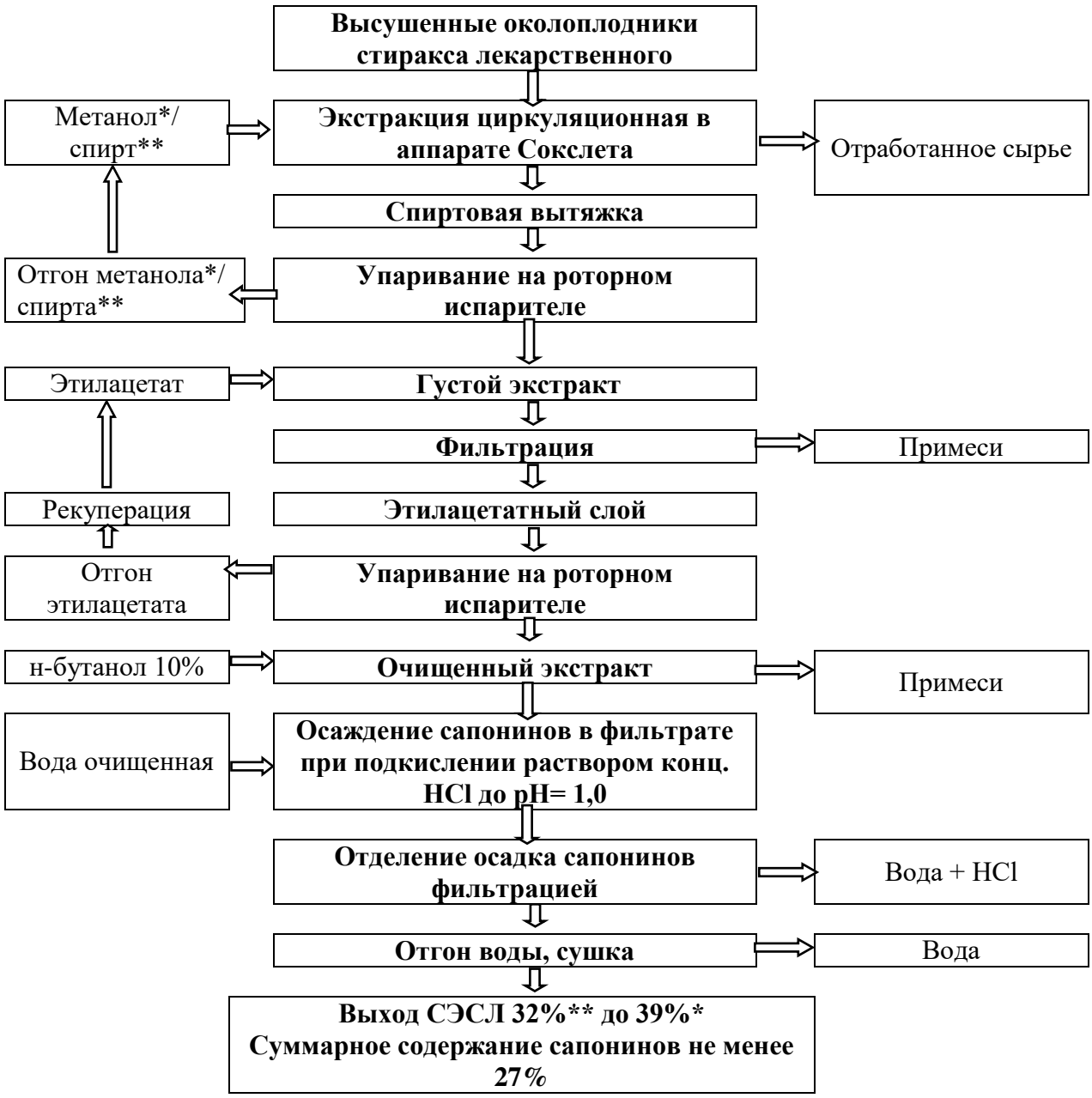


Рисунок 4.2. Технологическая схема выделения СЭСЛ из высушенных околоплодников стиракса лекарственного

Сухой очищенный экстракт стиракса представляет собой аморфные частицы от светло-кремового до кремового цвета с серым оттенком, со специфическим запахом.

Для подтверждения наличия в полученном экстракте сапонинов, были проведены пробы, ранее использованные для установления их наличия в околоплодниках. Реакции пенообразования и гемолиза эритроцитов показали положительный результат, что подтверждает правильность процедуры выделения сапонинов из околоплодников стиракса.

Разработан проект НД на полученный экстракт «Стиракса лекарственного экстракт сухой (СЭСЛ)» в приложении № 5.

4.3. Изучение химического состава сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного

Полученный из околоплодников стиракса лекарственного по предложенной схеме сухой экстракт необходимо изучить с использованием различных методов для установления его состава, определения содержания сапонинов и выбора методик стандартизации. Предварительно были проведены основные качественные реакции на сапонины. Результаты представлены в таблице (4.3.).

Таблица 4.3. – Качественное определение сапонинов в СЭСЛ

качественные реакции, основанные на	реакция	Результат
1.физических свойствах сапонинов	реакция пенообразования	образовалась пена, равная в обеих пробирках (0,1М HCl, 0,1М NaOH) по объему и устойчивости, что говорит о наличии в пробе тритерпеновых сапонинов.
2.биологических свойствах сапонинов	реакция гемолиза	образовался белый опалесцирующий раствор «лаковая» кровь, в котором через несколько минут выпал осадок в виде белых хлопьев. Надосадочная жидкость стала прозрачной. В пробирке с контролем не наблюдалось изменений.
3.химических свойствах сапонинов	хлороформа + конц. серной кислоты	появиться желтое окрашивание, постепенно переходящее в красное.
	Реакция Санье	образовалось красное окрашивание, которое подтверждает наличие в пробе тритерпеновых сапонинов.
	Реакция Сальковского	нижний слой окрашен в оранжевый цвет.
	$+H_2SO_4$ концентрированная	красно-фиолетовое окрашивание

Как видно из представленной таблицы, все реакции, подтверждающие наличие сапонинов, – положительные. По реакции пенообразования и реакции Санье можно сделать вывод, что в изучаемом экстракте преобладают тритерпеновые сапонины.

Для более глубоко изучения сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного была выделена сумма сапонинов стиракса (ССС) из сухого экстракта с помощью препаративной ТСХ и в дальнейшем все исследования проводились образца СЭСЛ и ССС.

4.3.1. Качественное определение сапонинов в СЭСЛ и выделение суммы сапонинов стиракса методом ТСХ

Раствор стандартного образца (СО PQS). Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца Purified Quillaia Saponin HRS, EP standart растворяют в 2 мл метанола, перемешивают.

Испытуемый раствор СЭСЛ. Около 0,6 г (точная навеска) СЭСЛ растворяют в 2 мл метанола, перемешивали в течение 1 мин, затем фильтровали.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки «Merk KGaA, Германия, 1.05626.» со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором размером 10 × 20 см на алюминиевой подложке наносят 10 мкл (0,010 мл) испытуемого раствора СЭСЛ и 10 мкл раствора стандартного образца (СО PQS).

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, ее помещают в камеру при температуре 20°С со смесью растворителей: хлороформ-метанол-вода (6:3:1). Пластину вынимают из камеры после прохождения фронта растворителей 15 см, сушат в течение 5 минут, затем опрыскивают раствором взвеси дефибринированной крови.

После проведения эксперимента, на основании полученных результатов, рассчитывали показатели Rf (рис. 4.3.).

На ТСХ видны зоны адсорбции белого цвета с Rf около 0,68 (ССС) и Rf около 0,55 (сапонины СО PQS).

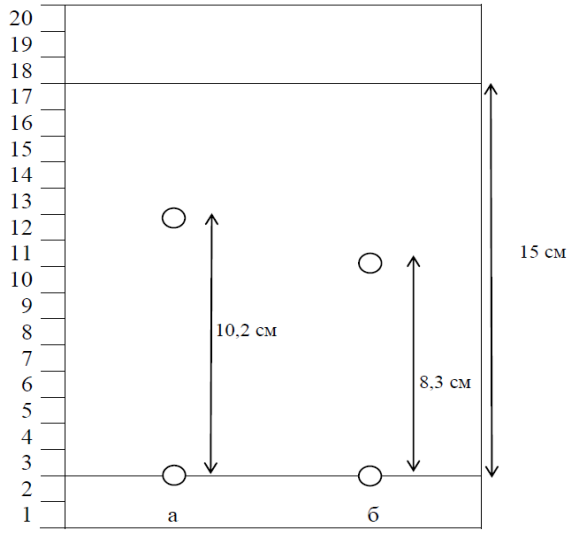


Рисунок 4.3. Хроматограмма растворов сапонинов из; а – СЭСЛа, б – СО PQSв системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1), (УФ-свет, 245 нм/ детектор-раствор взвеси дефибринированной крови).

4.3.2. Регистрация УФ-спектрофотометрия СЭСЛ и ССС

Около 0,010 г СЭСЛ помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в метаноле и доводят объем до метки (раствор А). Выделенную с помощью препаративной ТСХ ССС помещают в метанол последовательно фильтруют через целлюлозный, а затем через шприцевый фильтр CHROMAFIL Xtra PTFE (Тефлон) с размером пор 45 мкм (раствор Б).

УФ-спектр раствора А и Б снимают на спектрофотометре АКВИЛОН СФ-102 в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют метанол. Результаты УФ-спектрофотометрии приведены на рисунке (4.4.)

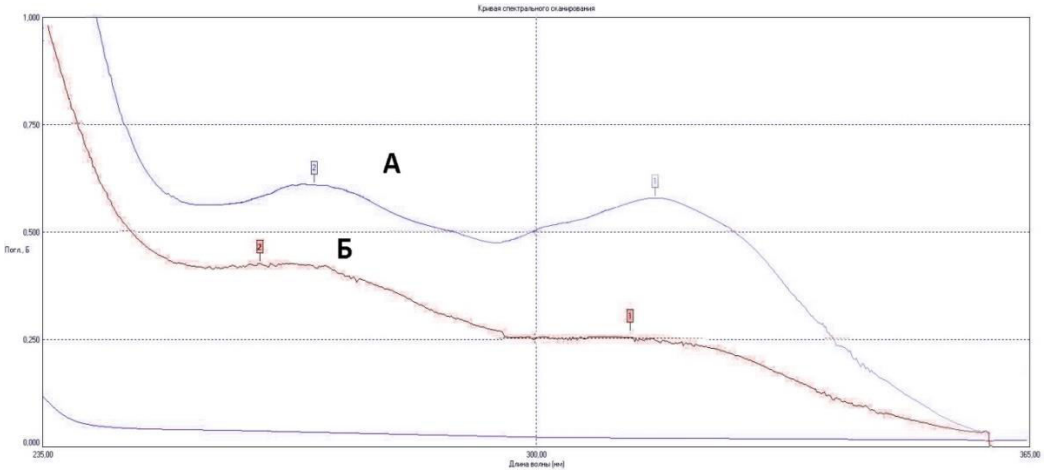
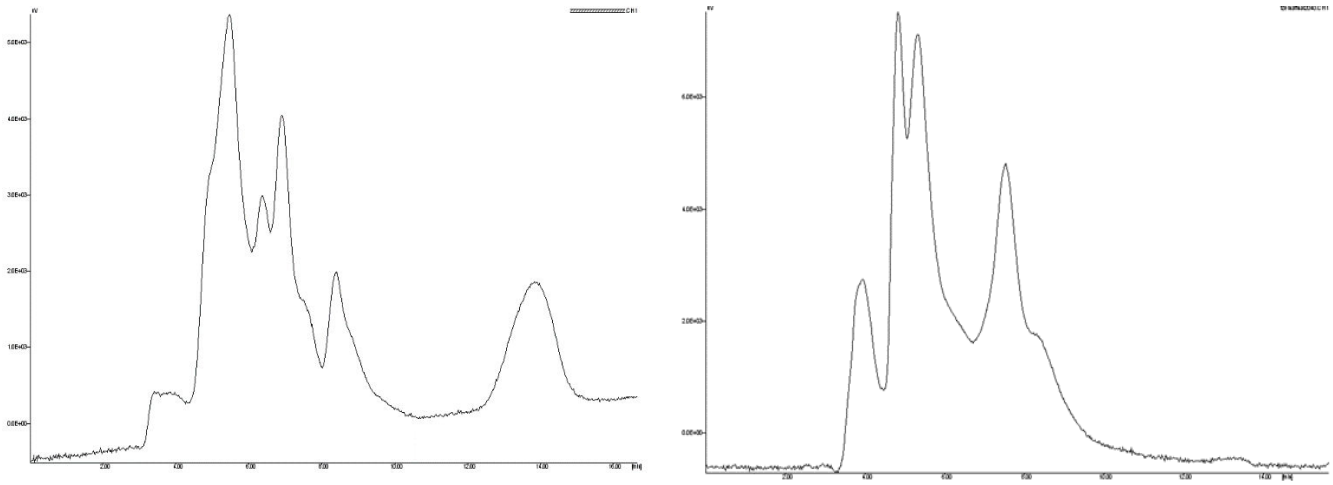


Рисунок 4.4. УФ-кривые спектрального сканирования растворов сапонинов стиракса лекарственного (А- СЭСЛ; Б- ССС).

Полученный спектр может быть в дальнейшем использован для стандартизации СЭСЛ и препаратов на его основе. В проекте НД: УФ-спектр поглощения 0,1% метанольных растворов сапонинов, выделенных из стиракса лекарственного в области от 230 до 365 нм должен имеет максимум поглощения при длине волны 270 ± 1 нм и 315 ± 1 нм.

4.3.3. Изучение СЭСЛ и ССС с помощью ВЭЖХ

При проведении исследования СЭСЛ, массой 0,01 г растворяли в 5 мл метанола, фильтровали через фильтр ПТФЭ с размером пор 0,2 мкм. Также в 1 мл метанола растворяли ССС, и фильтровали полученные растворы через фильтр ПТФЭ. Для ВЭЖХ использовали (JASCOPU-980 Intelligent HPLC Pump, JASCOUV-970 Intelligent UV/VIS Detector) и колонку С18, и мобильную фазу метанол:вода в соотношении (70:30), скорость элюции составляла 0,5 мл/мин; детектирование при 260 нм. Использовали объем хроматографируемых образцов экстрактов по 10 мкл. Нами был получен ВЭЖХ-спектр для СЭСЛ и ВЭЖХ-спектр для ССС (Рисунок 4.5.).



а б

Рисунок 4.5. ВЭЖХ-УФ (260 нм) профили растворов сапонинов стиракса лекарственного (а – СЭСЛ; б – ССС).

ВЭЖХ – хроматограмма ССС показывает 4 пика. В связи с тем, что сапонины имеют сходные физико-химические свойства, их разделение данным в отсутствие стандартов является затруднительным.

4.3.4. Анализ сапонинов в СЭСЛ с помощью *УЭЖХ-МСВР*

Сухой образец СЭСЛ массой 2,14 мг растворяли в 1 мл метанола и фильтровали (фильтр Clean 2, 0.2 мкм).

УЭЖХ система включала автоматический пробоотборник, бинарный насос и диодный детектор (ДД) для регистрации метаболитов, поглощающих в области 190-500 нм. Разделение метаболитов проходило на колонке Acquity UPLC® BEH Phenyl column (2,1 × 100 mm, 1,7 µm, Waters Corporation, Wexford, Ireland). Для элюирования метаболитов использовали градиент двух растворов: 0,1% муравьиная кислота (А) и ацетонитрил (Б). Градиент: 0−0,5 мин, 0,1% Б в А; 0,5−10,0 мин, 0,1−95,0 % Б в А (линейный градиент); 10,0−13,0 мин, 95% Б в А (изократический режим); 13,0 – 15,0 мин, промывка и стабилизации колонки. Скорость потока растворителя – 0,5 мл в минуту, объем вводимого образца – 5 мкл (таблица 4.4).

УЭЖХ система была соединена с масс-спектрометром (МС) высокого разрешения (МСВР, Thermo Scientific Qexactive Orbitrap spectrometer 2.5) с нагреваемым источником ионизации метаболитов в распыленном виде (HESI). Анализировали как положительные, так и отрицательные ионы в диапазоне 150−2000 Да. Разрешающая способность масс-спектрометра – 140000. УЭЖХ-МСВР система функционировала под управлением программы ThermoXcalibur 3.0.63.

Идентификацию метаболитов проводили с использованием баз масс-спектрометрических данных «Metlin», (https://metlin.scripps.edu/), «TheHumanMetabolomeDatabase» (http://www.hmdb.ca/), «ChemSpider» (http://www.chemspider.com/), «MassBank» (http://www.massbank.jp/), а также информации, опубликованной в литературе (Yaylaetal., 2002).

Таблица 4.4. – Условия анализа сухого экстракта стиракса с помощью УЭЖХ-МСВР

Number	Code	DWT, mg	Methanol, ml	Delution (methanol), ml	Inject, µl	Mode
1	StyrN	10.7	1	0.2/0.8	5	Negative
2	StyrP	10.7	1	0.2/0.8	5	Positive

Типичная хроматограмма УЭЖХ-МС представлена на рис. (4.6.).

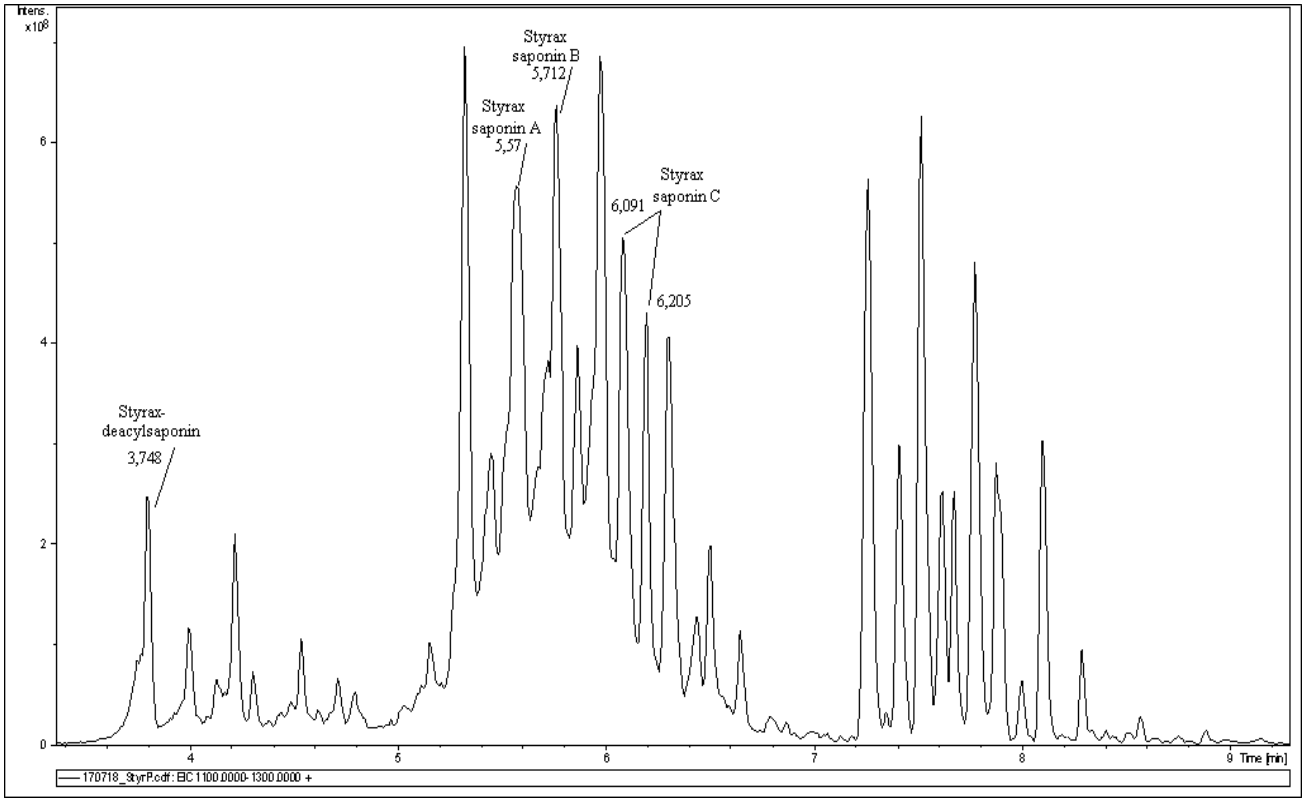


Рисунок 4.6. УЭЖХ-МС профиль отрицательных m/zв диапазоне 1100-1300, характерных для сапонин гликозидов *Styrax officinalis*L. Профиль экстрагировали из хроматограммы всех отрицательных ионов 150-2000 Да.

Мы идентифицировали часть пиков, с помощью данных справочной литературы. Результаты представлены в таблице (4.5.).

Таблица 4.5. – Хроматографические и масс-спектрометрические данные метаболитов экстракта *Styraxofficinalis*L., полученные методом УЭЖХ-УФ-МСВР и использованные для идентификации сапонинов

Время мин.	Значение [M+H]+ аддукта метаболита, m/z	Рассчитанная молекулярная формула	Моноизото-пная масса, Да	Название метаболита/ Ссылка
3,748	1137,5626	C61H84O20	1136,5556	Styrax-deacylsaponin; Yayla et al., 2002
5,570	1261,6195	C61H96O27	1260,6139	Styraxsaponin A1; Yayla et al., 2002 Jegosaponin A; Yoshikawa et al., 2000
5,712	1283,5994	C70H90O22	1282,5924	Styraxsaponin B1; Yayla et al., 2002
	1283,5994	C63H94O27	1282,5983	Styraxsaponin B; Yayla et al., 2002
5,759	1261,6195	C61H96O27	1260,6139	Styraxsaponin A2; Yayla et al., 2002 Jegosaponin B; Yoshikawa et al., 2000
5,864	1283,5994	C70H90O22	1282,5924	Styraxsaponin B2; Yayla et al., 2002
5,958	1275,6307	C69H94O22	1274,6237	Styraxsaponin C1; Yayla et al., 2002 Jegosaponin D1; Yoshikawa et al., 2000
6,063	1275,6307	C69H94O22	1274,6237	Styraxsaponin C2; Yayla et al., 2002 Jegosaponin D2; Yoshikawa et al., 2000
6,186	1275,6307	C69H94O22	1274,6237	Styraxsaponin C3; Yayla et al., 2002 Jegosaponin D3; Yoshikawa et al., 2000

4.3.5. Анализ сапонинов в СЭСЛ с помощью МС-спектрометрии в режиме регистрации позитивных и негативных ионов

Результаты исследования получены на оборудовании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Благодарим старшего научного сотрудника к.х.н. Ташлицкого В. Н.

Пробоподготовка: Приготовлен раствор 20 мг образца в 1 мл метанола. Анализировали аликвоту 5 мкл. **Условия анализа:** Хроматографический метод: растворитель А: муравьиная кислота 20 мМ- вода, растворитель В: муравьиная кислота 20 мМ- ацетонитрил. Колонка: стальная, 2,1×150 мм, заполненная сорбентом AcquityBEHC18; размер частиц 1,7 мкм; (Waters); температура колонки: 35°С (таблицы 4.6., 4.7.).

Таблица 4.6. – Условия анализа сухого экстракта стиракса с помощью МС-спектроскопии

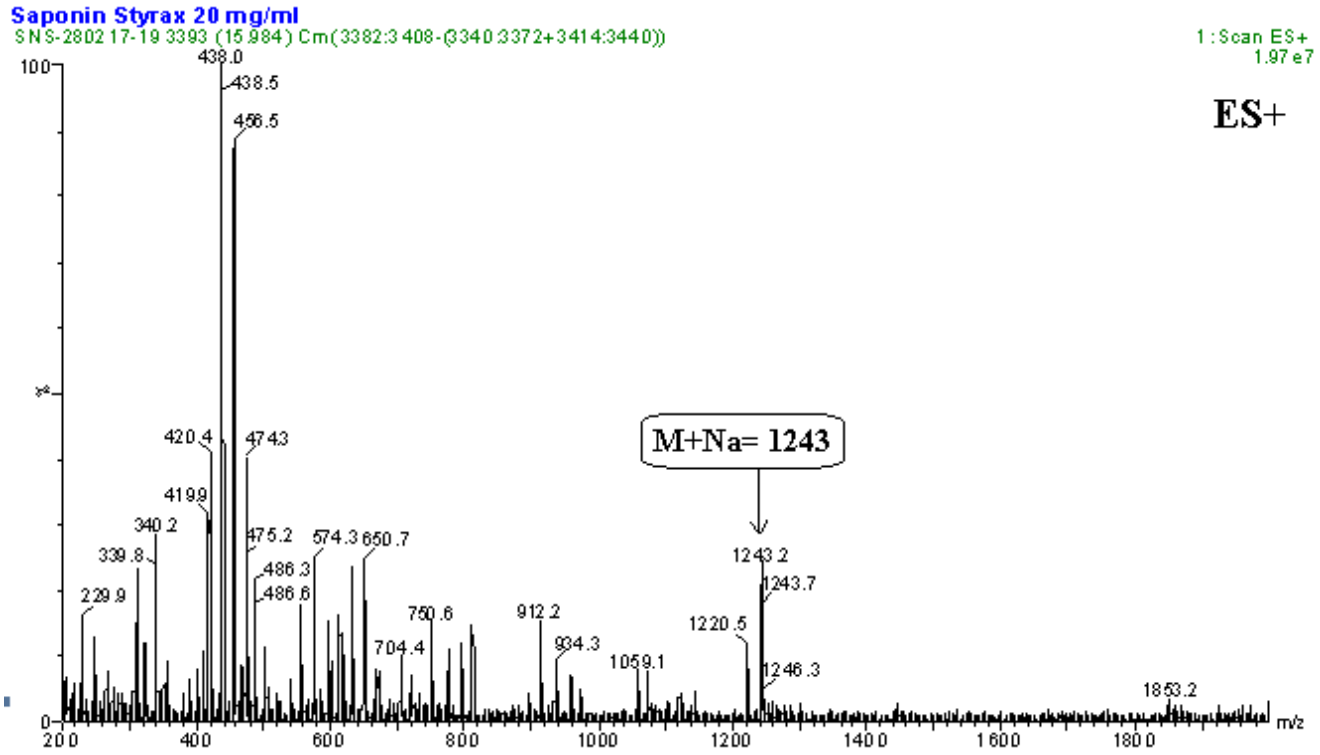
	Время (мин)	Скоростьпотока, мл/мин	%A	%B	Curve
1	Initial	0,3	90	10	
2	30	0,3	40	60	6
3	30,1	0,3	95	5	6
4	34	0,3	90	10	6

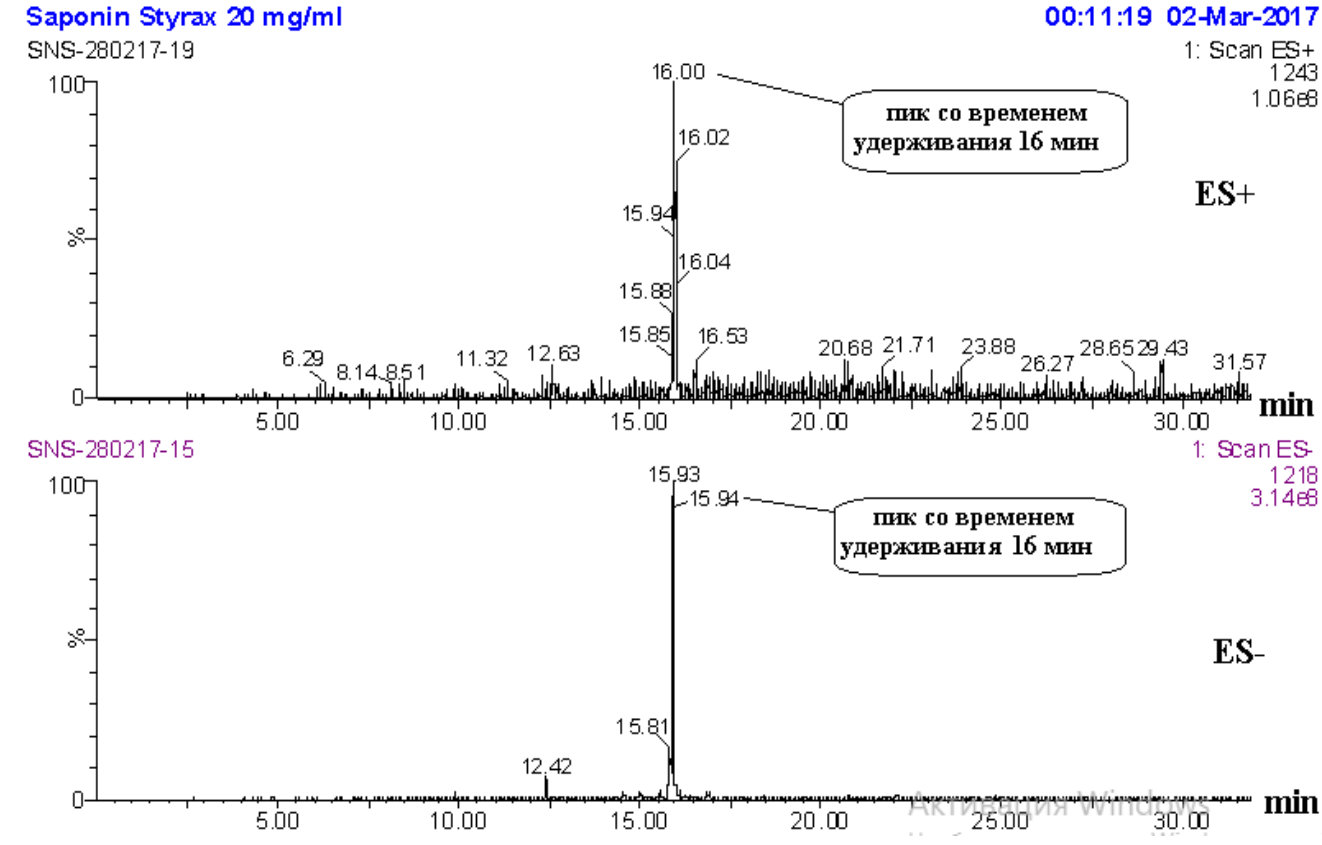
Таблица 4.7. – Условия анализа сухого экстракта стиракса лекарственного с помощью МС-спектроскопии

Условия детекции в режиме регистрации позитивных ионов:					Условия детекции в режиме регистрации негативных ионов:				
Polarity	ES+				Polarity	ES-			
Capillary	(kV)	3,5			Capillary	(kV)	3		
Cone	(V)	50			Cone	(V)	-50		
Extractor	(V)	4			Extractor	(V)	-4		
RF	(V)	0,5			RF	(V)	0,2		
Source	Temperature(°C)		120		Source	Temperature (°C)		120	
Desolvation	Temperature (°C)		450		Desolvation	Temperature (°C)		450	
Cone	Gas	Flow	(L/Hr)	50	Cone	Gas	Flow	(L/Hr)	50
Desolvation	Gas	Flow	(L/Hr)	800	Desolvation	Gas	Flow	(L/Hr)	500

Нами были изучены МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов для наиболее интенсивных пиков:

1) Пик со временем удерживания около 16 мин имеет предположительно молекулярный ион M-H=1219 и M+Na=1243, который может соответствовать ожидаемой структуре для стиракс дезацилсапонин (Рисунок 4.7.).





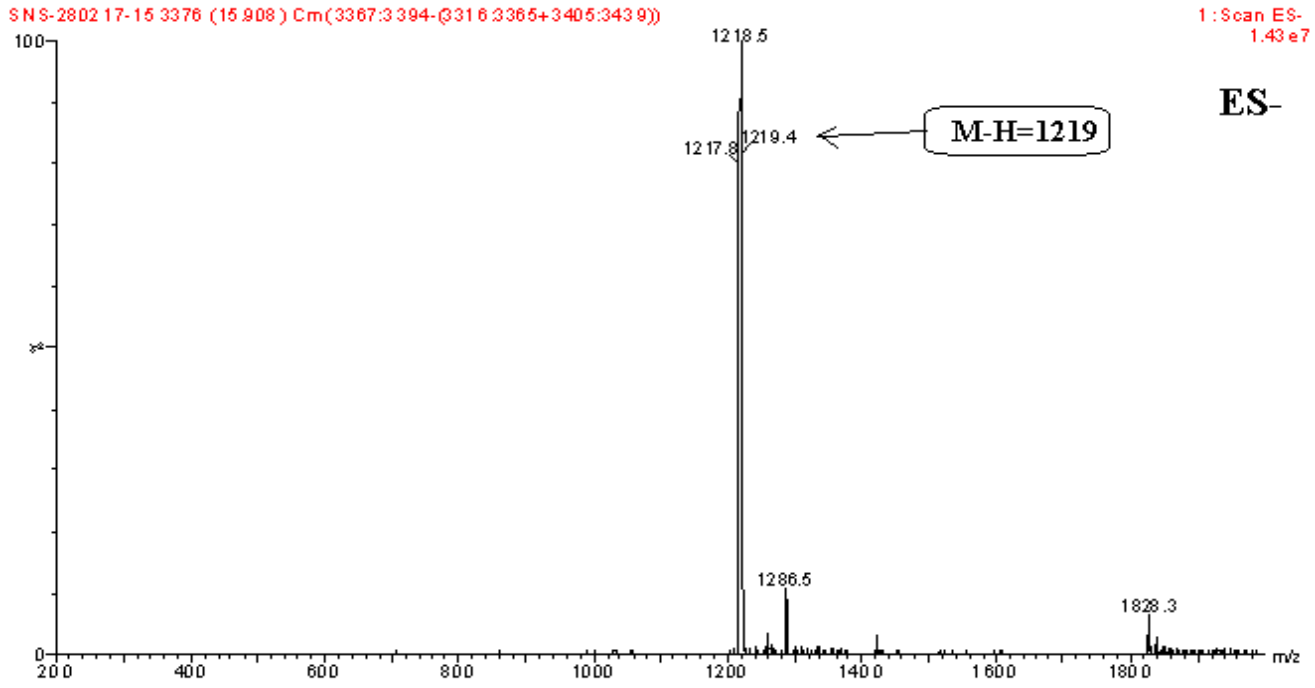
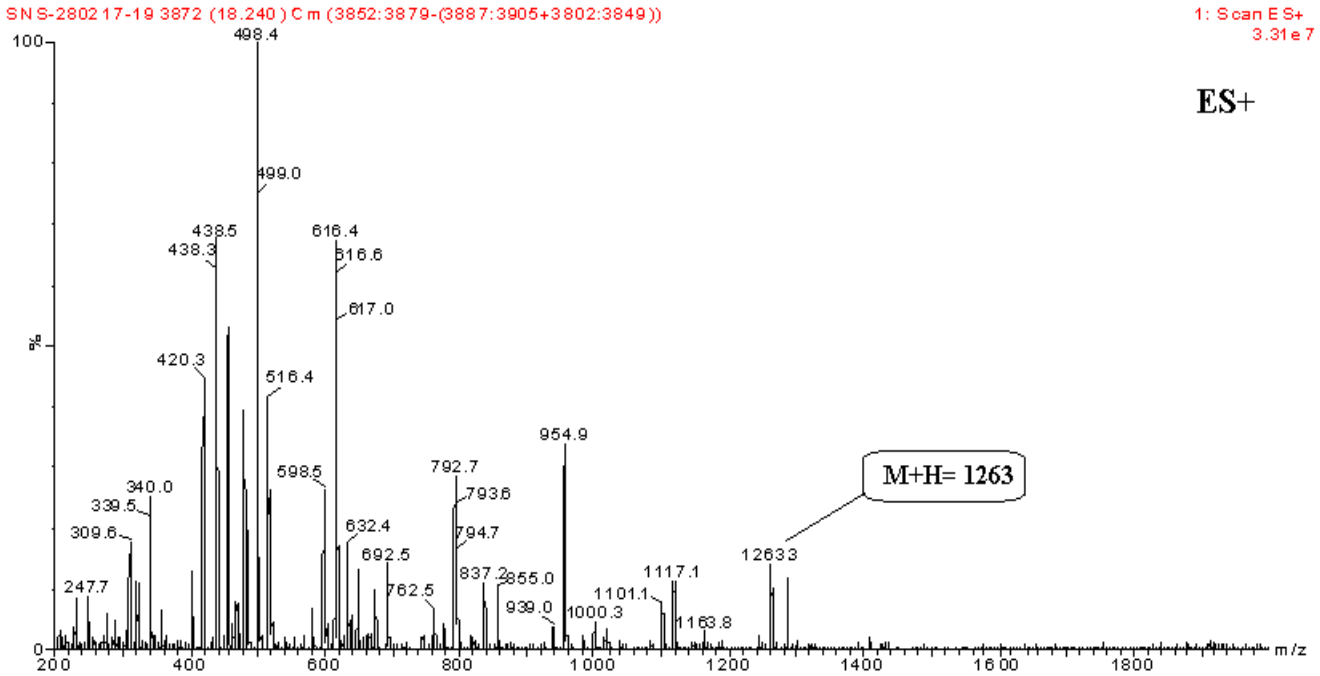


Рисунок 4.7. МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов растворов сапонинов стиракса лекарственного пик (16 мин, M- H=1219, M+Na=1243)

2) Пик со временем удерживания около 18,2 мин. имеет предположительно молекулярный ион M-H=1261 и M+H=1263. Предположительно данное соединение является стиракс сапонин A – где MF: $C_{61}H_{96}O_{27}$; мол. м.: 1261.398 г/моль (Рисунок 4.8.).



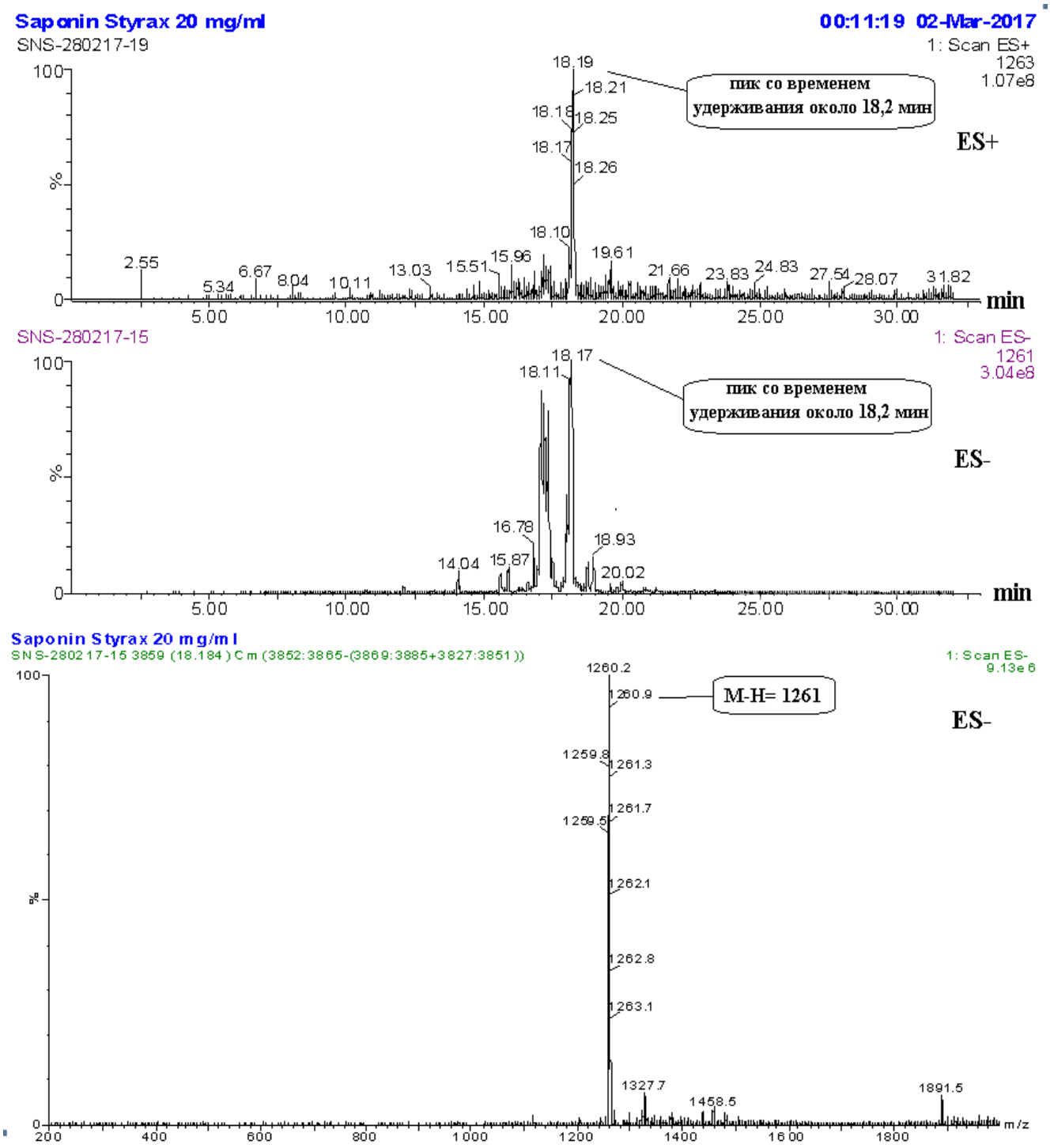


Рисунок 4.8. МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов растворов сапонинов стиракса лекарственного пик (18.2 мин, M-H=1261, M+H=1263).

3) Пик со временем удерживания около 20,7 мин имеет предположительно молекулярный ион M-H=1321 или M-H=1274 и M+H=1299. Предположительно данное соединение является стиракс сапонин B – где мол. м.: 1321.391 г/моль (Рисунок 4.9.).

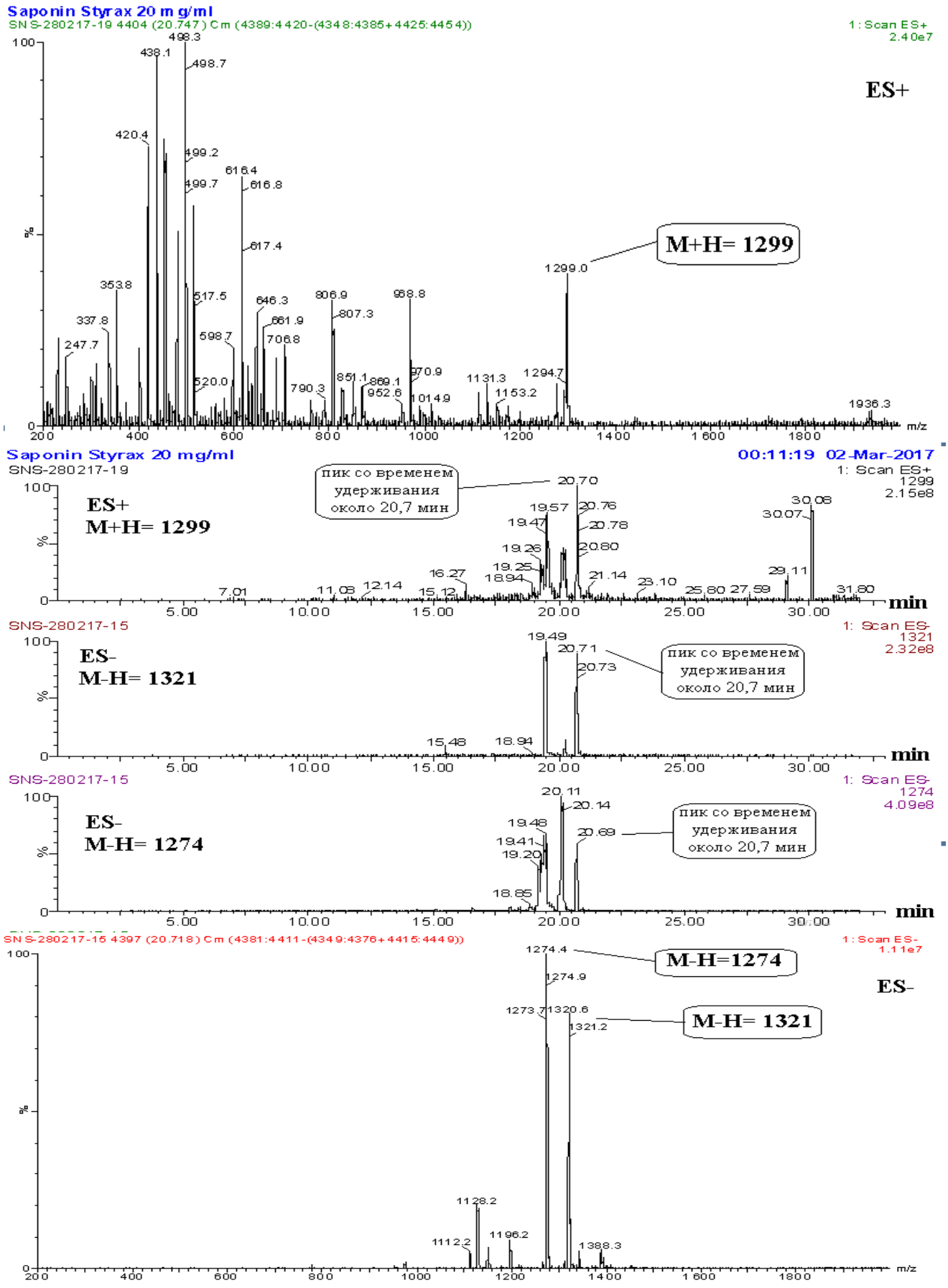


Рисунок 4.9. МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов растворов сапонинов стиракса лекарственного пик (20.7 мин, M-H=1321).

4) Пик со временем 23,8 мин имеет предположительно молекулярный ион M-H=1314 или M-H=1360 и M+H=1339 которая может соответствовать ожидаемой структуре для стиракс сапонин C– где мол. м.: 1353.506 г/моль (Рисунок 4.10.).

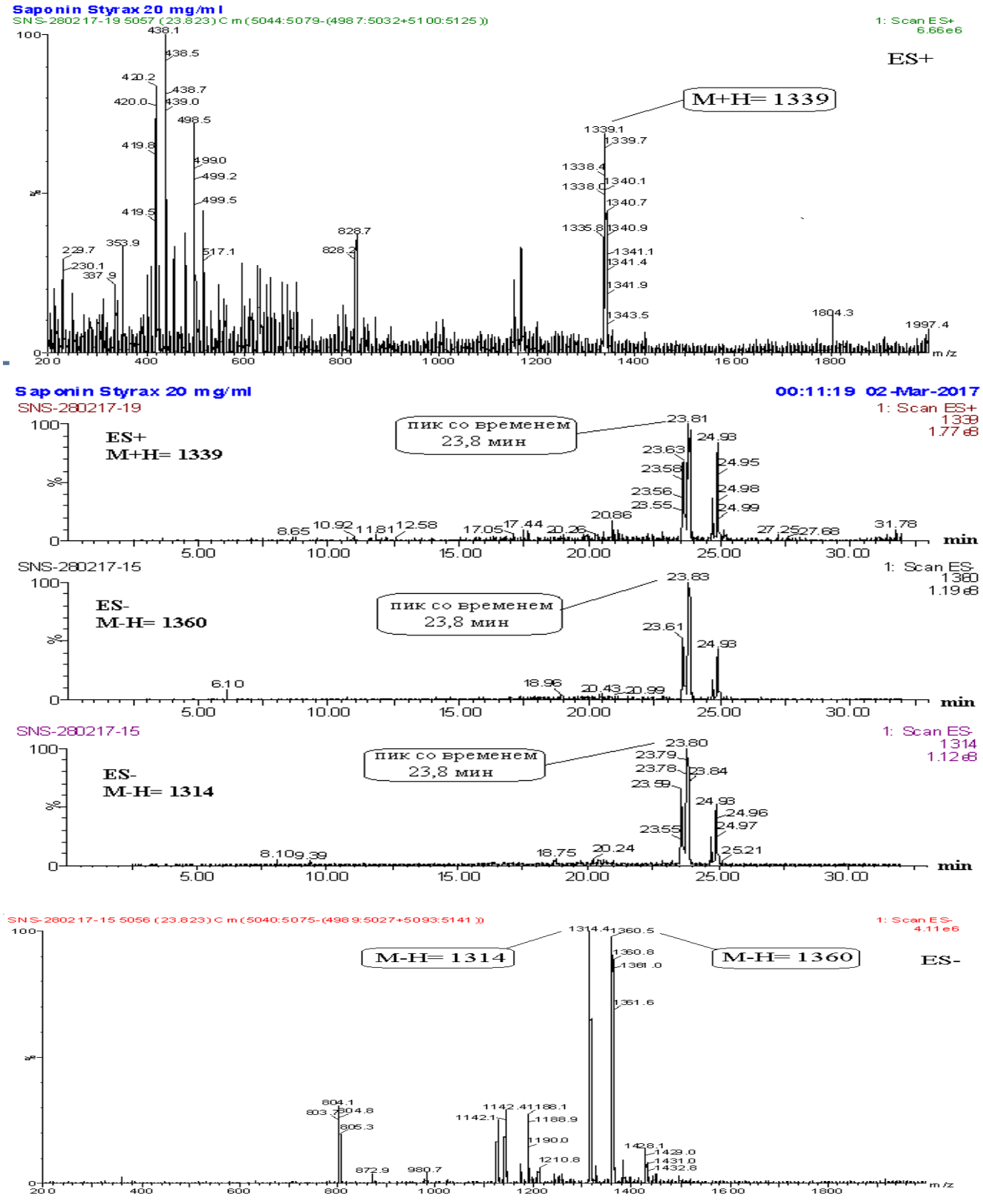


Рисунок 4.10. МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов растворов сапонинов стиракса лекарственного пик (23.8 мин, M-H =1360).

Идентификация компонентов такой сложной смеси довольно затруднительна, поэтому было предложено исследование продуктов гидролиза в кислых и щелочных условиях. Нами была использована следующая методика гидролиза сапонинов: приготовлены два раствора сухого экстракта стиракса лекарственного с концентрацией 20 мг/мл для щелочного и кислотного гидролиза. Полученные растворы инкубировали на термошейкере при 80°С в течение 2 часов при 1400 об/мин. Растворы центрифугировали и анализировали супернатант в режимах регистрации позитивных и негативных ионов.

Хроматографический анализ с МС-детекцией показал, что в результате щелочного гидролиза исследуемого образца сапонинов стиракса наблюдается сложная смесь пиков со значительно меньшим временем удерживания, чем до гидролиза. Среди прочих наблюдается пик со временем удерживания 6,3 мин, который в режиме регистрации негативных пиков имеет массу 1134, соответствующую ожидаемой структуре дезацил-жегосапонин (Deacyl jegosaponin) (Рисунок 4.11.).

Соединение такой структуры может образоваться из исходных сапонинов за счет гидролиза сложноэфирных связей, характерного для щелочных условий проведенного гидролиза. В режиме регистрации позитивных ионов пик с этим же временем удерживания имеет спектр с ионом 1158 (M+Na=1158). Что подтверждает правильность идентификации продукта гидролиза (Рисунок 4.12.).

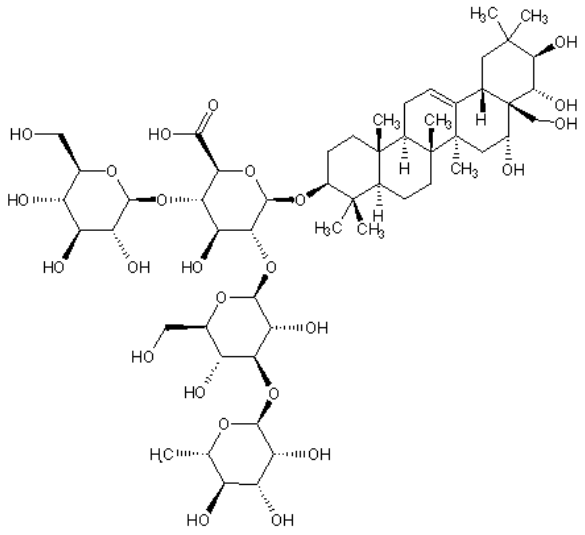


Рисунок 4.11. Структура Deacyl jego saponin / Styrax sapogenin

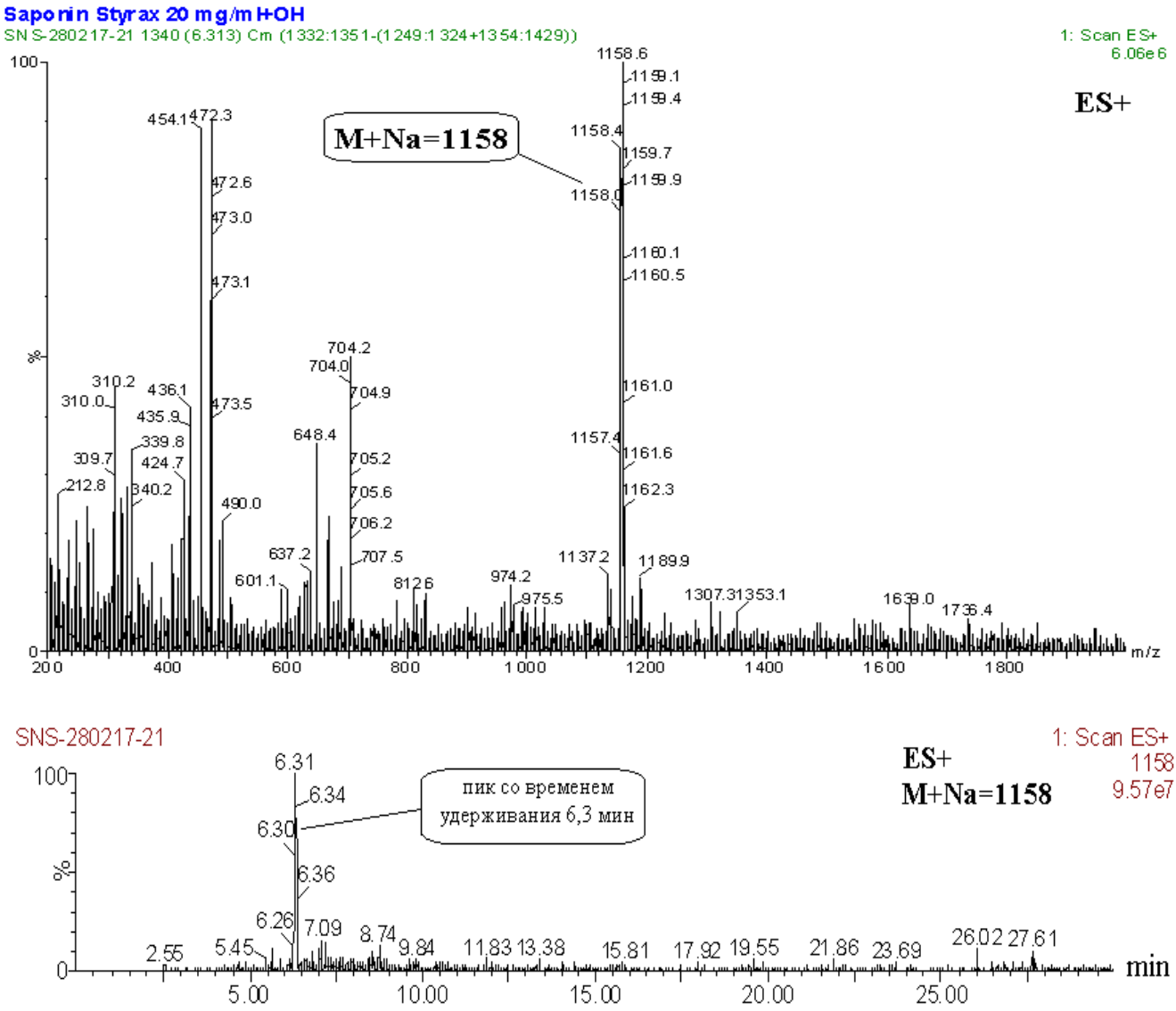


Рисунок 4.12. МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов растворов щелочного гидролиза сапонинов стиракса лекарственного

В исходной смеси до гидролиза данное соединение (со временем удерживания 6,3 мин) практически отсутствует, что подтверждает его образование в ходе щелочного гидролиза.

В условиях кислотного гидролиза сапонинов стиракса лекарственного на спектре ВЭЖХ также наблюдается набор пиков. Один из пиков со временем удерживания 17,4 мин имеет спектр в режиме регистрации негативных ионов характерный для продукта полного гидролиза Theasapogenol B (M-H=490, M+HCOO=535) (Рисунок 4.13.).

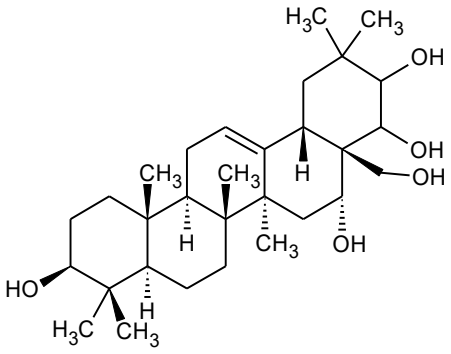
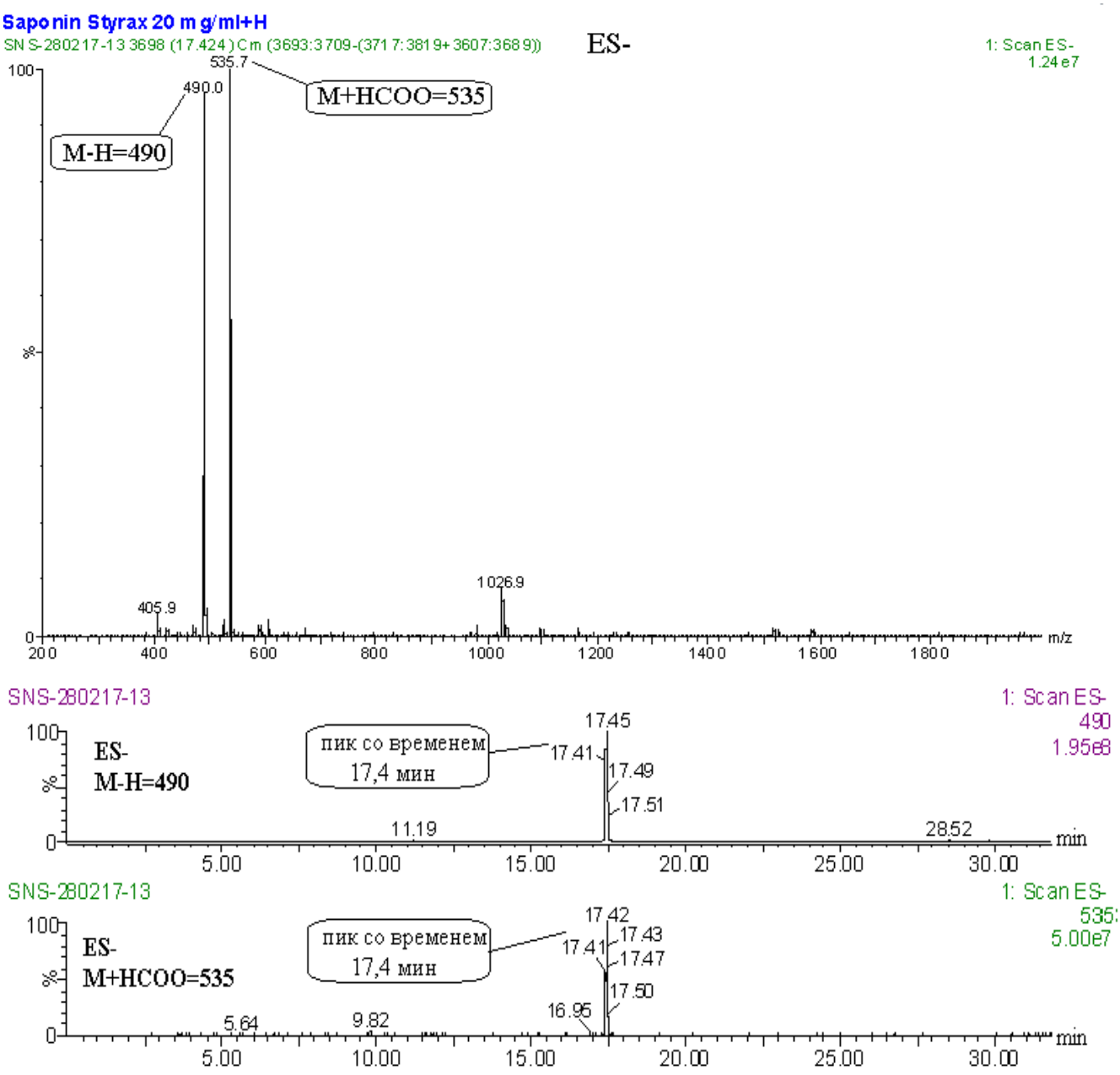


Рисунок 4.13. структура Theasapogenol B

Этот же пик имеет сложный спектр в режиме регистрации позитивных ионов, который может соответствовать продукту полного гидролиза Theasapogenol B (M+H-H2O=473 и M+Na=514) (Рисунок 4.14.).



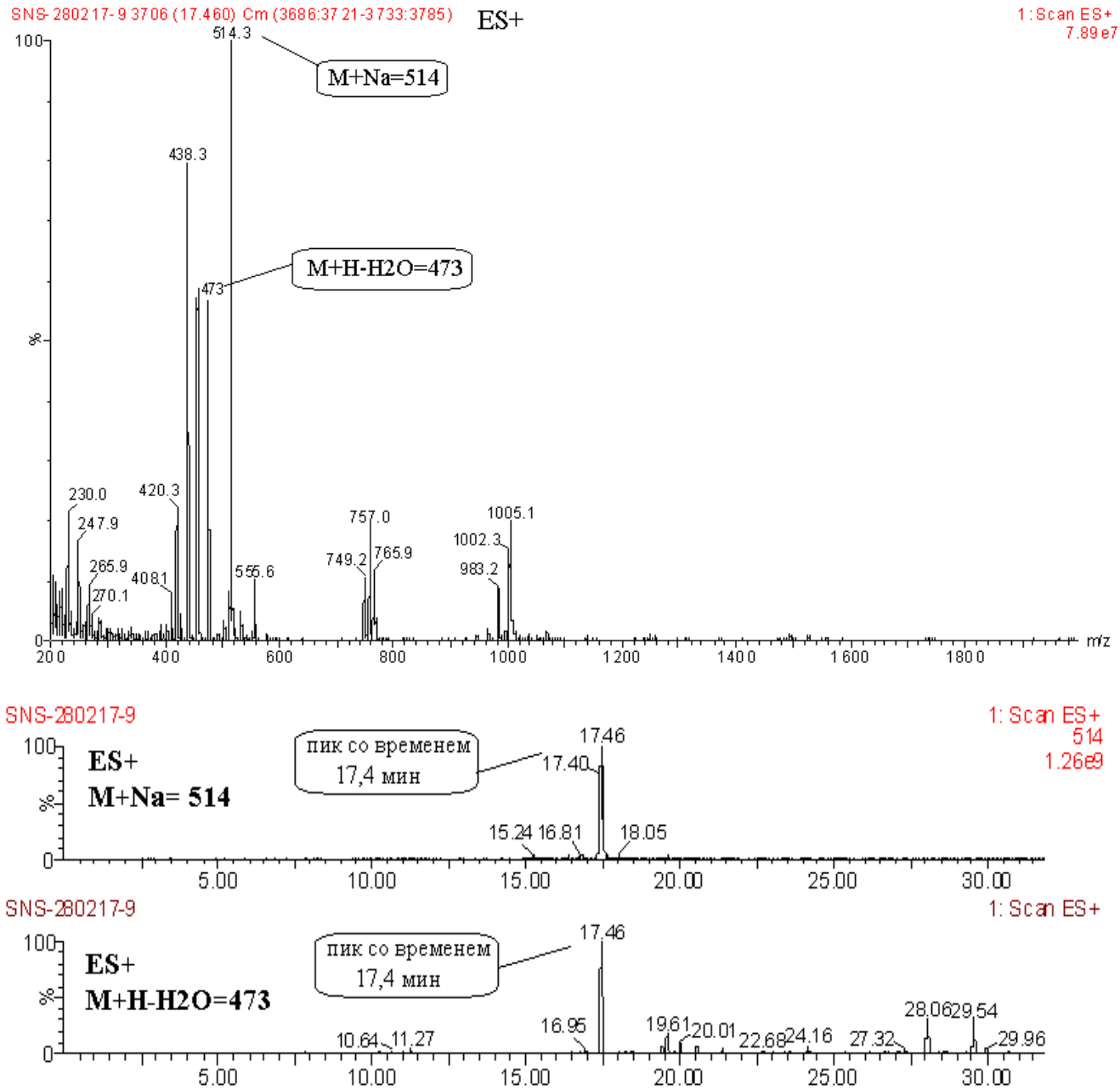


Рисунок 4.14. МС-спектры в режиме регистрации позитивных и негативных ионов растворов кислотного гидролиза сапонинов стиракса лекарственного

Компонент с таким временем удерживания и молекулярным ионом 490 в режиме регистрации негативных ионов наблюдается в исходной смеси, но в значительно меньшей концентрации. На основании этого можно утверждать, что данный компонент является продуктом гидролиза в кислых условиях.

Таким образом, простые методы - химические реакции и также более современные – УЭЖХ и МС, подтверждают, что полученный СЭСЛ содержит сумму сапонинов стиракса лекарственного.

4.4. Стандартизация СЭСЛ

На основании результатов изучения химического состава СЭСЛ полученного по методике 4.2. в целях стандартизации предполагаются следующие показатели: описание, растворимость, сыпучесть, влажность, подлинность и количественное определение содержания сапонинов.

4.4.1. Описание СЭСЛ

Внешний вид СЭСЛ: Сухой очищенный экстракт стиракса представляет собой аморфные частицы от светло-кремового до кремового цвета с серым оттенком, со специфическим запахом (Рис 4.15.).

Рисунок 4.15. Внешний вид СЭСЛ

Микроскопические признаки СЭСЛ: Одной из характеристик любого порошка и сухого растительного экстракта, в том числе является форма и размер частиц. Форму частиц СЭСЛ определяли с помощью СЭМ.

Как видно из рисунка 4.16., частицы сухого экстракта стиракса лекарственного имеют различные размеры и форму. Частицы многоугольные, с ломаными краями иногда удлиненные иногда округлые. Поверхность частиц – покрыта выступающими многогранными образованиями. Даже округлые частицы имеют очень неровную поверхность. Неровная поверхность частиц не позволяет им скользить относительно друг друга.

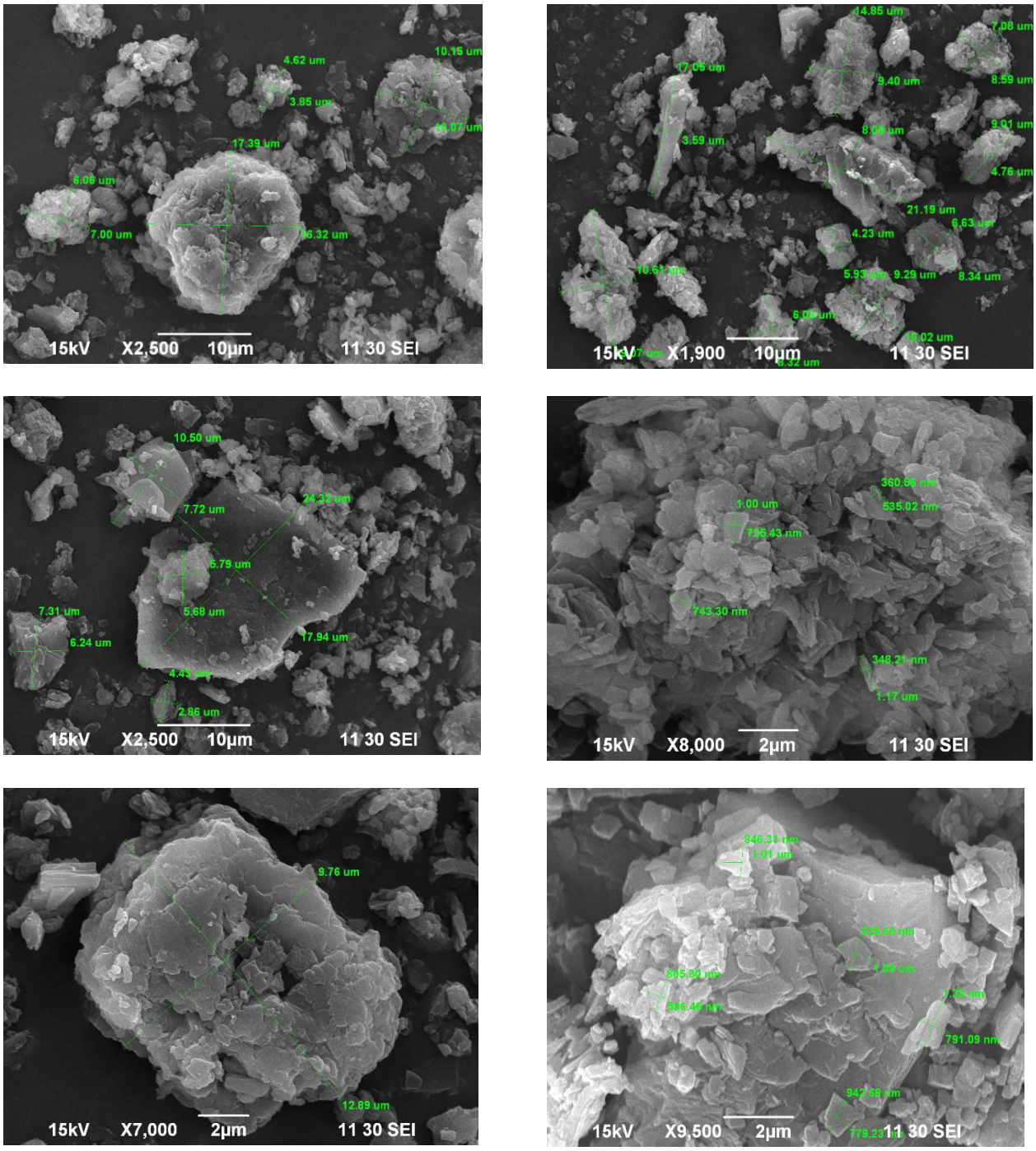


Рисунок 4.16. Микрофотографии частиц порошка сухогоэкстракта стиракса лекарственного при разных увеличениях (СЭМ)

В таблице (4.8.) представлен анализ размера частиц экстракта, проведенный по полученным микрофотографиям.

Таблица 4.8. – Диаметры (мкм) частиц порошка СЭСЛ

Исследуемый объект	**Мелкие частицы, мкм**	**Средние частицы, мкм**	**Крупные частицы, мкм**
порошок сухого экстракта стиракса лекарственного	0,846 0,805 0,942 1,000 0,725 0,360 0,535 0,348 0,743 1,090 1,330 1,170	2,86 4,43 7,31 8,34 7,08 8,59 8,09 5,93 8,32 3,59 4,62 7,00	16,32 17,39 10,15 17,05 10,61 10,02 12,89 21,19 14,85 17,94 24,32 10,50
Среднее значение	**0,825±0,306**	**6,35±2,01**	**15,27±4,64**

Как видно из приведенных в таблице 4.8. результатов исследования, порошок СЭСЛ полидисперсный и диаметры частиц варьируют в широком диапазоне.

4.4.2. Определение растворимости СЭСЛ

Растворимость СЭСЛ определяли по методике ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15 при комнатной температуре. Результаты растворимости представлены в таб. (4.9.).

Таблица 4.9. – Результаты определения растворимости СЭСЛ при (20± 2)°С

№ опыта	Растворитель / Система растворителей	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества	Обозначения растворимости
1	Вода очищенная	1:1000	Мало растворим
2	Вода очищенная + ТЭА	1:10	Растворим
3	Вода очищенная +трометамол	1:10	Растворим
4	Вода очищенная +NaOH	1:10	Растворим
5	Спирт 95%	1:100	Умернно растворим
6	Метанол	1:20	Растворим
7	Глицерин	1:125	Мало растворим
8	Ацетон	1:20	Растворим
9	Пропиленгликоль	1:200	Мало растворим
10	Диметилсульфоксид	1:20	Растворим
11	Полиэтиленгликоль-400	1:1000	Мало растворим
12	Хлороформ	1:200	Мало растворим
13	н-бутанол	1:2000	Очень мало растворим

В процессе исследования было установлено, что сумма сапонинов в сухом экстракте растворима в ацетоне, метаноле и диметилсульфоксиде. Однако, использование этих растворителей в лекарственной форме исключено, поскольку эти растворители небезопасны и могут вызывать раздражение и пенетрантное действие. Поэтому для дальнейшей работы была выбрана система растворителей вода очищенная + трометамол (опыт 3).

4.4.3. Определение степени сыпучести сухого экстракта

Одним из технологических свойств сухих растительных экстрактов являются характеристики сыпучих материалов. Поэтому нами были определены технологические характеристики экстракта стиракса лекарственного: сыпучесть, угол естественного откоса, насыпная плотность, насыпная масса и коэффициент прессуемости. Результаты, представленные в таблице (4.10.), демонстрируют неудовлетворительные технологические характеристики у изучаемого экстракта, полученного по нашему методу. В результате проведенных испытаний, получены следующие данные:

m=33,39; V_0=78 см^3; V_{10}=76 см^3; V_{500}=58 см^3; V_{1250}=58 см^3.

Таблица 4.10. – Технологические характеристики порошка СЭСЛ

Сыпучесть, г/с		**Угол естественного откоса, град**	**Насыпная масса, г**	**Насыпная плотность, г/см^3**		**Индекс Карра** $К_{пр}$ **%**	**Индекс Хауснера**
Насадкамм± 0,01							
10	0	68±2	0,428±0,02	ρ_{10}	0,439±0,01	25,64	1,343
15	0			ρ_{500}	0,575±0,01		
25	0						

4.4.4. Влажность СЭСЛ

Влажность полученного сухого экстракта составляет 6,5 % (таблица 4.11).

Таблица 4.11. – Влажность СЭСЛ - (n=6, P=95%) ($t_{0,95,\ 5}$ = 2,571).

Влажность СЭСЛ %	$\bar{x}$	**S**	**S$_r$ %**	**Δ**	$\bar{x}$ **± Δ**
	6,5	0,802	12,346	0,846	6,5±0,8

4.4.5. Количественное определение содержания сапонинов для контроля качества сырья

Количественное содержание сапонинов в сухом экстракте стиракса лекарственного определяли при помощи, разработанной и валидированной методики ЯМР- ^{1}H, изложенной в главе 2 (см. п. 2.2.7.). Для сапонина В был выбран сигнал при 5.94 м.д., для сапонинов А и С выбрана совокупность сигналов в области 5.70-5.8м.д. Сигналов дезацилсапонина, не перекрывающихся другими сигналами, не обнаружено. В результате получено содержание сапонина В = 2,7 ± 0,1 мг (5,8 ± 0,21%), суммы сапонинов А и С = 10,4 ± 0,21 мг (22,5 ± 0,45%) (Рисунок 4.17.). Содержание сапонинов А, В, С в образцах сухого экстракта стиракса лекарственного составило от 28,3 до 29%. Установлена норма содержания суммы сапонинов в сухом экстракте стиракса лекарственного не менее 27%.

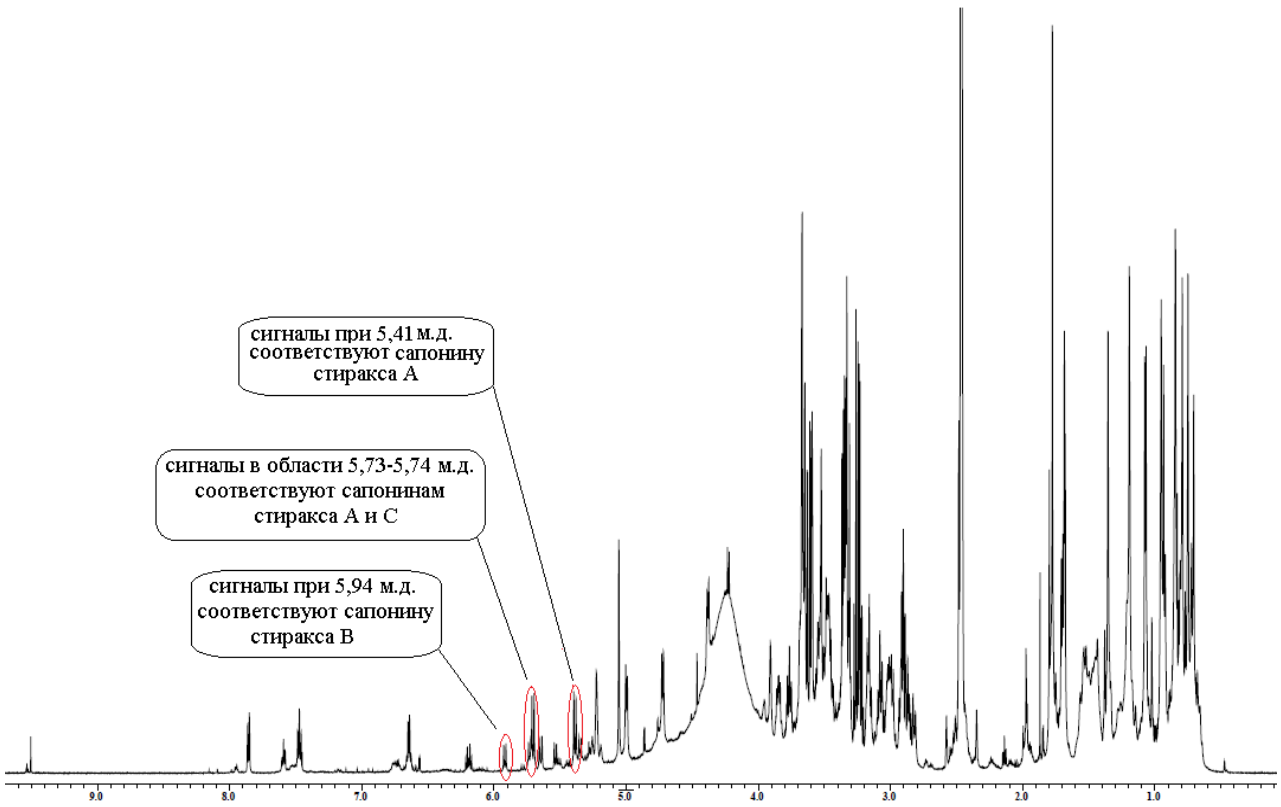


Рисунок 4.17. Спектр ЯМР ^{1}H сухого экстракта стиракса лекарственного

На основании проведенных экспериментов по стандартизации СЭСЛ разработан нами проект НД «**Стиракса лекарственного экстракт сухой (СЭСЛ)**»- приложение № 5.

4.5. Изучение стабильности при хранении СЭСЛ:

С целью изучения стабильности СЭСЛ в процессе хранения и для установления его срока годности нами были заложены образцы СЭСЛ на хранение при температуре (25,0±5°С и влажности 60±2%) - комнатная температура. Исследования показателей качества были проведены каждые 6 месяцев на протяжении 24 месяцев. Результаты анализа СЭСЛ представлены в табл. 4.12.

Таблица 4.12. – Результаты изучения стабильности СЭСЛ при хранении при температуре 25±5°С и влажности 60±2%.

Показатели качества	Метод и норм	Сроки хранения, мес				
		0	**6**	**12**	**18**	**24**
Описание	аморфные частицы от светло-кремового до кремового цвета с серым оттенком, со специфическим запахом.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Подлинность	**1) качественные реакции:** реакция пенообразования реакция гемолиза **2) УФ:** Наличие характерных максимумов поглощения при 270±1 нм и 315±1 нм. **3) ТСХ** в системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1) (УФ-свет, 245 нм/ детектор- раствор взвеси дефибринированной крови). На ТСХ обнаруживаются зоны адсорбции белого цвета с Rf около (0,68) (сапонины).	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Растворимость	растворима в ацетоне, метаноле, диметилсульфоксиде, вода+ТЭА, вода+трометамол, вода+NaOH.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Сыпучесть	**1) Насыпная масса:** 0,428±0,02 г **2) Насыпная плотность, г/см3** ρ_10 0,439±0,01 ρ_500 0,575±0,01	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Влажность %	6,5±0,8	5,7	6,2	5,6	6,1	6,7
Содержание сапонинов	**ЯМР ^{1}H** не менее 27%	28,5	27,9	30,3	28,3	28,1

Как видно, из представленных данных в таблице 4.12., СЭСЛ соответствует требованиям по всем показателям качества и позволяет уставить срок годности в течение 24 месяцев.

4.6. Определение биологических свойств СЭСЛ

4.6.1. Оценка активности БАВ *Styrax officinalis* в опытах *in silico*

Одно из фармакологических действий сапонинов это спермицидная активность. Прежде чем выделять БАВ и разрабатывать лекарственную форму на основе сапонинов стиракса мы изучили их фармакологическую активность *in silico*. На рисунке 4.18. показан механизм действия сапонинов на липидный бислой в плазматической мембране сперматозоидов. Действие сапонинов приводит к везикуляциям и вакуолизациям. Эти эффекты разрушают мембрану и тем самым приводят к разрушению спермиев.

Мы предполагаем такие же эффекты у сапонинов стиракса лекарственного.

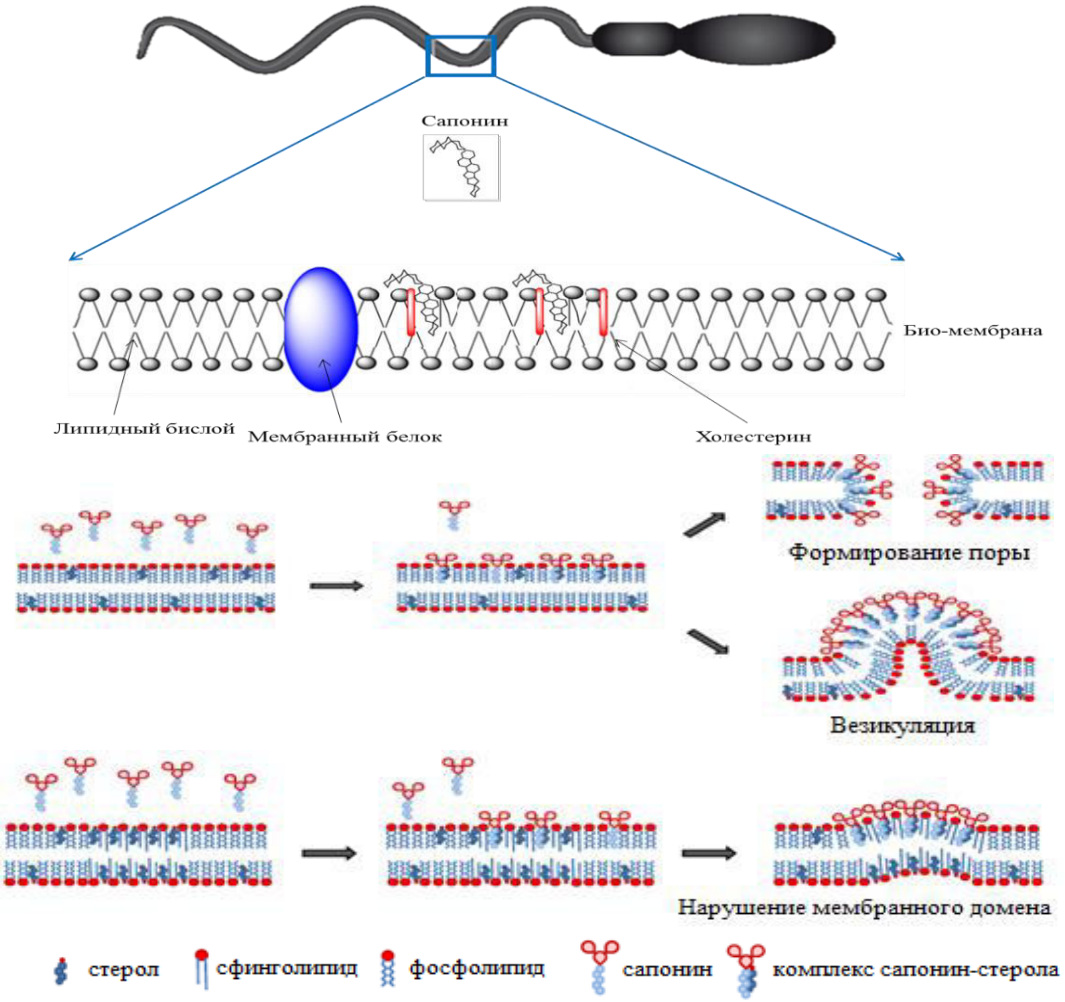


Рисунок 4.18. Схема спермицидного действия сапонинов [Augustin J.M. et al. 2011]

Чтобы понять, обладают ли сапонины стиракса спермицидной активностью и какие ещё свойства они могут проявлять *in vivo*, была проведена оценка фармакологических свойств сапонинов стиракса с помощью компьютерного моделирования молекул сапонинов стиракса и их взаимодействия с различными рецепторами, ферментами и др.

Компьютерная оценка плейотропного действия сапонинов стиракса лекарственного на основе анализа зависимостей «структура-активность» с использованием программы PASS

Химические соединения имеют широкий спектр биологической активности. Прогнозирование спектров активности веществ (Prediction of Activity Spectra for Substances) (PASS) представляет собой программу, используемую для анализа общей комплексной активности: фармакологическую активность, токсичность, механизм действия, метаболические условия на основе взаимосвязи структурных формул и активности (SAR) с точностью 95%.

Компьютерная визуализация химических структур сапонинов стиракса:

2D химические структуры сапонинов стиракса (A, B, C, стиракс дезацилсапонин) были составлены с использованием пакета Marvin Sketch 2017. В качестве входной информации в программе PASS и сайте Swiss Dock используется информация о структурной формуле молекулы, представленная в виде файла в формате Mol file, либо в виде файла в формате SD file.

Химические структуры сапонинов стиракса (A, B, C, стиракс дезацилсапонин) были определены с помощью ЯМР в предыдущих опубликованных статьях (R. Segal-1964, Y. Yayla - 2002). Структуры сапонинов стиракса были составлены с использованием пакета MarvinSketch 2017, принадлежащего Chem Axon Ltd и сохранились в виде файлов (Mol file, SDF file, JPEG, PDF).

В рисунке 4.19. представлены геометрически оптимизированные структуры стиракс-сапонинов в 2D-форме.

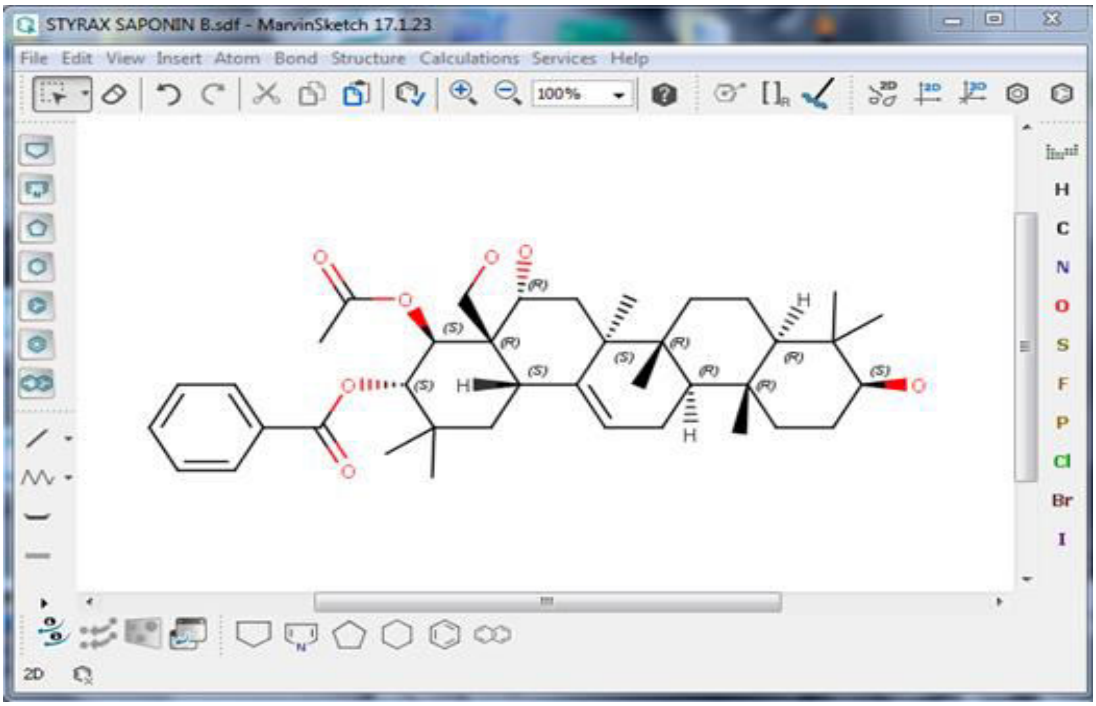
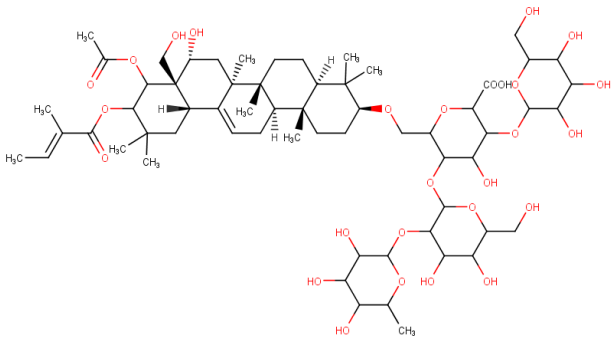
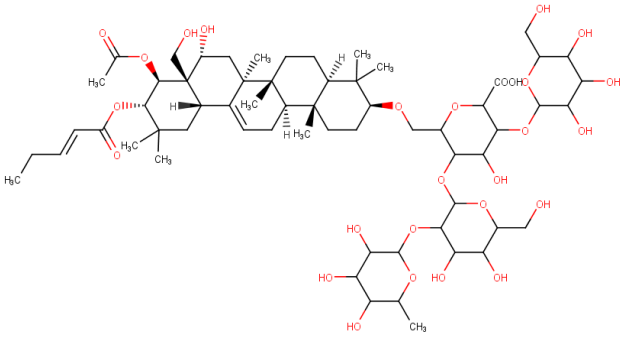


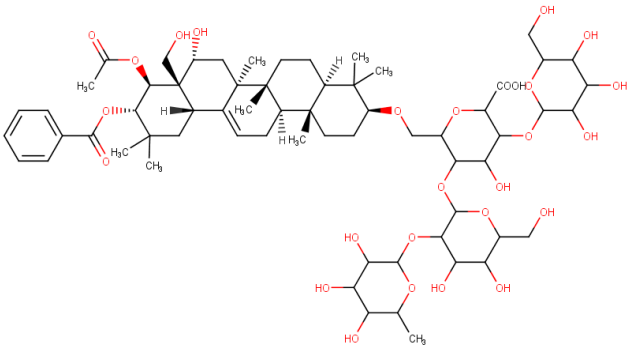
Рисунок 4.19. Структура стиракс-сапогенина (B) в окне программы Marvin Sketch



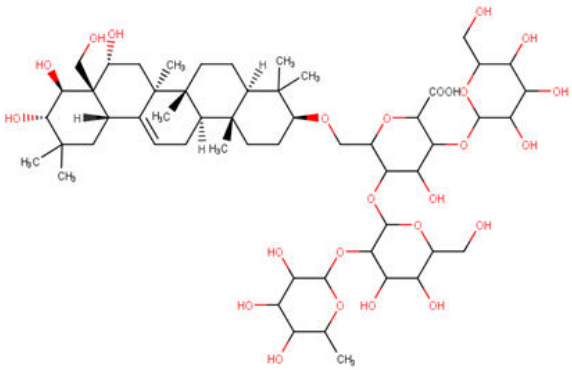
Сапонин стиракса A



Сапонин стиракса C



Сапонин стиракса B



Стиракс дезацилсапонин

Рисунок 4.20. 2D химические структуры сапонинов стиракса A, B, C и стиракса дезацилсапонин

Прогнозирование биологической активности химических структур сапонинов стиракса / Prediction of activity for chemical structure of styrax saponins

Изучение специфической фармакологической активности сапонинов стиракса проводилось с помощью программы PASS.

Компьютерная программа PASS оценивает вероятный профиль биологической активности структурной формулы органического соединения, молекулярная масса которого находится в интервале 50 - 1250.

В программе PASS биологическая активность представлена качественным образом (активно/неактивно)с оценками вероятности проявления активности: Pa – соединение активно; Pi - неактивно.

Конечную информацию мы получили в виде списка прогнозируемых видов активности с оценками Pa и Pi, которые могут принимать значения в диапазоне от 0,000 до 1,000. Шанс обнаружить конкретную активность в эксперименте тем выше, чем больше значение Pa и меньше значение Pi для данной активности.

Для анализа в программе использовались химические формулы стиракс дезацилсапонина, сапогенина стиракса A, сапогенина стиракса B и сапогенина стиракса C - несахарная часть сапонинов стиракса A, B, C, полученная гидролизом.

Результаты показали, что дезацилсапонин имеет 283 прогнозируемые активности, около 60 из них с высокими значениями Pa и низкими значениями Pi. Такое сочетание показателей прогнозирует высокую фармакологическую активность.

Некоторые из высоких ожиданий: гепатопротектор (Pa: 0,992, Pi: 0,001), ингибитор экспрессии ICAM1 (Pa: 0,971, Pi: 0,000), стимулятор Caspase3 (Pa: 0,970, Pi: 0,002) и других. Полученные результаты представлены в табл. 4.13.

Таблица 4.13. – Результаты прогнозирования биологической активности химических структур сапонинов стиракса с помощью программы PASS

биологическая активность	**стиракс дезацилсапонин**		**сапогенин стиракса А**		**сапогенин стиракса В**		**сапогенин стиракса С**	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Гепатопротекторная	0,992	0,001	0,973	0,001	0,927	0,002	0,944	0,002
Контрацептив	0,507	0,007	0,386	0,013	0,442	0,010	0,381	0,013
антагонист целостности мембраны	0,840	0,005	0,686	0,015	0,863	0,004	0,778	0,008
ингибитор экспрессии ICAM1	0,971	0,000	0,981	0,000	0,816	0,001	0,833	0,001
Противоопухолевая	0,934	0,004	0,951	0,004	0,926	0,005	0,930	0,005
ингибитор пероксидазы липидов	0,872	0,003	0,919	0,002	0,831	0,003	0,810	0,003
стимулятор Caspase 3	0,970	0,002	0,896	0,004	0,912	0,003	0,831	0,005
агонист апоптоза	0,838	0,005	0,870	0,005	0,807	0,008	0,848	0,005
Химиопрофилактическая	0,951	0,002	0,866	0,003	0,898	0,002	0,894	0,002
противоопухолевая (рак яичников)	0,698	0,004	0,864	0,003	0,837	0,003	0,818	0,003
Противовоспалительная	0,843	0,005	0,830	0,005	0,820	0,005	0,843	0,005
Противогрибковая	0,818	0,004	0,705	0,009	0,605	0,018	0,697	0,010
противовирусная (грипп)	0,778	0,006	0,668	0,008	0,745	0,004	0,763	0,004
ингибитор альфаглюкозидазы	0,877	0,001	0,248	0,004	0,382	0,003	0,336	0,003

Как видно из приведённых в табл. 4.13. данных, сапогенины стиракса имеют сходную предсказуемую активность друг с другом и со структурой их сапонина. Они обладают контрацептивной активностью и являются антагонистами целостности мембран, что говорит о возможности использовать БАВ стиракса лекарственного в качестве спермицидного агента. Кроме того,

сапогенины и сапонин стиракса лекарственного по результатам компьютерного моделирования могут обладать противовоспалительным, противогрибковым и противовирусным действием.

Предполагаемым способом метаболизма является взаимодействие с CYP2H и UDP-глюкуронозил трансферазой. Вероятность побочных эффектов и токсичности прогнозируется низкая, данные представлены в табл. 4.14.. Однако сапогенины стиракса А, В и С показывают чуть больше токсичности и побочных эффектов, чем общие сапонины.

Таблица 4.14. – Побочные эффекты и токсичность сапогенинов стиракса лекарственного по программе PASS

Побочные эффекты и токсичность	**Сапогенин стиракса С**		**Сапогенин стиракса В**		**Сапогенин стиракса А**	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Ингибитор фосфолипазы С	0,372	0,020	0,407	0,014	0,485	0,006
Антагонист альдостерона	0,315	0,012	0,319	0,011	0,303	0,016
Стимулятор протеинкиназы С	0,210	0,004	0,121	0,028	0,168	0,009
Ингибитор АТФ	0,226	0,050	-	-	0,200	0,077
Агонист андрогена	0,136	0,012	0,177	0,010	0,125	0,013
Агонист эстрогена	0,140	0,026	0,143	0,026	0,126	0,029

По результатам моделирования фармакологической активности в программе PASS предполагается, что сапогенин стиракса А и сапогенин стиракса С будут субстратом для фермента CYP2J с (Pa: 0,556) и (Pa: 0,629) соответственно, тогда как сапогенин стиракса В, как предполагается, может является субстратом для CYP2H с (Pa: 0,728).

Проведенные нами исследования по компьютерному моделированию фармакологической активности БАС стиракса лекарственного, показали перспективность использования данных соединений для разработки лекарственных форм спермицидного действия.

4.6.2.Исследование специфической активности экстрактов стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.) в опытах *in vitro*

Изучение спермицидного действия суммы сапонинов в СЭСЛ

При исследовании спермицидной активности суммы сапонинов в СЭСЛ *in vitro* после смешивания нативной спермы и растворов различных концентраций сапонинов стиракса в хлорид натрия 0,9% в равных количествах и последующего нанесения смеси на предметное стекло и исследовали спермы в подвижном и активно подвижном виде по методу (Г. 2, п. 2.2.8.). Результаты исследований 12 образцов представлена в приложении 3, среднее значение и стандартная ошибка среднего представлены в таблице (4. 15.).

Таблица 4.15. – Влияние водных растворов суммы сапонинов в сухом экстракте из стиракса лекарственного различных концентраций на жизнеспособность спермиев

Концентрация водного раствора сапонинов	Время контакта спермы с растворами	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %
0.05%	30 с	21,78±4,63	8,66±2,11
	60 с	15,18±2,54	7,50±1,90
	5 мин	4,93±1,55	2,34±0,77
	10 мин	3,06±1,21	1,38±0,81
	15 мин	0	0
	30 мин	0	0
0.1%	30 с	6,83±1,62	3,39±1,12
	60 с	3,15±1,47	1,44±0,70
	5 мин	2,51±0,85	1,00±0,58
	10 мин	0,89±0,41	0,26±0,35
	15 мин	0	0
	30 мин	0	0
0.2%	30 с	5,02±1,29	2,36±0,93
	60 с	3,1±1,32	1,65±0,70
	5 мин	1,1±0,47	0,35±0,15
	10 мин	0	0
	15 мин	0	0
	30 мин	0	0
0.3%	30 с	4,55±1,72	1,9±0,74
	60 с	2,73±1,00	1,1±0,41
	5 мин	0,11±0,09	0,03±0,04
	10 мин	0	0
	15 мин	0	0
	30 мин	0	0

0.4%	30 с	0,41±0,16	0,17±0,12
	60 с	0,20±0,17	0,05±0,08
	5 мин	0	0
	10 мин	0	0
	15 мин	0	0
	30 мин	0	0
0.5%	30 с	0	0
	60 с	0	0
	5 мин	0	0
	10 мин	0	0
	15 мин	0	0
	30 мин	0	0

Из таблицы (4. 15.) видно, что в экспериментах *in vitro* после смешивания в равных количествах нативной спермы с растворами сапонинов стиракса лекарственного, было установлено что подвижных и живых спермиев в изучаемых смесях не наблюдалось с раствором 0,5%, где 100%-ная эффективность проявлялась в концентрации 0,5 % в моменте смешивания спермиев с раствором сапонинов стиракса (минимальная активная концентрация).

4.6.3. Изучение бактериостатической и фунгистатической активности жидкого и сухого экстрактов околоплодников стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.) в опытах *in vitro*

Антимикробную активность изучали для 2 образцов экстрактов:

– жидкий водный экстракт околоплодников стиракса лекарственного с сухим остатком 64 %;

– сухой очищенный экстракт околоплодников стиракса лекарственного.

В результате изучения установлено (см. таблицу 4.16.), что все изученные образцы обладают слабой антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 209-P, в отношении грамотрицательных бактерий *Esherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, также дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 10231:жидкий водный экстракт околоплодников – в разведении 1:8-1:16 и сухой очищенный экстракт околоплодников – в концентрации 2000-4000 мкг/мл.

В отношении мицелиальных грибов *Microsporum canis 252:*жидкий водный экстракт околоплодников – в разведении 1:5120 и сухой очищенный экстракт околоплодников – в концентрации 31,2 мкг/мл.

Таблица 4.16. – Антимикробная активность жидкого и сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.) в опытах *in vitro* (разведение, концентрация) (мкг/мл)

Объекты исследования	***Staphylococcus aureus* 209 P**	***Escherichia coli* ATCC 25922**	***Proteus vulgaris* ATCC 6896**	***Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027**	***Candida albicans* ATCC 10231**	***Microsporum Canis* 252**
жидкий водный экстракт околоплодников	**1:16**	**1:8**	**1:8**	**1:8**	**1:16**	**1:5120**
сухой очищенный экстракт околоплодников	**2000 част.1000**	**4000**	**4000**	**4000**	**2000**	**31,2 част.15,6**

Таким образом, проведенными исследованиями установлено наличие у 2 изученных образцов слабой антимикробной активности в отношении *Staphylococcus aureus* 209-P, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 и сильной антимикотической активности в отношении *Microsporum canis 252*: у жидкого водного экстракта околоплодников в разведении 1:5120 и у сухого очищенного экстракта околоплодников в концентрации 31,2 мкг/мл.

Изучена сравнительная антимикробная активность экстрактов стиракса жидкого и сухого (СЭСЛ). Установлено, что все экстракты обладают выраженным антимикробным действием, но СЭСЛ обладает высшей активностью чем жидкий неочищенный экстракт. А это показатель о том, что антимикробный эффект принадлежит сапонинам в СЭСЛ и не других БАВ в жидком экстракте.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Разработана методика выделения сухого экстракта из околоплодников стиракса лекарственного. Установлены основные технологические характеристики. Оптимальный выход сухого экстракта достигается при размере частиц от 2,5 до 0,25 мм, оптимальным растворителем является чистый метанол или более безопасный, но менее технологичный 70% спирт, оптимальное количество циклов экстракции 8-10 и время 6-7 часов;
2. Изучение химических состав СЭСЛ с помощью методов УФ, ВЭЖХ, МС и ЯМР спектроскопии, подтверждено присутствие 28% суммы сапонинов;
3. Предложена стандартизация СЭСЛ по показателям: внешний вид и микроскопические признаки СЭСЛ, растворимость, подлинность, сыпучесть и количественное определение содержания сапонинов в СЭСЛ, на основе полученных результатов разработан проект НД на ЛС «Стиракса лекарственного экстракт сухой (СЭСЛ)»;
4. Определены биологические свойства СЭСЛ:

   - методом *in silico* установлена потенция биологических активности сапонинов стиракса лекарственного, по компьютерному моделированию фармакологической активности БАС стиракса лекарственного показали перспективность использования данных соединений для разработки лекарственных форм спермицидного действия.

   - установлена в результате проведённых исследований методом *in vitro* спермицидная активность СЭСЛ. При использовании 0,025 г СЭСЛ активность была максимальной уже в момент смешивания.

   - методом *in vitro* установлена антимикробная активность СЭСЛ, что позволяет предположить наличие потенциальной эффективности в отношении сопутствующих заболеваний половых путей при использовании его в составе вагинальных форм контрацептивного действия.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СПЕРМИЦИДНОЙ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА СТИРАКСА ЛЕКАРСТВЕННОГО

5.1. Разработка состава и технологии спермицидной плёнки содержащей сапонины стиракса лекарственного

Результаты изучения химического состава и спермицидной активности СЭСЛ свидетельствуют о возможности разработки на их основе контрацептивного препарата местного действия.

Лекарственные формы в виде пленок обладают рядом известных положительных характеристик. Они непосредственно вводятся на место аппликации, где создают высокую концентрацию действующих веществ и позволяют достичь значительного спермицидного эффекта при минимальном побочном действии, а также не требуют особых условий для применения (как крем, пена или гель). Пленки выгодно отличаются от вагинальных кремов, которые неудобны в применении, пачкают белье и руки. Кроме того, у кремов и гелей не предусмотрена точность дозирования лекарственного препарата, что приводит к неоднородному распределению при применении во влагалище влекущему за собой снижение контрацептивного эффекта.

5.1.1.Обоснование состава пленки на основе СЭСЛ:

- **Состав пленок**

Одним из важных моментов в разработке состава биорастворимых лекарственных полимерных вагинальных пленок является выбор компонентов матрицы.

В качестве структурообразующих веществ в составе пленки использовали различные растворимые в воде полимеры такие, как МЦ, РАП, ПВС. Для выбора полимеров или смеси полимеров и их концентраций, а также пластификаторов позволяющих получить адекватные пленки, были исследованы характеристики пленок различных составов.

- **Получение растворов ВВ - пленкообразователей**

1. Приготовление основы лекарственной формы – пленки, с использованием ПВС (поливиниловый спирт).

Приготовление 6% раствора спирта поливинилового 50 мл: к 3,0 г ПВС, добавляют 50 мл воды очищенной и помещают в нее ПВС. Основообразующее вещество набухает при комнатной температуре в течение 40 минут при постоянном помешивании. Полученную смесь нагревают до температуры 90-100°С, непрерывно перемешивая, до полного растворения, затем охлаждают до комнатной температуры.

2. Приготовление основы, с использованием Карбопола 940. Для приготовления 0,5% раствора карбопола, объемом 50 мл: к 0,25 г карбопола, добавляют 50 мл воды очищенной и помещают карбопол. Основообразующее вещество набухает при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего было добавляют несколько капель ТЭА (триэтаноламина) или трометамол до pH 6,5-7,5 и полного растворения, размешивают.

3. Приготовление основы лекарственной формы с использованием 4 % раствора метилцеллюлозы (МЦ). К 2,0 г МЦ, добавляют 25 мл горячей (90°С) воды очищенной и МЦ. Основообразующее вещество набухает при комнатной температуре в течение 40 минут при постоянном помешивании. После охлаждения раствора до комнатной температуры доводят объем до 25 мл и добавляют остальную холодную воду 25 мл.

4. Приготовление многокомпонентной основы, смесь 1,0 г $ПЭГ_{1500}$, 0,5 г $ПЭГ_{6000}$, 2,5 г глицерина, 3,0 г $ПЭГ_{400}$ и 2,0 г ПГ помещают в колбу и нагревают на водяной бане.

- **Выбор концентрации активной фармацевтической субстанции - сумма сапонинов в сухом экстракте**

Выбор концентрации БАВ в составе вагинальных пленок со спермицидным действием, основан на собственных результатах по определению спермицидной активности *in vitro*, поскольку подобных данных нет в литературе.

Проанализировав результаты в исследовании активности *in vitro*, в качестве рабочей концентрации СЭСЛ выбрана 0,025 г/пленка 25 см^2 ~ 0,15 г/ 6 пленок (150 см^2) - для вагинального контрацептивного применения.

- **Разработка состава пленки**

Учитывая, что в литературе есть данные об использовании биоразлагаемых полимеров в различных концентрациях и сочетаниях, такие как МЦ, Na-КМЦ, ПВС, альгинат и др., а в качестве пластификатора применяли глицерин. Были изготовлены образцы пленок без/с содержанием действующей вещества по составам, которые представлены в таблице (5.1.).

Таблица 5.1. – Модельные составы пленочной основы и пленок

Номер образца / **Компоненты**	**Количество, %**									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
МЦ	0,5	-	0,25	-	0,4	0,2	0,35	0,3	-	-
ПВС	1,5	1,5	1,5	0,75	2,0	1,5	1,25	2,0	8	4,5
Карбопол 980	0,1	0,1	0,1	0,3	0,05	0,1	-	0,05	-	0,1
Глицерин	-	-	8	8	-	8	13,5	-	16,5	7,4
ПЭГ 400	12	12	4	8	6,7	-	8,1	6,6	-	-
ПГ	8	4	-	4	3,4	7,4	-	3,3	-	-
ПЭГ:ПГ:глицерин(2:1:1)	4	4	-	-	6,7	-	-	1,0	-	-
СЭСЛ	-	-	-	-	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Нейтрализующий агент	до pH 6-8									
Вода очищенная	до 100,0									

Приготовленные образцы основы и лекарственных пленок оценивались по критериям, описанным в научной литературе: морфология, время дезинтеграции, время растворения, результаты представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2. – Показатели образцов пленок без/с БАВ на различных ВМС

Образец	Внешний вид и другие особенности пленки	Время дезинтеграции пленки, сек	Время растворения пленки, сек
1	Не отклеивается от подложки	-	-
2	Мутная, нелипкая, толстая	3	90
3	Прозрачная, однородная, упругая и не складывается	10	3
4	Местами не отклеивается от подложки	-	-
5	Тонкая, без воздушных включений, мутная, не однородная	50	2
6	Тонкая, мягкая, прозрачная, однородная, без воздушных включений, легко складывается, не липкая	45	4
7	Толстая прозрачная, с воздушными включениями, упругая и не складывается	84	125
8	Прозрачная, однородная, без воздушных включений, толстая, не липкая	75	2
9	Прозрачная, однородная, с воздушными включениями, пластичная текстура, не липкая, толстая, упругая и не складывается	140	8
10	Прозрачная, однородная, без воздушных включений, тонкая, мягкая, складывается, не липкая	20	75

На основании полученных результатов выбраны составы образцов пленок 6 и 10, обладающие лучшими внешними характеристиками, а также временем дезинтеграции и растворения. В этой связи, было проведено сравнение времени

растворения образцов 6 и 10 и спермицидной пленки VCF® (США, одобрен FDA), выбранной в качестве контрольного образца. Растворение проводилось в одинаковых условиях в течении 1 мин. В результате проведенного исследования, нами выбран образец 10, имеющий следующий состав (Таблица 5.3.).

Таблица 5.3. – Состав Вагинальной спермицидной пленки с экстрактом стиракса (ВСПЭС)

Компоненты	**Содержание, %**
ПВС	4,5
Карбопол 980	0,1
Нейтрализующий агент	pH 6-8
Глицерин	7,4
Сухой экстракт стиракса лекарственного	1,1
Вода очищенная	до 100

Полученные пленки имеют квадратную форму, со стороной 5×5 см; толщина – около 200 мкм, гладкую поверхность, без воздушных включений, прозрачные, легко складываются, не липкие, цвет пленок светло желтый (с возможностью добавления окрашивающих агентов), без запаха и вкуса, на изломе – однородные.

5.1.2. Разработка технология ВСПЭС

- **(ВР) стадии вспомогательных работ:**

Подготовка дезинфицирующих растворов; подготовка производственных помещений и необходимого оборудования; подготовка персонала, подготовка БАВ и основы. Подготовка БАВ включает следующие операции: приёмка сырья; оценка его качества по показателям; взвешивание БАВ. Подготовка основы включает: взвешивание полимера (ПВС и карбопол 980), воды очищенной, глицерина, трометамола, нипагина и нипазола. В конце стадии проводили подготовку упаковки (буфлен).

- **(ТП) Стадии основного технологического процесса:**

Пленки вагинальные готовили в асептических условиях методом полива. Начальным этапом приготовления вагинальной пленки с сухим экстрактом стиракса является получение лекарственной композиции, затем СЭСЛ растворяли в смеси вода и трометамол, после чего его вводили в состав полимерной композиции (раствор полимеров) и тщательно смешивали. Разливали пленочную массу после деаэрации на подложки в пластиковую форму с размерами 10 × 15,. После сушки, высушенную пленку снимали от подложки, дозировали разрезали ножом до 6 пленок с размером пленки 5 × 5 см.

- **(УМО) Стадии упаковывания и маркировки:**

Полученный готовый продукт – вагинальные пленки с экстрактом стиракса, после анализа на соответствие НД расфасовывают по 1 пленке в буфлен по ТУ 5453-030-21032843-96.

Буфлен — это четырехслойный материал, состоящий из алюминиевой фольги и бумаги, соединенных расплавом полиэтилена, и дополнительного слоя полимера, нанесенного на фольгу. Буфлен обеспечивает упаковке необходимую прочность и устойчивость к большинству агрессивных сред. Полимерный слой позволяет выполнять термосваривание, при этом высокая прочность склеенных швов является важным достоинством буфлена.

Упаковку, маркировку осуществляют в соответствии с рекомендациями. Хранение спермицидных вагинальных пленок на основе экстракта стиракса лекарственного необходимо проводить в сухом, защищенном от света месте, при температуре 15- 25 °С.

Принципиальная технологическая схема получения ВСПЭС представлена на рисунке 5.1.

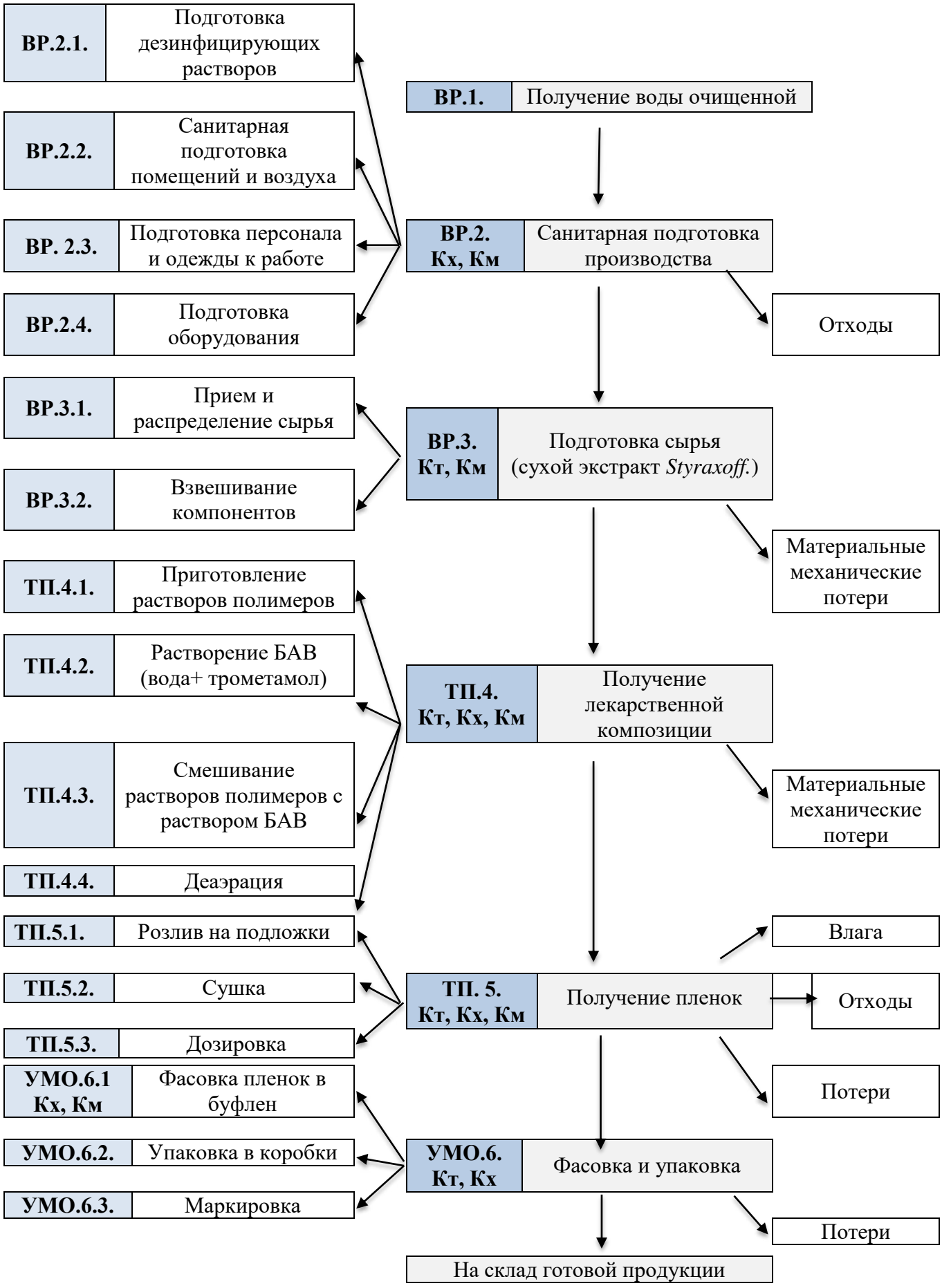


Рисунок 5.1. Технологическая схема получения ВСПЭС

Пленки, получаемые по представленной на рисунке 5.1. технологии, представляют собой прозрачные, желтоватого цвета, гладкие, без воздушных включений квадратные пластинки 5×5 см, толщиной около 200 мкм, легко складывающиеся, не липкие, без запаха и вкуса, на изломе – однородные.

Для подтверждения адекватности разработанной технологии проведена **оценка фармацевтической доступности ССС из ВСПЭС**:

Сапонины, имеющие кислый характер, определяют титриметрическим методом. Наибольшее распространение получил метод нейтрализации в неводной среде. Титриметрические методы для количественного определения сапонинов проводили по ГФ XI (потенциометрическое титрование раствором натра едкого - аралия маньчжурская, radices *Araliae mandshuricae*).

Тритерпеновые сапонины стиракса лекарственного имеют кислый характер, поэтому полученный раствор ССС титровали потенциометрически раствором натра едкого.

Методика - Количественное содержание ССС, высвобождаемых из пленки при контакте со средой высвобождения (СВ) – 0,001 М раствором уксусной кислоты pH 3,5-4,5 при перемешивании находили следующим образом - в 3 параллельных емкости помещают: А-холостой раствор - 10 мл СВ + основа пленки; В – ВСПЭС (25 мг СЭСЛ) + 10 мл СВ; С- контроль 25 мг СЭСЛ + 10 мл воды очищенной. При температуре 37°С и через определённые интервалы времени пробы отбирают параллельно из образцов А, В и С, которые оттитровывают потенциометрически стандартным раствором NaOH (0,0125 моль/л).

При титровании отмечают количество титранта, израсходованного на доведение pH испытуемого раствора до 7,0. Количественное определение ССС в процентах (Х) вычисляют по формуле: $X = \frac{V_2 - V_1}{V_3} \times 100$, где

V_2– объем раствора натра едкого (0,0125 моль/л), израсходованного на титрование пробы В, в миллилитрах;

V_1– объем раствора натра едкого (0,0125 моль/л), израсходованного на титрование холостого раствора А, в миллилитрах;

V_3– объем раствора натра едкого (0,0125 моль/л), израсходованного на титрование контрольной пробы С, в миллилитрах.

Результаты высвобождения лекарственной субстанции для 6 образцов представлены на рисунке 5.5. и статистическая обработка результатов анализа представлена в таблице 5.4.

Таблица 5.4. – Результаты изучения высвобождения ССС из ВСПЭС

время, сек	Высвобождение целевых БАС, %									
	Повторности						$\overline{X}$	S	S_r %	Δ
	1	2	3	4	5	6				
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	17,31	15,73	16,68	15,69	15,84	16,15	16,23	0,643	3,962	0,675
20	38,13	41,22	40,07	41,53	39,45	40,28	40,11	1,236	3,081	1,297
40	71,75	73,41	75,45	75,68	74,23	73,02	73,92	1,504	2,035	1,579
50	85,37	84,13	85,26	86,4	84,21	85,25	85,10	0,842	0,989	0,884
65	100,13	100,02	99,21	99,73	99,62	100,04	99,79	0,346	0,347	0,364

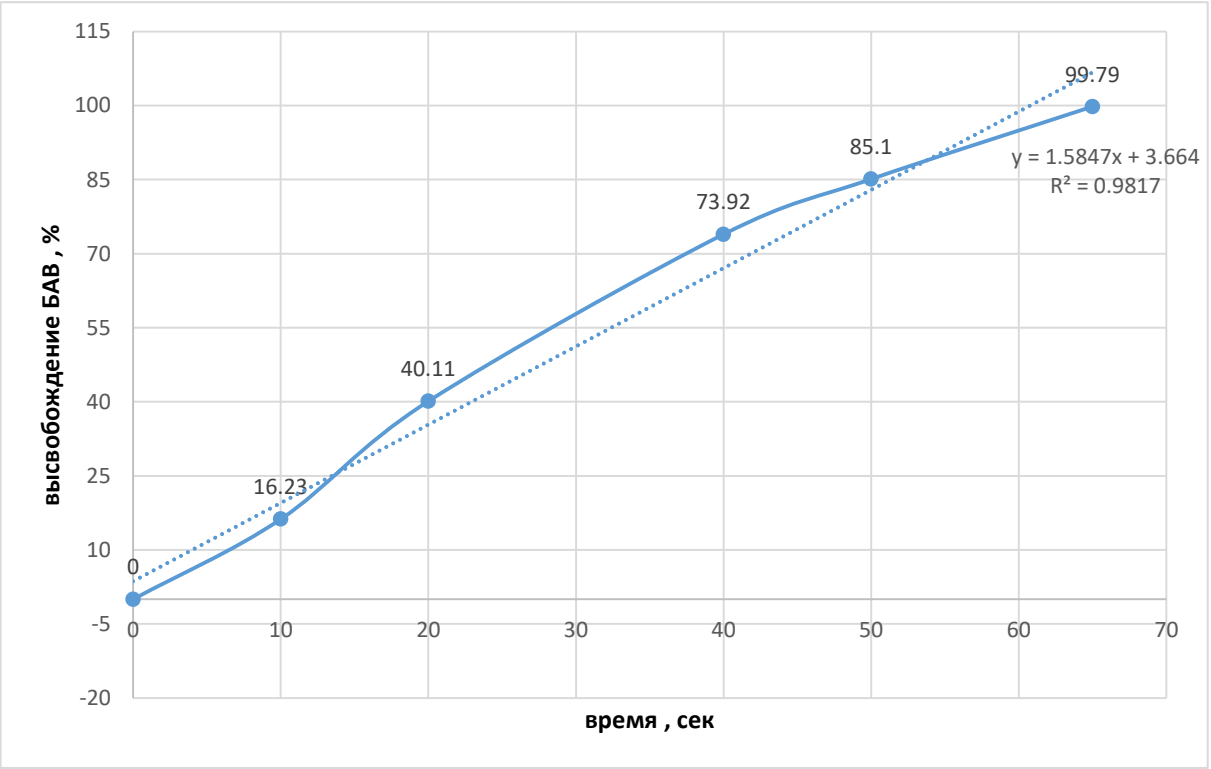


Рисунок 5.2. Высвобождение ССС из ВСПЭС.

В результате установлено, что ССС полностью высвобождается через минуту вместе с полным растворением плёнки, что подтверждает адекватность технологии.

5.2. Определение показателей качества вагинальной пленки

Согласно данным обзора литературы для стандартизации пленок могут быть использованы следующие показатели качества: внешний вид, масса пленки, pH, содержание влаги и время дезинтеграции время растворения и др.

5.2.1. Внешний вид: Визуальное наблюдение поверхности пленки: Гладкая, прозрачная, однородная, без воздушных включений, светло-желтого цвета;

Размер пленки: квадрат 5 см х 5 см;

Толщина: Измерение проводили при помощи микрометра. Методика: Среднее значение 6 измерений в разных местах пленки (в центре и четырех углах) [27, 28]. Результаты представлены в Таблице 5.5.

Таблица 5.5. – Толщина пленки 25 см^2 и отклонение от средного значения (n=6, P=95%) ($t_{0,95,\ 5}$ = 2,571).

показатель	$\bar{x}$	S	S_r %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Толщина пленки, мкм	**206,03**	**4,85**	**2,36%**	**5,10**	**206,03± 5,10**

5.2.2. Масса пленки (Однородность массы): Определение проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Нами было проведены трехкратные измерения для 6 полученных образцов одной серии. Результаты представлены в Таблице 5.6.

Таблица 5.6. – Средняя масса пленки 25 см^2 и отклонение от средней массы, (n=6, P=95%) ($t_{0,95,\ 5}$ = 2,571)

показатель	$\bar{x}$	S	S_r %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Вес пленки (5×5 см), г	**0,22**	**0,017**	**7,770**	**0,02**	**0,22 ± 0,02**

5.2.3. Определение pH: Определение pH проводится на стадии гелеобразования и определение pH водной дисперсии пленки [27]. С целью

определения изменения pH вагинальных жидкостей после дисперсии/растворения пленки, нами был приготовлен раствор, имитирующий искусственную вагинальную жидкость – 0,001 М раствор уксусной кислоты pH=3,5 в количестве 20 мл. Результаты представлены в таблице (5.7.).

Таблица 5.7. – Значение pH раствора гелеобразования и дисперсии пленки в ВЖИ (n=6, P=95%) ($t_{0,95,\ 5}$ = 2,571).

показатель	$\bar{x}$	S	S_r %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Значение pH раствора гелеобразования	**7,84**	**0,055**	**0,699**	**0,058**	**7,84±0,06**
Значение pH дисперсии пленки в среде растворения	**4,376**	**0,195**	**4,462**	**0,206**	**4,376±0,20**

5.2.4. Содержание влаги: Разница в весе связана с потерей воды. Содержание влаги рассчитывается, как разница в весе до и после полного высушивания пленки [24, 25, 27], или с использованием аппарата определения влажности (Аквилон АВ-50). Результаты определения влажности представлены в таб. (5.8.).

Таблица 5.8. – Изменение содержания воды % в процессе получения пленок до и после сушки

(n=6, P=95%) ($t_{0,95,\ 5}$ = 2,571).

показатель	$\bar{x}$	S	S_r %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Содержание воды до сушки%	**84,57**	**1,14**	**1,35%**	**1,20**	**84,57±1,20**
Содержание воды после сушки %	**14,50**	**1,29**	**8,91%**	**1,36**	**14,50±1,36**

5.2.5. Время дезинтеграции пленки и время растворения: С целью определения время дезинтеграции (потеря формы), образцы пленки поместили в 20 мл 0,001 М раствора уксусной кислоты pH 3,5 на шейкер и определяли время дезинтеграции [28]. Время растворения определяется после полного растворения пленки. Результаты анализа представлены в таблице (5.9.).

Таблица 5.9. – Время дезинтеграции и растворения вагинальных пленок (n=6, p=95%) ($t_{0,95,\ 5}$ = 2,571).

показатель	$\bar{x}$	S	S_r %	Δ	$\bar{x} \pm \Delta$
Время дезинтеграции пленки (сек)	**20,5**	**3,834**	**18,702**	**4,039**	**20,5±4,04**
Время растворения пленки (сек)	**64,67**	**5,391**	**8,337**	**5,680**	**64,67±5,68**

5.3. Методики качественного и количественного определения сапонинов стиракса в пленке:

5.3.1. Определение подлинности ВСПЭС

Для подтверждения присутствия ССС возможно использование ранее применявшихся методик для околоплодников стиракса лекарственного и СЭСЛ с помощью ТСХ и УФ-спектрофотометрии.

Вне зависимости от состава ВВ пленок, извлечения суммы БАВ из препаратов с метанолом имеют идентичные результаты.

Подготовка образца пленки, для качественного определения используют одну пленку (масса одной пленки размером 5×5 см примерно равна 0,22 ± 0,02 г), содержит 25 мг (точная навеска) СЭСЛ (с количественным содержанием 7,075 мг сапонинов стиракса А, В и С), испытуемый образец выдерживают в растворе метанола (15 мл) в течении 1 часа, после чего разрезают ножницами на мелкие кусочки. Затем интенсивно встряхивают на вортексе в течение 5 минут.

В результате исследования установлено, что пленка не растворима в метаноле, в ходе испытаний образец приобрел твердость, также зафиксировано изменение окраски – пленка приобрела белое окрашивание. Промывку пленки метанолом повторяют 3 раза. Затем нами был отобран раствор метанола в колбе и испаряют метанол на роторном испарителе.

ТСХ – на хроматограмме в системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1) испытуемого раствора (извлечение из ЛФ) наблюдаются зоны адсорбции на уровне зон адсорбции образцов сапонинов из СЭСЛ с Rf около 0,68 (Рис. 5.3.).

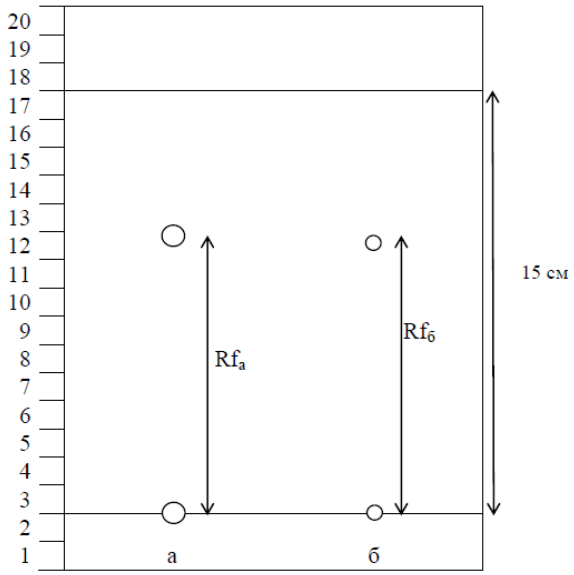


Рисунок 5.3. Хроматограмма растворов сапонинов из; а – СЭСЛ, б – раствора извлечения из ВСПЭС с метанолом в системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1), (УФ-свет, 245 нм/ детектор- раствор взвеси дефибринированной крови).

УФ-спектрофотомерия – В качестве критериев подлинности выбраны характерные максимумы поглощения при длинах волн 270 ± 1 нм и 315 ± 1 нм, представленные на рисунке 5.4.

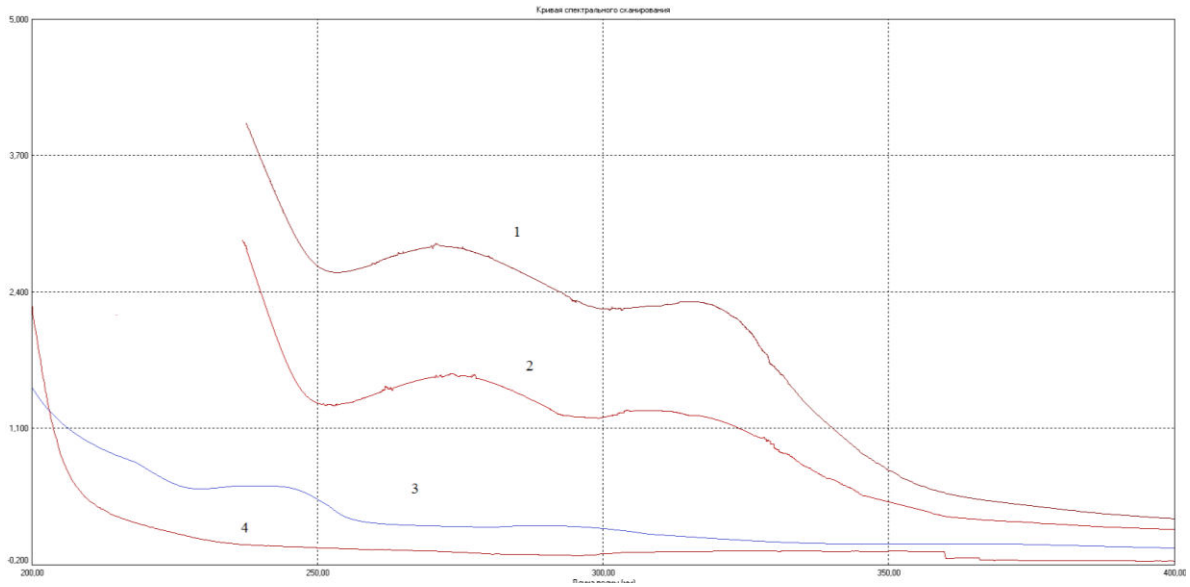


Рисунок 5.4. УФ-кривые спектрального сканирования растворов сапонинов стиракса лекарственного (1- из СЭСЛ; 2- из ВСПЭС; 3-из основы пленок; 4-метанола).

УФ-спектр поглощения раствора СЭСЛ и раствора ВСПЭС имеют максимумы поглощения при длине волн 270 ± 1 нм и 315 ± 1 нм. Измерения проводились в области от 200 до 400 нм.

5.3.2. Методика количественного определения ССС в ВСПЭС

Для количественного определения ССС в пленке была разработана и валидирована методика ЯМР ^{1}H. Пробоподготовка образца пленки для количественного определения проведена в соответствии с п. 5.3.1.

Методика – После полного испарения метанола на роторном испарителе, к содержимому колбы добавляют 1 мл DMSO-d_6, встряхивают в течение 1 минуты, центрифугируют в течение 5 минут при 14000 об/мин. Раствор переносят в стандартную ампулу для ЯМР d=5 мм. Регистрируют спектр ЯМР ^{1}H при следующих условиях: 90º импульс, смещение 5 м.д., развертка 15 м.д., 32 К точек на спектр, 32 повторения, задержка между импульсами 40 с.

В результате анализа установлено, что пленка содержит 5,6 мг суммы А и С сапонина (сигналы в области 5.70-5.8 м.д и 5.41 м.д.) и 1,2 мг В сапонина (сигнал при 5.94 м.д.), что эквивалентно 96,0% от содержания сапонинов в пленке. Спектр ЯМР ^{1}H сапонинов стиракса из пленки представлен на рисунке 5.5.

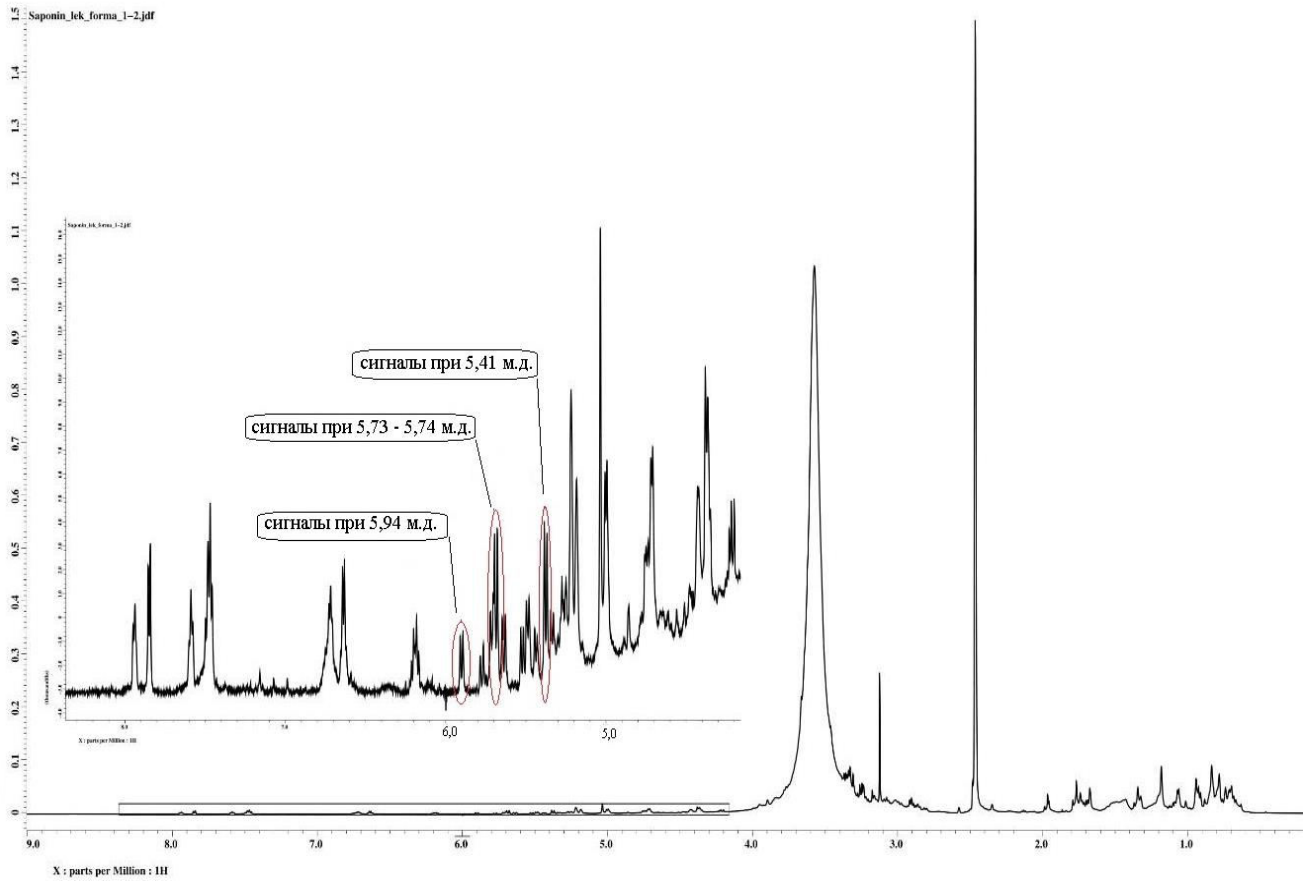


Рисунок 5.5. Спектр ЯМР ^{1}H сапонинов стиракса из пленки

- **Валидация методики количественного определения сапонинов стиракса в пленке – ЯМР ^{1}H**

Для подтверждения пригодности данной методики для количественного определения сапонинов стиракса в пленке, была проведена ее валидация. Проводя валидацию разработанной методики, мы экспериментально доказываем, что методика количественного определения сапонинов стиракса в пленке с помощью ЯМР ^{1}H пригодна и соответствует заложенным критериям приемлемости: сходимость, точность, воспроизводимость. Приготовление испытуемых образцов и определение количественного содержания ИДН в них проводили по описанной выше методике количественного определения.

- **Специфичность (Specificity)**

Способность методики однозначно определять действующие вещества (сапонины стиракса) в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце (пленка).

Критерии приемлемости и их оценки:

1- Примесные соединения:

а- Должны отсутствовать пики, которые мешают определению анализируемых веществ. *Оценка критерия*: На хроматограмме – ЯМР ^{1}H суммы сапонинов стиракса нет никаких сигналов, мешающих определению сигналов сапонинов стиракса A, B, C.

б- На хроматограмме образца сапонинов не должно быть пиков, которые принадлежат растворителю и имеют такое же время удерживания. *Оценка критерия:* Критерий был достигнут при использовании метанола для экстракции сапонинов из пленки, где матрица пленки не растворима в метаноле и затем использовании DMSO-d_6 в качестве растворителя для подготовки образца для ЯМР ^{1}H.

2- Содержание основных веществ:

Интенсивность сигналов спектра ЯМР ^{1}H испытуемого образца, должна соответствовать интенсивности сигналов стандартного спектра ЯМР ^{1}H.

Оценка критерия: На хроматограмме образца сапонинов, сигналы в области 5,41-5,74 м.д. и при 5,73 м.д. соответствуют сапонинам стиракса 1(A) и 3 (C). Сигналы при 5,94 м.д. соответствуют сапонинам стиракса 2 (B).

Условия регистрации спектра ЯМР ^{1}H стандартного образца (Y. Yayla et al. / Fitoterapia 73 (2002) 320-326) были такими же, как и для испытуемых образцов (^{1}H ЯМР, 500 MHz и 125 MHz, DMSO-d_6).

- **Сходимость/повторяемость**

Критерий сходимости характеризует прецизионность методики при ее выполнении в одних и тех же условиях и одним и тем же аналитиком в течение небольшого промежутка времени. В течение одного дня, один лаборант-исследователь проводил 5 измерений количественного содержания сапонинов в пленке для одного и того же образца с помощью ЯМР-^{1}H.

Критерии приемлемости и их оценки

Относительное стандартное отклонение ($S_{r\%}$) при оценке сходимости полученных результатов определения содержания сапонинов стиракса в пленке должно быть ≤ 5 % (α=0,05).

Результаты определения количественного содержания сапонинов стиракса в пленке 5×5 см^2, массой 0,22 ± 0,02 г. и их статистической обработки представлены в таблице 5.10.

Таблица 5.10. – Математическая обработка результатов измерений и испытания сходимости методики

Показатели		№ образца x_i				
		1	2	3	4	5
Массовое содержание сапонинов стиракса в пленке,	мг	6,8	6,6	6,94	6,92	6,85
	%	3,09	3,00	3,15	3,15	3,11
$\bar{x}$ -среднее массовое содержание сапонинов стиракса в пленке, мг	мг	6,82				
	%	3,1				
Стандартное отклонение S	мг	0,14				
	%	0,06				
Относительное стандартное отклонение S_r%		1,94				
Приемлемость результатов		$S_{r\%} \leq 5$ → удовлетворяет требованиям				

- **Точность**

Методика количественного определения сапонинов в пленке должна обеспечивать требуемую точность оценки показателей. Для определения точности методики готовили 5 параллельных образцов и проводили количественное определение сапонинов в 5 пленках на ЯМР- ^{1}H.

Критерии приемлемости и их оценки

Относительное стандартное отклонение ($S_{r\%}$) при оценке точности содержания сапонинов стиракса в пленке должно быть ≤ 5 % (α=0,05).

Результаты определения количественного содержания сапонинов стиракса в 5 параллельных образцах (5 пленок) и их статистической обработки представлены в таблице 5.11.

Таблица 5.11. – Математическая обработка результатов измерений и испытания точности методики

Показатели		№ образца x_i				
		1	2	3	4	5
Массовое содержание сапонинов стиракса в пленке,	мг	7,01	6,79	6,63	6,84	6,88
	%	3,19	3,09	3,11	3,11	3,13
$\bar{x}$ -среднее массовое содержание сапонинов стиракса в пленке, мг	мг	6,83				
	%	3,12				
Стандартное отклонение S	мг	0,14				
	%	0,04				
Относительное стандартное отклонение S_r%		1,21				
Приемлемость результатов		$S_{r\%} \leq 5$ → удовлетворяет требованиям				

- **Воспроизводимость**

Для определения воспроизводимости методики проводили анализ количественного определения сапонинов стиракса из одного и того же образца на двух разных ЯМР-спектрометрах, «Jeol JNM-ECA 600» и «Jeol JNM-ECS 400».

Критерии приемлемости и их оценки

Относительное стандартное отклонение ($S_{r\%}$) при оценке воспроизводимости полученных результатов определения содержания сапонинов стиракса в пленке должно быть ≤ 5 % (α=0,05).

Результаты определения количественного содержания сапонинов стиракса на двух разных ЯМР-спектрометрах и их статистической обработки представлены в таблице 5.12.

Таблица 5.12. – Математическая обработка результатов измерений и испытания воспроизводимости методики

ЯМР-спектрометр		Jeol JNM -ECA 600	Jeol JNM -ECS 400
Массовое содержание сапонинов стиракса в пленке,	мг	6,8	6,4
	%	3,09	2,91
$\bar{x}$ -среднее массовое содержание сапонинов стиракса в сухом экстракте, %	мг	6,6	
	%	3,00	
Стандартное отклонение S	мг	0,28	
	%	0,13	
Относительное стандартное отклонение $S_{r\%}$		4,29	
Приемлемость результатов		$S_{r\%} \leq 5$ → удовлетворяет требованиям	

Вышеуказанные тесты подтверждают достоверность данной методики для количественного определения сапонинов в пленке с помощью ЯМР-^{1}Н.

5.4. Анализ однородности содержания / дозирования:

Согласно ГФ XIII изд. ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования» испытание на однородность дозирования выполняли согласно методике 1, так как масса действующего вещества составляет 25 мг и его массовая доля - 1,1 %. Количественное определение содержания действующего вещества проводили по отдельности в каждой отобранной для испытания единице препарата или в части препарата (прямое определение содержания действующего вещества).

Подготовка проб проводилась, как описано выше, но для анализа использована половина пленки с содержанием 25 мг сухого экстракта (около 7,075 мг суммы сапонина/ пленка и около 3,54 в каждом половине).

В результате проведенного анализа установлено, что половина пленки содержит 2,9 мг суммы (A) и (C) сапонина и 0,8 мг (B) сапонина, что эквивалентно 3,7 мг ~ 104,5 % содержанию сапонинов в половине пленки. Спектр ЯМР ^{1}H сапонинов стиракса в пленке представлен на рисунке 5.6.

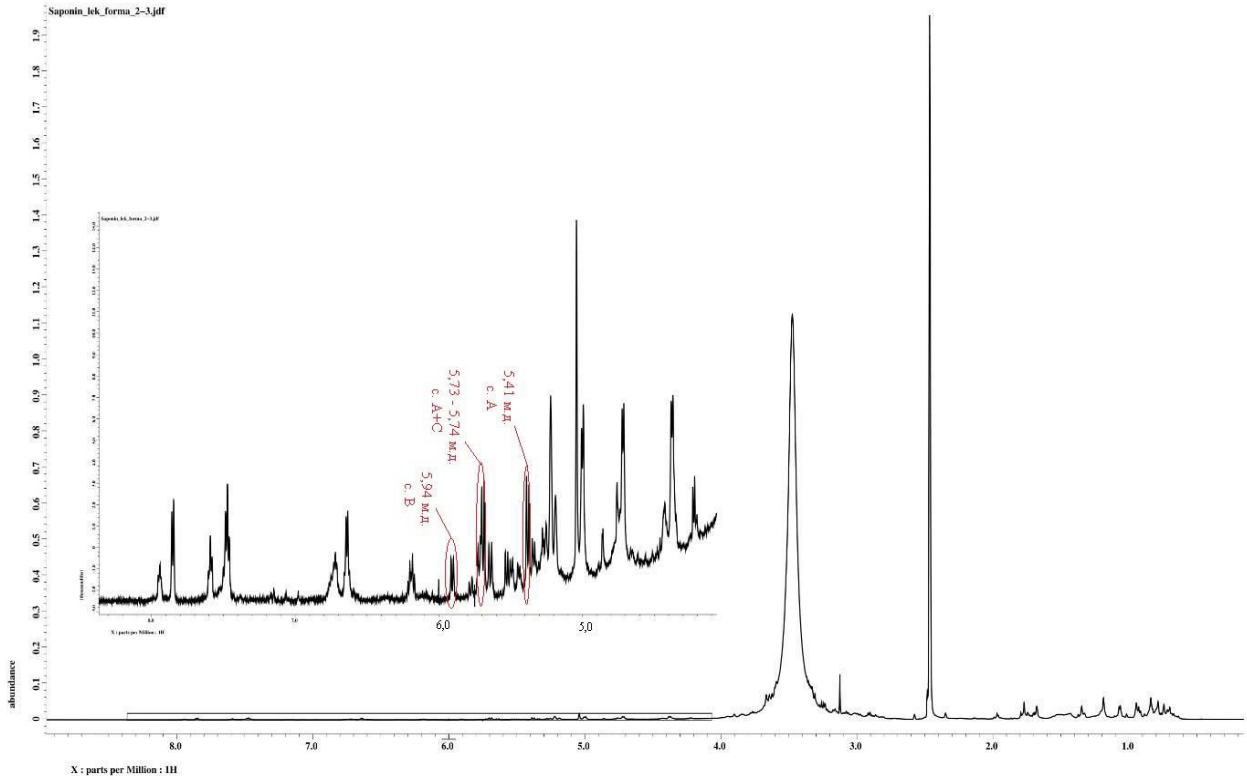


Рисунок 5.6. Спектр ЯМР ^{1}H сапонинов стиракса из половины пленки

Результаты испытания 10 случайных образцов представлены в таблице 5.13.

Таблица 5.13. – Результаты анализа однородности содержания в половине пленке (n=10, p=95%) ($t_{0,95,\ 9}$ = 2,262).

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
содержание БАВ в ½ пленке %	89,2	89,4	104,5	95,1	93,6	88,6	92,7	88,3	91,5	95,4
	$\bar{x}$		S		S_r %		Δ		$\bar{x} \pm \Delta$	
	92,83		4,87		5,25		3.49		92,83±3,49	

Таким образом, результаты, представленные в таблице 5.13., свидетельствуют о соответствии однородности содержания БАВ в пленке.

Согласно ГФ XIII - ОФС. 1.4.2.0009.15 "**испытание однородности массы дозированных лекарственных форм"** не применяют в случае, когда проводят испытание на однородность дозирования.

5.5. Микробиологическое исследование ВСПЭС

Исследование микробиологической чистоты проведено согласно требованиям ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» категории 2 (см. 2.2.9.). Результаты исследования представлены в таблице 5.14 .

Таблица 5.14 . – Результаты изучения микробиологической чистоты ВСПЭС

Название микроорганизмов	**Рекомендуемые (нормы) ГФ XIII в 1 пленке**	**Результаты испытаний: наличие и количество микроорганизмов в 1 пленке**
суммарно КМАФАнМ, грибки, дрожжи, плесень	Не более 100 КОЕ	Менее 10 КОЕ
Salmonella / Listeria monocytogenes	Отсутствуют	Отсутствуют
Staphylococcaceae	Отсутствуют	Отсутствуют
Listeria monocytogenes	Отсутствуют	Отсутствуют
E. coli	Отсутствуют	Отсутствуют

Как видно из результатов, представленных в таблице 6.14, ВСПЭС соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIII, ОФС 1.2.4.0002.15. Такие же результаты исследования микробиологической чистоты получены и при хранении приготовленных ЛФ через 0, 6, 12, 18 и 24 мес.

5.6. Установление срока годности - исследования стабильности:

В соответствии с Международным советом по гармонизации (МСГ) (International Council for Harmonisation: ICH): Стабильность пленочных продуктов оценивают в течение 24 месяцев в условиях окружающей среды или промежуточных условий (при температуре 25±5°C и влажности 60±2%).

На каждой контрольной точке (после 6, 12, 18, 24 месяцев) были проверены цвет, запах, внешний вид, подлинность, pH, количественное содержание суммы

БАВ, микробиологическая чистота и масса содержимого упаковки.

Для установления срока годности пленки в упаковке (буфлен), исследовалась стабильность в процессе хранения. Стабильность определялась по показателями качества, установленным ранее и предложенным в проект НД на ВСПЭС - (приложение № 6). Результаты изучения стабильности при хранении представлены в таблице 5.15.

Таблица 5.15. – Результаты изучения стабильности ВСПЭС при хранении в буфлене при температуре 25±5°С и влажности 60±2%.

Показатели качества	**Серия**	**Метод и норма**	**Сроки хранения, мес**				
			0	**6**	**12**	**18**	**24**
Описание	01-06 15	Пленка желтоватого цвета, размером 5×5 см, толщина – около 200 мкм, с гладкой поверхностью, без воздушных включений, прозрачная, складывается, не липкая, без запаха.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	02-06 15		соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	03-06 15		соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Подлинность	01-06 15	**4) УФ:** Наличие характерных максимумов поглощения при 270±1 нм и 315±1 нм. **5) ТСХ** в системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1) (УФ-свет, 245 нм/ детектор-раствор взвеси дефибринированной крови). На хроматограмме обнаруживаются зоны адсорбции белого цвета с Rf около (0,68) (сапонины). **6) ЯМР ^{1}Н** спектр**.**	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	02-06 15		соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
	03-06 15		соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Содержание сапонинов	01-06 15	**ЯМР ^{1}Н** От 6,0 мг до 7,5 мг (2,7% - 3,4%)	7,1	7,0	7,1	6,9	7,0
	02-06 15		6,9	6,5	6,9	7,0	6,8
	03-06 15		6,8	6,9	6,6	6,8	6,4

Масса одной пленки 25см^2 при хранении, г	01-06 15	0,22 ±0,03		0,23	0,23	0,23	0,23	0,22
	02-06 15			0,20	0,21	0,21	0,20	0,20
	03-06 15			0,22	0,22	0,23	0,21	0,20
Содержание влаги %	01-06 15	14,5±1,36		13,3	13,5	13,2	14,1	13,6
	02-06 15			16,5	17,1	17,3	15,9	17,4
	03-06 15			14,8	14,4	14,1	14,7	16,2
Микробиологическая чистота	01-06 15 02-06 15 03-06 15	СуммарноКМАФАнМ, грибки, дрожжи, плесень	Не более 100 КОЕ	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
		Salmonella / Listeria monocytogenes	отсутствуют	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.
		Staphylococcaceae	отсутствуют	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.
		Listeria monocytogenes	отсутствуют	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.
		E.coli	отсутствуют	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.	отсут.
pH в 20мл раствора уксусной кислоты (pH 3,5)	01-06 15	от 4,1 до 4,8		4,6	4,6	4,5	4,6	4,5
	02-06 15			4,3	4,3	4,3	4,3	4,2
	03-06 15			4,5	4,5	4,5	4,3	4,3
Время растворения, сек	010615	От 60 до 120		80	81	79	78	79
	020615			84	83	85	85	84
	030615			75	70	73	80	74

Как видно, из представленных данных в таблице 5.15., разработанные ВСПЭС соответствуют установленным требованиям по всем исследованным показателям качества, что свидетельствует о их стабильности при хранении в

условиях комнатной температуры в упаковке из буфлена и позволяет уставить срок годности в течение 24 месяцев. Мы продолжаем исследование стабильности для возможности увеличения срока хранения до 3-х лет.

5.7. Изучение контрацептивного действия ВСПЭС на основе СЭСЛ в опыте *in vivo*

Комплекс проведенных исследований по разработке вагинальных спермицидных пленок на основе сапонинов стиракса лекарственного и оценке биологической активности *in silico*, *in vitro* предполагается завершить оценкой контрацептивного действия *in vivo*.

Для поведения эксперимента на лабораторных животных – крысах, для удобства введения была приготовлена ЛФ с СЭСЛ – гель, соответствует разработанным ВСПЭС (полупродукт Т.П. 4, Рис. 5.1.).

Проведено исследование контрацептивного действия и биологической безвредности по методикам, подробно изложенным в гл.2, п 2.2.7.3. (А, Б). Отчет исследования приведен в приложении № 2.

В результате исследования спермицидной активности *in vitro* ранее было установлено, что эффективность сапонинов стиракса проявляется уже в концентрации 0,5%, вызывая мгновенную гибель сперматозоидов при полном отсутствии подвижных.

СЭСЛ вводили в состав аппликационного геля 15 %, который легко смешивается с вагинальным секретом и просто вводится крысами.

В результате изучения установлено (см. таблицу 5.16.), что изученные образцы (гель 1,5% СЭСЛ) обладают контрацептивным эффектом, сопоставимым с действием зарубежного контрацептивного препарата «Фарматекс, крем вагинальный» (Франция).

Таблица 5.16. – Контрацептивное действие геля СЭСЛ 1,5 % при вагинальном введении крысам

Группа	Количество самок в в группе, шт.			Эффективность контрацептивного действия,%
	Всего	Забеременевших	Небеременных	
1. Интактные животные (контроль I)	**5**	**5**	**-**	**-**
2. Гелевая основа (контроль II)	**5**	**4**	**1**	**20**
3. «Фарматекс®, крем вагинальный»- (препарат сравнения)	**5**	**-**	**5**	**100**
4. Гель СЭСЛ 1,5 % (опыт)	**10**	**1**	**9**	**90**

Изучение контрацептивного действия СЭСЛ *in vivo* при вагинальном введении половозрелым крысам в виде 1,5 % геля выявило 90 % эффективность. Контрацептивное действие ВСПЭС будет определяться присутствием сапонинов в СЭСЛ и их принадлежностью к классу природных ПАВ, проявляющих свою активность за счет снижения поверхностного натяжения мембраны сперматозоида и ее разрушения под воздействием сапонинов.

В результате осмотра животных, контрольной II и опытной IV групп опыта перед и после каждого нанесения аппликационной формы, не были отмечены и зарегистрированы появления экссудата, изменений внешнего вида видимых слизистых оболочек влагалища и у животных в целом, не было признаков эритем и раздражений.

Гиперемии, ссадин, эритем и раздражений выявлено не было. Макроскопических изменений не выявлено. Отсутствие микроскопических изменений подтверждено гистологическим исследованием слизистой оболочки влагалища крыс (рис.5.7.).

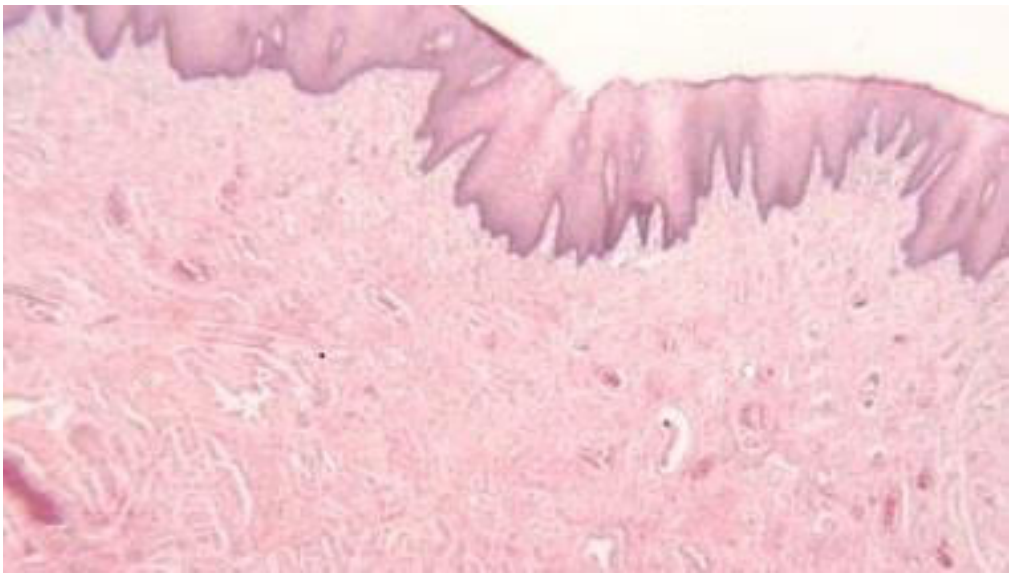


Рис.5.7. Гистосрез влагалища крысы - окрас Г.-Э.х20

Таким образом, по показателям местно-раздражающего действия можно констатировать, что препарат сухого экстракта стиракса лекарственного гель 1,5% не обладает местно-раздражающим действием.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Разработан состав биорастворимых лекарственных полимерных вагинальных пленок 25 $см^2$ с 25 мг сухого экстракта стиракса лекарственного (около 3% сапонинов стиракса) на основе ПВС, карбопола 980 и глицерина;
2. Обоснованы показатели и нормы качества препарата «Вагинальные спермицидные пленки с сапонинами стиракса», с использованием методик ЯМР, ТСХ и УФ определения подлинности и количественного содержания сапонинов стиракса А, В и С в ЛФ;
3. Проведена валидация разработанных методик качественного и количественного анализа ВСПЭС в процессе хранения в естественных условиях. Установлена стабильность разработанных пленок по всем показателям исследованным качества, что позволило установить срок годности 24 месяца в упаковке - буфлен.
4. Исследование специфической активности и биологической безвредности лекарственной формы на основе сапонинов *Styrax officinalis* L.в геле *in vivo* на лабораторных животных (крысы) показало, что 1,5% гель сухого экстракта стиракса лекарственного проявляет спермицидную активность при местном применении и не обладает местно-раздражающим действием.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основе сравнительного анализа данных литературы и результатов оценки биологической активности тритерпеноидных сапонинов *Styrax officinalis* L. *in silico* обоснована актуальность разработки местного контрацептивного средства;

2. Методами оптической и СЭ микроскопии установлены диагностические признаки в анатомическом строении нового вида сырья "Околоплодники стиракса лекарственного" и разработан проект НД на него по ряду показателей (внешние признаки, микроскопические признаки, определение основных групп биологически активных веществ, влажность, зола общая, зола не растворимая в 10% растворе HCl, измельченность, коэффициент водопоглощения, количественное определение экстрактивных веществ и суммы сапонинов);

3. Разработана новая методика получения СЭСЛ из фракции частиц сырья размером 2,5-0,25 мм за 8-10 циклов экстракции метанолом (или 70% спиртом) в аппарате Сокслета в течение 6-7 часов с выходом 35% и количественным содержанием суммы сапонинов - 27%, установленной методом ЯМР− H^1;

4. Разработаны состав ВСПЭС, содержащий 25 мг СЭСЛ на основе ПВС, карбопола 980, глицерина и технология их получения;

5. Разработана методика установления подлинности и количественного определения сапонинов стиракса лекарственного с использованием ЯМР− H^1.

6. Установлена стабильность ВСПЭС по показателям качества в течение 24 месяцев в упаковке из буфлена;

7. Установлена 99,96% фармацевтическая доступность комплекса сапонинов *in vitro*, выявлено 90% контрацептивное действие и биологическая безвредность ВСПЭС на лабораторных животных *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований дана фармакогностическая оценка сырья "околоплодники стиракса лекарственного", получен и стандартизован сухой экстракт околоплодников стиракса лекарственного и разработаны состав и технология вагинальных спермицидных пленок с сухим экстрактом стиракса лекарственного. Подтверждена спермицидная активность ВСПЭС *in vitro* и контрацептивное действие *in vivo* на лабораторных животных.

Практические рекомендации

Результаты диссертационного исследования могут быть внедрены в учебный процесс для студентов по дисциплинам «Фармацевтическая технология», «Фармацевтическая химия», «Фармакология» и «Фармакогнозия». Можно провести дополнительное изучение контрацептивного действия разработанных ВСПЭС для внедрения в качестве инновационного лекарственного средства.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В развитие научных исследований целесообразно полностью стандартизовать сырье "околоплодники стиракса лекарственного", усовершенствовать методику очистки сапонинов при получении СЭСЛ, провести полный комплекс фармацевтической разработки новых вагинальных ЛФ СЭСЛ в виде крема, геля и пены.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФС – активная фармацевтическая субстанция

БАВ – биологически-активные вещества

ВЖИ–искусственная вагинальная жидкость

ВЖС – вагинальная жидкость стимулятора

ВЛФ – вагинальные лекарственные формы

ВМС – внутриматочная спираль

ВОЗ –всемирная организация здоровья (WHO)

ВПЧ –вирус папилломы человека

ВР – вспомогательные работы

ВСПЭС – спермицидные вагинальные пленки с экстрактом околоплодников стиракса лекарственного

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ– государственный отраслевой стандарт

ГФ – государственная фармакопея

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-селективным детектором

ДМСО – Диметильсулфоксид

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

КМАФАнМ – Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

КОЕ – Колониеобразующая единица

ЛП – лекарственный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛФ – лекарственная форма

МБЧ – микробиологическая чистота

МС – масс-спектрометрия

МСГ – международный совет по гармонизации

МЦ – метилцеллюлоза

НД – нормативный документ

ОФС – общая фармакопейная статья

ОМ – оптический микроскоп

ПАВ – Поверхностно-активное вещество

ПВС – поливиниловый спирт

ПГ – пропиленгликоль

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ПМР – протонный магнитный резонанс

РАП–редкосшитые акриловые полимеры

СВ – среда высвобождения

ССС – сумма сапонинов стиракса

СО PQS– стандартный образец (Purified Quillaia Saponin)

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия (сканирующий электронный микроскоп)

СЭСЛ – сухой экстракт стиракса

ТП – Технологический процесс

ТСХ – тонкослойная хроматография.

ТЭА – триэтаноламин.

УЭЖХ-МСВР – ультра высокоэффективная эффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометром высокого разрешения

УМО – упаковка, маркировка, отгрузка

УФ - СФМ – ультрафиолетовая спектрофотометрия

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

Caspase – Cysteine-aspartic acid proteases

EP – European Pharmacopoeia / Европейская фармакопея

ICAM1 – Intercellular Adhesion Molecule 1

NF–National Formulary/ Национальный формуляр

PASS– Prediction of Activity Spectra for Substances

SAR–Structure–activity relationship

USP– Фармакопея США /United States Pharmacopeia

Список используемой литературы

1. Государственная фармакопея Российской федерации. Лекарственное растительное сырье, фармацевтические субстанции растительного происхождения: (ФС.2.5.0050.15) 13-ое издание.- том III.- выпуск 2015.- С.729.
2. Камаева, С. С. Изучение контрацептивного действия лекарственного средства на основе этония / С. Камаева,И. В. Мухина et.al. //ВестникСанкт-Петербургскогоуниверситета.- 2009.- Сер. 11.- Вып. 1.- С.168-174.
3. Карамаврова Т. В. Анализ параметров качества вагинальных суппозиториев, обладающих спермицидной и антимикробной активностью / Т. В. Карамаврова, А. С. Кухтенко // Управління якістю в фармації : матеріали VIII наук.-практ.конф. м. Харків.- 2014. – 23 трав.- С. 51-52.
4. Ладыгина, Е. Я. Химический анализ лекарственных растений: Учеб, пособие для фармацевтических вузов / Е. Я. Ладыгина, Л. Н. Сафронич, В. Э. Отряшенкова и др. Под ред. Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. [Электронный ресурс].– 1983.- Режим доступа: http://chem21.info/page/040010195188236196187150131077039115254123145184/
5. Лекарственное растительное сырье, содержащее сапонины [Электронный ресурс].– 2007-2015.- Pharm Spravka. – Режим доступа: http://pharmspravka.ru/biologicheski-aktivnyie-veschestva/saponinyi/rasprostraneniya-v-prirode.html
6. Мазнев, Н.И. Энциклопедия лекарственных растений. 3-е изд., испр. и доп. — М.: Мартин 2004.
7. Николаева И. А. Перспективы рынка анти-ВИЧ/СПИД-микробицидов в России / И. А. Николаева, Э. В. Карамов, И. Г. Сидорович // Иммунология.- 2013. – № 6.- том 34.- С.292-297.
8. Описание сапонинов, GoMedicine [Электронный ресурс].– 2017.– Режим доступа: http://www.satelin.ru/gmjs-47-3.html.

9. Тихонов, В.Н. Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты / В.Н. Тихонов, Г.И. Калинкина, Е.Н. Сальникова, С.Е. Дмитрука // Учебное пособие. Часть I. Томск, 2004.
10. Тихонов, В.Н. Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты / В.Н. Тихонов, Г.И. Калинкина, Е.Н. Сальникова, С.Е. Дмитрука // Учебное пособие. Часть II. Томск, 2004.
11. Хомик, А.С. Назначение и роль микроскопического анализа при установлении подлинности лекарственного растительного сырья / А.С. Хомик, В.В. Вандышев, Е.А. Мирошникова // Фармацевтическая промышленность.- Москва.- 2010.- №3.- С. 54-56.
12. Шишкова В. Н. Современная оральная контрацепция и риск тромбозов / В. Н. Шишкова // Журнал международной медицины.- 2013.- № 1 .- С. 56-61.
13. Abdulsalam, A. How Quality of Care in the Field of Family Planning Affects Contraception use Among Syrian Women/ A. Abdulsalam// Damascus University for Health Sciences Journal. – Vol. 25. – No. 2. – 2009. – P. 11-28.
14. Aboutalebi1, R. SaponinTerpenoids; A Brief Review of Mechanisms of Actions and Anti-cancerous Effects / R. Aboutalebi1, A. Monfared // American Chemical Science Journal.- 2016.- Vol. 12. – No. 2.- P.1-8.
15. Akbari, M. Physiological and pharmaceutical effect of fenugreek: a review / M. Akbari, et al. // IOSR Journal of Pharmacy.- 2012.- Vol. 2.- Issue 4.- P. 49-53.
16. Akil, A. Development and characterization of a vaginal film containing dapivirine, a non- nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), for prevention of HIV-1 sexual transmission/ A. Akil, M. Parniak, C. Dezzuitti, B. Moncla, M. Cost, M. Li, L. Rohan //Drug Deliv. Transl. Res.- 2011.- 1(3).- P.209–222.
17. Albertini, B. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spraycongealing for the vaginal delivery of econazole nitrate/ B. Albertini, N. Passerini, M. Sabatino, B. Vitali, P. Brigidi, L. Rodriguez // Euro J Pharm Sci.- 2009.- 36(4-5).- P. 591-601.
18. Alexander, N. Why consider vaginal drug administration? / N. Alexander, E. Baker, M. Kaptein, et.al. // Fertility and Sterility.- 2004.- Vol. 82.- №1.- P.1-12.

19. Al-Nasser, Z. Efficacy Some Insecticide and Plant Extracts for Controlling, Beet Flea Beetle, Chaetocnematibialis (Illiger) / Z. Al-Nasser, M.Y. Ibrahim // Damascus University Journal of Agricultural Sciences.- 2011.- Vol. 27.- Issue 2.- P. 107-118.
20. Al-Snafi, A. E. The Chemical Constituents and Pharmacological Effects of Bryophyllum calycinum. A review / A. E. Al-Snafi // International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR).- 2013.- Vol 4.- No.12.- P.171-176.
21. Amaral, E. Vaginal safety after use of a bioadhesive, acid-buffering, microbicidal contraceptive gel (ACIDFORM) and a 2% nonoxynol-9 product / E. Amaral, A. Perdigão, et.al. // Contraception.- 2006.- №73.- P. 542-547.
22. Amarowicz, R. Hypocholesterolemic effects of saponins / R. Amarowicz, M. K. O. Shimoyamada // RocznikiPaństwowegoZakładuHigieny.- 1994.- Vol.45 (1-2).- P.125.
23. Anil, H. 21-Benzoyl-barringtogenol C, a sapogenin from Styraxofficinalis / H. Anil // Phytochemistry.-1979.- Vol.18.- P.1760-1761.
24. Aranha, C. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies / C. Aranha, S. Gupta, R. Reddy // Contraception.- 2004.- Vol. 69.- P.333-338.
25. Arshad, B. K. Review on vaginal drug delivery/ B. K. Arshad, R. Mahamanaetal.// RGUHS J Pharm Sci.- 2014.- Vol 4.- Issue 4.
26. Asahina, Y. Arch. Pharm. / Y. Asahina, M. Momoya // Archiv Der Pharmazie.- 1914.- Vol. 56.- P. 252.
27. Attele, A. S. Commentary ginseng pharmacology multiple constituents and multiple actions / A. S. Attele, et al. // Biochemical Pharmacology.- 2000.- Vol. 58.- P.1685–1693.
28. Azila, A. K. Fruit Pod Extracts as a Source of Nutraceuticals and Pharmaceuticals / A. K. Azila, A. Azrina // Molecules.- 2012.- Vol. 17.- P. 11931-11946.
29. Balakrishnan, S. Micellar Characterisation of Saponin from *Sapindus Mukorossi* / S. Balakrishnan, S. Varughese, A. P. Deshpande // Tenside Surfactants Detergent.- 2006.- Vol.43.- №5.- P. 262-268.

30.Baloglu, E. Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems/ E. Baloglu, Z. Senyigit, S. Karavana, A. Bernkop-Schnurch // J Pharm. Sci.- 2009.- 12(3).- P.312–336.

31.Bayer, L. ACIDFORM: a review of the evidence / L. Bayer, J. Jensen // Contraception.- 2014.- Vol. 90.- №1.- P.11-8.

32.Baytop, A. Farmos6tik Botanik.- Istanbul.- 1967.- P. 213 -214.

33.Bock, B. Référentiel des trachéophytes de France métropolitaine / B. Bock, et al. // version 3.02 .- 26 janvier 2016.

34.Borrelli, F. The Plant Kingdom as a Source of Anti-ulcer Remedies / F. Borrelli, A. I. Angelo // Phytother. Res.- 2000- Vol.14.- P.581–591.

35.Bruneton, J. Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales / J. Bruneton // Lavoisier.-Paris.- 2009.

36.Brusotti, G. Antimicrobial and phytochemical properties of stem bark extracts from *Piptadeniastrum africanum* (Hook f.) Brenan / G. Brusotti, et al.// Industrial Crops and Products.- 2013.- Vol. 43.- P.612– 616.

37.Cabo-Conzalez, A. M. Edición y traducción del kitāb Al-ŷāmiʿ de Ibn al-Bayṭār / A. M. Cabo-Conzalez // BIBLID.- [1133-8571].-2011.- Vol. 18.- P. 65-96.

38.Cabrera-Orozco A. Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality / A. Cabrera-Orozco, C. Jiménez-Martínez, G.Dávila-Ortiz. [Электронный ресурс].–2016.- Режим доступа: https://www.intechopen.com/books/soybean-bio-active-compounds/soybean-non-nutritional-factors-and-their-biological-functionality .

39.Central office of Statistics - survey of the Syrian family health in the Syrian Arab Republic [Электронный ресурс]. –2011. –Режим доступа: http://www.cbssyr.sy/index-EN.htm.

40.Chaieb, I. Saponins as Insecticides: a Review/ I. Chaieb // Tunisian Journal of Plant Protection.- 2010.- Vol. 5.- No. 1.

41.Chen, J. C. Effect of *Panax notoginseng* saponins on sperm motility and progression in vitro / J. C. Chen, M.X. Xu, L.D. Chen, Y.N. Chen, T.H. Chiu // Phytomedicine.- 1998.- Vol. 5.- No.4.- P.289-292.

42.Chen, J. Composition producing adhesion through hydration. In: Adhesion in Biological Systems/ J. Chen, C. Cyr, // Manly R.S. (Ed.), Academic Press New York.- 1970.- P.163–184.

43.Chen, J. Evaluation of the Efficacy and Safety of hyaluronic acid vaginal gel to ease vaginal cryness: a multicenter, randomized, controlled, open-label, parallel group, clinical trial// J. Chen, L. Geng, X. Song, H. Li, N. Giordan, Q. Liao// J sexu Med.- June 2013.- Vol.10.- No.6.- P.1575-84.

44.Chun-Su, Y. Chemical and pharmacological studies of saponins with a focus on American ginseng / Y. Chun-Su, et al. // J Ginseng Res.- 2010.- Vol. 34.- No.3.- P. 160–167.

45.Clarke, G. Sperm immobilizing properties of lemon juice / G. Clarke, S. Mc Coombe, R. Short // Fertility and Sterility.- 2006.- Vol.85.- P.1529-1530.

46.Coleman, J. J. Characterization of plant-derived saponin natural products against Candida albicans / J. J. Coleman, I. Okoli, G. P. Tegos, E. B. Holson, F. F. Wagner, M. R. Hamblin, E. Mylonakis // ACS Chem.Biol.- 2010.- 5(3).- P.321-332.

47.Correa, M. P. Dicionario das PlantasUteis do Brasil e das Exoticas Cultivadas.-vol II.- Ministerio da Agricultura: Rio de Janeiro.- Brazil.- 1931.

48.Dande, P. R. Evaluation of saponins from *Sesbania sesban* L. for its antifertility effect in female albino rats / P. R. Dande, et al. // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.- 2014.- Vol. 3.- Issue 3.- P. 1039-1054.

49.Das-Neves, J. Current perspectives on vaginal drug delivery/ J. Das-Neves, R. Palmeira-de-Oliveira, A. Palmeira-de-Oliveira, F. Rodrigues, B. Sarmento //KhutoryanskiyV.- Ed. New Jersey.-John Wiley & Sons.

50.Das-Neves, J. Vaginal drug delivery in pharmaceutical manufacturing /J. Das-Neves, M. Amaral, M. Bahia //handbook: Production sand processes.- Hoboken, New Jersey: Wiley.- 2008.- P.809–879.

51.Davis, P. H. Flora of Turkey and The East Aegean Islands / P. H. Davis // University of Edinburg Press.- vol. 4.- 1972.

52. D'Cruz, J. AZT derivatives exhibiting spermicidal and anti-viral activity / J. D'Cruz, M. Uckun, T. Venkatachalam // United States Patent No. 20020025922.- February 28.- 2002.

53. De-Ven, H. V. Nanosuspensions of chemically modified saponins: Reduction of hemolytic side effects and potential tool in drug targeting strategy / H. V. De-Ven, L. Van Dyck, W. Weyenberg, L. Maes, A. Ludwig // J. Controlled Release.- 2010.- 148.- P. 122–123.

54. Dobaria, N. A novel itraconazole bioadhesive film for vaginal delivery: Design, optimization, and physicodynamic characterization/ N. Dobaria, A. Badhan, R. Mashru //AAPS Pharm-Sci. Tech.- 2009.- Vol.10.- No. 3.- P.951–959.

55. Dubey, R. Sperm immobilization activity of aqueous, methanolic and saponins extract of bark of Ziziphus Mauritiana / R. Dubey, K. Dubey, C. Sridhar et al.// Der Pharmacia Sinica.- 2011.- Vol.2. No. 2.- P.11-16.

56. Edson J. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa / J. Edson // Fertility and Sterility.- 2009.- Vol. 92.- No. 1.- P.131-136.

57. Egidio, M. Pharmaceutical compositions containing rifaximin for treatment of vaginal infections./ M. Egidio, R. L. Gabriele, D. Subhash, G. Massimo.// S.P.A. US 5314904 A.- May 1994.

58. Encyclopaedia Britannica. – Book of the year. – 2009, 2011, 2014.[Электронный ресурс]. –2016. –Режим доступа: https://www.britannica.com/topic/Britannica-Book-of-the-Year.

59. Ensign, L. Mucus Penetrating Nano particles for Vaginal Drug Delivery Protect Against Herpes Simplex Virus/ L. Ensign, B. Tang, Y. Wang, T. Tse, T. Hoen, R. Cone, et.al.// SciTransl Med.- 2012.- 4(138).- P.138.

60. Faour, M. Fertility Policy and Family planning in the Arab Countries/ M. Faour //Studies in Family Planning.- 1989.- Vol. 20.- No. 5.- P. 254-263.

61. Fertility patterns in the Arab region/ S. Farid //International Family Planning Perspectives.-1984.- Vol. 10.- No. 4.- P. 119-125.

62.Fournier, P. Les Quatre Flores de la France, Corse Comprise: Ge´ne´rale, Alpine, Me´diterrane´e / P. Fournier // Littorale, 2e e´d. Lechevalier.- Paris.- 1977.

63.Francis, G. The biological action of saponins in animal systems: a review / G. Francis, Z. Kerem, H. P. Makkar, K. Becker // Br. J. Nutr.- 2002.- 88(6).- P.587-605.

64.Francis, G. The biological action of saponins in animal systems: a review / G. Francis, et al. // British Journal of Nutrition.- 2002.- Vol.88.- P.587–605.

65.Fritsch, P. W. Isozyme analysis of intercontinental disjuncts within Styrax (Styracaceae): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis / P. W. Fritsch // Am. J. Bot.- 1996.- Vol. 83.- P. 342–355.

66.Fritsch, P. W. Population structuring and patterns of morphological variation in California Styrax (Styracaceae) / P. W. Fritsch // Aliso.- 1996.- Vol. 14.- P. 205–218.

67.Fritsch, P.W. Phylogeny of Styrax based on morphological characters with implications for biogeography and infrageneric classification / P.W. Fritsch // Syst. Bot.- 1999.- Vol. 24.- P. 356-378.

68.Garg, S. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets/ S. Garg, D. Goldman, M. Krumme, L. Rohan, S. Smoot, D. Friend// Antiviral Res. Suppl..- 2010.-1.-P.19–29.

69.Garg, S. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets/ S. Garg, D. Goldman, M. Krumme, L. Rohan, S. Smoot, D. Friend.// Antiviral Res 88Suppl.- 2010.- 1.- P.19–29.

70.Garg, S. Development and characterization of bioadhesive vaginal films of sodium polystyrene sulfonate (PSS), a novel contraceptive antimicrobial agent/ S. Garg, K. Vermani, A. Garg, R. Anderson, W. Rencher, L. Zaneveld// Pharm. Res.- 2005.- 22(4).- P.584–595.

71.Ghosal, K. A novel vaginal drug delivery system: anti-HIV bioadhesive film containing abacavir/ K. Ghosal, A. Ranjan, B. Bhowmik// Jour Mater Sci.- 2014.- 25(7).- P.1679-89.

72.Girijashankar, V. Micropropagation of multipurpose medicinal tree Acacia auriculiformis / V. Girijashankar // Journal of Medicinal Plants Research.- 2011.- Vol.5.- No. 3.- P.462-466.

*73.*Gossypol and Derivatives [electronic resource] // GPE Discussion paper series.- Режим доступа: *http://www.timtec.net/gossypol-and-derivatives.html*. (дата обращения 15, 9, 2016).

74.Ham, A. Vaginal film drug delivery of the pyrimidinedioneIQP-0528 for the prevention of HIV infection/ A. Ham, L. Rohan, A. Boczar, L. Yang, R. Buckheit// Jr. Pharm. Res.29.- 2012.- vol.7.- P.1897–1907.

75.Harwood, H. J. Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin Ptigogen in cellobioside / H. J. Harwood, et al. // Journal of Lipid Research.- 1993.- Vol.34.- P.377-395.

76.Hassan, S.M. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal / S.M. Hassan, et al. // Food Chemistry.- 2010.- Vol.119.- P.600–605.

77.Hocking, G. M. A dictionary of terms in pharmacognosy / G. M. Hocking // Charles Thomas Publ. Co., U.S.A.- 1955.- P. 219.

78.Hostettmann, K. Saponins / K. Hostettmann, A. Marston // Cambridge University Press.- 2005.

79.Howse, K. Contraceptive methods used by younger women/ K. Howse //Arab World Population Horizons Factsheet.- 2014.- No.10.

80.Ibrahim, D. Medical Uses of Forest Types In Al Ghab / D. Ibrahim et al. // Book.- Syria.- 2011.

81.Ikan, R. Naturally Occurring Glycosides / R. Ikan //John Wiley and Sons Ltd.- 1999.- P.304–305.

82.Jain, A. Novel Trichomonacidal Spermicides / A. Jain, N. Lal et.al. // Antimicrobial agents and chemotherapy.- 2011.- Vol. 55.- № 9.- P.4343-4351.

83.Jitian, Y., Huiming, G. 2008.- Patent CN101199555.

84.Kayacik, H. Forest and park agents- Istanbul.- 1966.- P. 198-200.

85.Kousa, L. Ethical issues regarding reproductive freedom in Syria/ L. Kousa// Revista Român de Bioetic.- 2007.- vol. 5.- P. 51-61.

86.Lee, S. J. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin / S. J. Lee, et al. // Cancer letter.- 1999.- Vol.144.- P.39-43.

87.Leon, T., Gable, P. 2004.- Patent WO2004103232.

88.Li, C. Evaluation of a mucoadhesive buccal patch for delivery of peptides: in vitro screening of bioadhesion/ C. Li, P. Bhatt, T. Johnston// Drug Dev. Ind. Pharm.- 1998.- 24.- P.919–926.

89.Lieutaghi, P. The Book Of Trees, Shrubs And Shrubs. Haute Provence. In: Le Livre Des Arbres, Arbustes et Arbrisseaux.- vol. I.- Morel.- 1969.

90.Liu, J. Benzofurans from Styrax agrestisas Acetyl cholinesterase Inhibitors: Structure Activity Relationships and Molecular Modeling Studies / J. Liu, V. Dumontet, A. L. Simonin // Journal of Natural Products.- 2011.- Vol. 74.- P. 2081-2088.

91.Liu, W.K. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line / W.K. Liu, et al. // Life Sciences.- 20000- Vol. 67.- P.1297-1306.

92.Liu, X., Kresevic, J. 2009.- Patent US2009099149.

93.Machado, R. Vaginal Films for Drug Delivery/ R. Machado, A. Palmeira-De-Oliveira, J. Martinez-De-Oliveira et al.// Journal of Pharmaceutical Sciences.- 2013.- Vol. 102.- P.2069–2081.

94.Mcconville, C. Preformulation and development of a once-daily sustained-release tenofovir vaginal tablet containing a single excipient/ C. Mcconville, D. Friend, M. Clark, K. Malcolm// J Pharm Sci.- June 2013.- 6(102).- P. 1859-68.

95.Mishell, D. Contraception by means of a silastic vaginal ring impregnated with medroxyprogesterone acetate/ D. Mishell, M. Talas, A. Parlow, D. Moyer// Amer J Obst And Gyne.- 1970.- 107(1).- P.100-3.

96.Mohammed, A. Scanning and classification of forest trees in Palestine / A. Mohammed, A. Bahgat et al. // The Arab Organization for Agricultural Development.- 2007.

97. Mohd, Jameel. Pharmacological scientific evidence for the promis of Tribulusterrestris / J. Mohd, et al. // IRJP.- 2012.- Vol.3.- No. 5.

98. Mortazavi, S. An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion/ S. Mortazavi, J. Smart// J. Control. Release.- 1993.- 25.- P.197–203.

99. NassiriAsl, M. Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza sp. and its Bioactive Compounds / M. NassiriAsl, H. Hosseinzadeh // Phytother. Res.- 2008.- Vol. 22.- P.709–724.

100. Nemat, Z. Y. Pharmacological activities of saponin-containing fraction derived from Gleditsiacaspica Desf. methanolic fruit extract / Z. Y. Nemat, et al. // Der Pharmacia Lettre.- 2013.- Vol. 5.- No. 2- P.247-253.

101. Nielsen, J. K. Resistance in the plant, Barbarea vulgaris, and counter-adaptations in flea beetles mediated by saponins / J. K. Nielsen, T. Nagao, H. Okabe, T. Shinoda // J. Chem.Ecol.- 2010.- 36(3).- P. 277-285.

102. Okunade, A. L. Natural antimycobacterial metabolites: current status / A. L. Okunade, M. P. Elvin-Lewis, W. H. Lewis // Phytochemistry.- 2004.- 65(8).- P.1017-32.

103. Pakrashi, A. Sperm immobilizing effect of triterpene saponins from *Acacia auriculiformis* / A. Pakrashi, H. Ray, B.C. Pal, S. B. Mahato // Contraception.- 1991.- Vol. 430- No. 5.- P. 475.

104. Papadopoulou, K. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants / K. Papadopoulou, R. E. Melton, M. Leggett, M. J. Danielsand, A. E. Osbourn // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A..- 1999.- vol.96.- № 22.- P.12923-12928.

105. Paul, S.In vitro determination of the contraceptive spermicidal activity of essential oil of *Trachyspermum ammi (L.)* Sprague ex Turrill fruits / S. Paul, S. Chul Kang // New Biotechnology.-2011.- Vol. 28.- Issue 6.- P.684–690.

106. Pauletti, P. M. The Styracaceae / P. M. Pauletti, H. L. Teles, D. H. Silva, Â. R. Araújo, V. S. Bolzani // Rev. bras. farmacogn.-João Pessoa.- 2006.- vol.16.- No.4.

107. Pazar, E. Chemical composition of the endocarps of fruits of *Styrax officinalis* L. / E. Pazar, Y. Akgul // Natural Product Research.- 2015.- Vol. 29.- Issue 15.- P. 1466-1468.

108. Pazar, E. Chemical Investigations of *Styrax officinalis* L. Fruits Endocarp / E. Pazar, Y. Akgül // OP-EN-039.- 2011.- P. 163-164.

109. Peh, K. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: Swelling, mechanical, and bioadhesive properties/ K. Peh, C. Wong// J. Pharm. Pharmaceut. Sci.- 1999.- 2.- P.53–61.

110. Polunin, O. Flowers of the Mediterranean / O. Polunin, A. Huxley // London.- 1965- P. 143-144.

111. Proestos, C. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity / C. Proestos, I. S. Boziaris et al. // Food Chemistry.- 2006.- Vol. 95.- P. 664–671.

112. Rajasekaran, M. Spermicidal activity of an antifungal saponin obtained from the tropical *Berbmollugo pentaphylla* / M. Rajasekaran, A.G.R. Nair, et al. // Contraception.- 1993.- Vol.47.- P.401-412.

113. Rao, A. Dietary saponins and human health. Saponins in Food / A. V. Rao, D. M. Gurfinkel // Feedstuffs and Medicinal Plants: Kluwer Academic Publishers.-2000.- P.291.

114. Reid, G. Influence of three-day antimicrobial therapy and Lactobacillus vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections/ G. Reid, A. W. Bruce, M. Taylor// Clin Thera.- 1992.- 14(1).P. 11-6.

115. Roth, A. C. Intermittent prophylactic treatment of vaginal tablet/ A. C. Roth, I. Milsom, L. Forssman, P. Wahlen// Genitourin Med.- Oct 1990.- 66(5).- P.357-60.

116. Roumen, F. Efficacy, tolerability and acceptability of a novel contraceptive vaginal ring releasing etonogestrel and ethinyloestradiol/ F. Roumen, D. Apter, T. Mulders, T. Dieben// Hum Repro.- 2001.- 16(3).- P.469-75.

117. Saha P. Evaluation of Spermicidal Activity of Mi-Saponin A / P. Saha, S. Majumdar, et.al. // Reproductive Sciences.- 2010.- Vol. 17.- № 5.- P.454-464.

118. Samuelsson, G. Drugs of Natural Origin. A Textbook of Pharmacognosy. 5th Edition. / G. Samuelsson // Swedish Pharm. Press.- 2004.- P.354–359.

119. Segal, R. A new benzofuran from the seeds of *Styrax officinalis* / R. Segal, I. Milo-Goldzweig, S. Sokoloff, D. V. Zitscek // J. Chem. Soc.- C 45.- 1967.- P. 2402-2404.

120. Segal, R. A new type of saponin from *Styrax officinalis* L. / R. Segal, H. Govrin, et al. // Tetrahedron Letters.- 1964.- No.10.- P. 527-530.

121. Segal, R. Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and sapogenins / R. Segal, M. Mansour, D. V. Zaitschek // Biochem. Pharmacol.- 1966.- Vol.15.- P. 1411-1416.

122. Shah, H. C. Spermicidal agents / H. C. Shah, K. K. Singh // Drug Discovery Ther.- 2008.- vol. 2.- №4.- P.200-210.

123. Shufeng, Z. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites / Z. Shufeng // Medicines.- 2015.- Vol.2.- P.251-286.

124. Soetan, K. O. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of Sorghum Bicolor L / K. O. Soetan, et al.,// African Journal of Biotechnology.- Moench.- 2006.- Vol.5.- No.23.- P.2405-2407.

125. Soni, P. K.Antifertility activities of traditional medicinal plants in male with emphasis on their mode of action: a review / P. K. Soni, G. Luhadia, et al. // Journal of Global Biosciences.- 2015.- Vol. 4.- P.1165-1179.

126. Srivastava, S. Bacopamonniera -a Future Perspective / S. Srivastava et al. // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research.- 2009.- Vol. 1.- No.3.- P. 154-157.

127. Staab, R. 2009.- Patent US20090098188.

128. Stanimirova, R.Surface rheology of saponin adsorption layers / R. Stanimirova, K. Marinova, S. Tcholakova, N. D. Denkov, S. Stoyanov, E. Pelan // Langmuir.- 2011.- 27(20).- P.12486-12498.

129. State Planning Commission of the Syrian Arab Republic (2006), the Tenth Five-Year Plan [Электронный ресурс]. –2006. –Режим доступа: https://www.unido.org/sites/default/files/2010-01/syrian_e-book_0.PDF

130. *Styrax officinalis* L.-eFlore, la flore électronique de Tela Botanica.–2016. BDTFX v.3.02.

131. Suhagia, B. N. *Sapindus mukorossi* (areetha): an overview / B.N. Suhagia, I. S. Rathod // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.- 2011.- Vol. 2.- № 8.- P.1905-1913.

132. Sung, M. K . Effect of soybean saponins and gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture / M. K. Sung, C. W. Kendall, A. V. Rao // Food and Chemical Toxicology.- 1995 Vol.33.- No.5.- P.357-366.

133. Tabbaa, M. The Relation Between the Obstacles of Contraception Usage and Unsafe Abortion in Syria/ M .Tabbaa //Damascus University for Health Sciences Journal.- 2010.- Vol. 26.- No. 2.- P. 61-73.

134. Tanaka, O. Application of saponins in foods and cosmetics: saponins of Mohave yucca and *Sapindus mukurossi* / O. Tanaka, Y. Tamura, H. Masuda, K. Mizutani // Adv. Exp. Med. Biol.- 1996.- 405.- P.1-11.

135. Tayoub, G. Composition of volatile oils of Styrax (*Styrax officinalis* L.) leaves at different phenological stages / G. Tayoub, I. Schwob, et al. // Biochemical Systematics and Ecology.- 2006.- Vol. 34.- P.705-709.

136. Tayoub, G. Essential oil composition of leaf, flower and stem of Styrax (*Styrax officinalis* L.) from south-eastern France / G. Tayoub, I. Schwob et al. // Flavour Fragr. J.- 2006.- Vol. 21.- P. 809–812.

137. Teuscher, E. Gifte, Biologie, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie, 3rd ed./ E. Teuscher, E. Lindequist, U. Biogene // Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.- Stuttgart.- Germany.- 2010.

138. The wild flowers [Электронный ресурс].– 2016.- Режим доступа :http://www.wildflowers.co.il/english/plant.asp?ID=488.

139. The World Bank Group [Электронный ресурс]. –2016. –Режим доступа: http://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.CBRT.IN?end=2014&start=1960

140. The World Bank Group [Электронный ресурс]. –2016. –Режим доступа: http://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.CBRT.IN?end=2014&locations=SY&start=1960&view=chart

141. Tian, F. A New Sulfated Saponin from Sea Cucumber, Exhibits Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activities In Vitro and In Vivo/ F. Tian, et al.// Cancer Biology & Therapy.- 2005.- Vol. 4.- No. 8.- P.874-882.

142. Ulubelen, A. Preliminary investigations on the herb of *Styrax officinalis* part I / A. Ulubelen, N. Goren // Faculty of Pharmacy.- University of Istanbul.- Turkey.- Bd. 24.- Heft 3.

143. Umme, H. Preparation and Optimization of Curcumin-Hydroxy Propyl Cyclodextrin Bioadhesive Vaginal Films for Human Papilloma Virus-Induced Cervical Cancer/ H. Umme, H. Shivakumar, A. Heena, P. Younus// J Biom Tiss Engn.- 2014.- 4(10).- P. 796-803.

144. Upadhyay, A. Pharmacological effects of *Sapindus mukorossi* Rev./ A. Upadhyay, D.K. Singh // Inst. Med. Trop. Sao Paulo.- 2012.- Vol.54.- No.5.- P.273-80.

145. Van Dyck, S. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish / S. Van Dyck, G. Caulier, M. Todesco, P. Gerbaux, I. Fournier, M. Wisztorski, P. Flammang // J. Exp. Biol.- 2011.- 214(8).- P.1347-1356.

146. Varda, Y. Preliminary Studies on the Styrax Oil / Y. Vardar, S. Oflas // Qual. Plant.-Veg. XXII.- 1973.- Vol. 2.- P. 145-148.

147. Vardar, Y. Preliminary studies on the styrax oil / Y. Vardar, S. Oflas. // Qual. Plant. Mater. Veg. XXII.- 1973.- Vol. 2.- P. 145-148.

148. Wang, X. Elucidation of compatibility principle and scientific value of Chinese medical formulae based on pharmacometabolomics / X. Wang, B. Zhang // Zhongguo Zhong Yao ZaZhi.- 2010.- 35.- P.1346–1348.

149. Williams J. R. Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavoninins / J. R. Williams, H. Gong // Lipids.- 2007.- vol.42.- №1.- P.77-86.

150. Wink, M. Mind-Altering and Poisonous Plants of the World / M. Wink, B. E. van Wyk // Timber Press.- Portland.- OR.- USA.- 2010.

151. Woodrow, K. Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nano particles densely loaded with small- interfering RNA/ K. Woodrow, Y. Cu, C. Booth, J. Saucier-Sawyer, M. Wood, W. Saltzman// Nature Materials.- 2009.- 8(6).- P.526–533.

152. World Contraceptive Use (United Nations publication) [Электронный ресурс].– 2010.– Режим доступа: http://www.un.org/esa/population/publications/wcu2010/Main.html

153. World Health Statistics 2010: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.– World Health Organization.–[Электронный ресурс].– 2010.–Режим доступа: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS10_Full.pdf

154. Yayla, A. Benzofurans and another constituents from seeds of Styrax officinalis / A. Yayla, H. Anil // Phytochemistry.- 2003.- 63.- P. 939-943.

155. Yayla, Y. Saponins from *Styrax officinalis* / Y. Yayla, O. Alankus-Calıskan, et al. // Fitoterapia.- 2002.- Vol. 73.- P. 320-326.

156. Yoo, J. The physicodynamic properties of mucoadhesive polymeric films developedas female controlled drug delivery system./ J. Yoo, K. Dharmala, C. Lee //Int. J Pharm.309.- 2006.-vol.1.-No.2.-:P.139–145.

157. Zehavi, U. Fungistatic Activity of Saponin A from *Styrax officinalis* L. on Plant Pathogens / U. Zehavi, M. Levy, R. Segal // J. Phytopathology.- 1986.- Vol. 116.- P. 338-343.

158. Zolghadr, J. Vagifem is superior to vaginal premarin in induction of endometrial thickness in the frozenthawed cycle patients with refractory endometria: A randomized clinical trial/ J. Zolghadr, H. Haghbin H, N. Dadras, S. Behdin// Iran J Reprod Med.- Jun 2014.- 12(6).- P. 415-20.

П Р И Л О Ж Е Н И Я

Приложение № 1

East Mediterranean pharmaceutical labs
Syria - Hama- Biadiah: Homs Mosyaf Road
Tel. 0337676765 fax.0337677780 Website: www.lempharma.com

مختبرات شرق المتوسط للصناعات الدوائية
حماه - البياضية اوتوستراد حمص مصياف
هاتف ٠٣٣٧٦٧٦٧٦٥ فاكس ٠٣٣٧١٧٧٧٥٠ www.lempharma.com

Date 01-08-2014

No. 213/O/F

CERTIFICATE OF ANALYSIS: PLANT IDENTIFICATION OF

TAXONOMIC IDENTIFICATION OF PLANT MATERIAL

(STYRAX OFFICINALIS)

Related to the identification processes, of the plant parts material, which are used in the researches of PhD student *Zeina Hamama from the RUDN university, Moscow, Russia*

We confirm that:

The plants part that were sent for these purpose, were identified in our pharmaceutical company ***LEM Pharma*** in the department of herbal medicine preparations.

The identification was done by experts from the Botany department in the Syrian international university in Damascus (***prof. Dr. Yosef Al Amori***) and others from our company (*Dr. Majd Molhem*) head of the department. And the results were confirmed by the general and scientific manager *(Prof. Dr. of pharmacology Ramez Roustom, Al Baath university and LEM Pharma)*

The plant identification based on the macroscopic and microscopic examination of the fresh and dried plants parts (fruits, leaves, and flowers), without examining the genetic pattern.

The Results was:

According to the macroscopic and microscopic analysis, the plant samples are

***Styrax officinalis* – Syrian origin.**

Prof. Dr. Yousef AL-Amori

Confirmed by

Prof. Dr. Ramez Roustom

Приложение № 2

1

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР
«ЦЕНТР КОЛЛЕКТИВНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ»
(НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР)
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2
http://www.ccp.rudn.ru
Тел./факс +7 (495) 787 38 03, доб. 2096

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Изучение контрацептивного действия и биологической безвредности лекарственных форм на основе сухого экстрактов околоплодников стиракса лекарственного *Styrax officinalis L.* в опытах *in vivo*

Научный руководитель
Кандидат ветеринарных наук А.С. Карамян

Москва 2018 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный сотрудник
Ответственный исполнитель,
С.н.с., к.в.н.: Карамян А.С.

Работу обеспечивали:

Лаборанты-исследователи Иванов А.Б.

Врач-ветеринар: Карамян А.С.

Аспирант кафедры общей
фармацевтической и
биомедицинской технологии Зина Хамама

Список рисунков и фотографий в отчете

Рисунок 1. Препараты: А-опыт, В-контроль II, С-сравнение

Рисунок 2. Распределение животных по группам во время карантина

Рисунок 3. Ежедневный осмотр

Рисунок 4. Введение препарата опыта вагинально самке

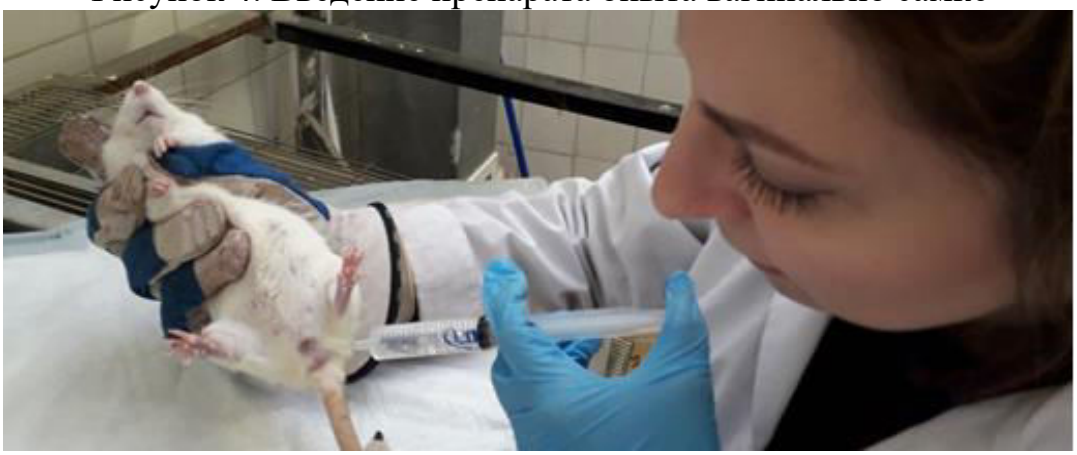


Рисунок 5. Введение препарата контроля вагинально самке

Рисунок 6. Введение препарата сравнения вагинально самке

Рисунок 7. Помещение самки к самцам

Рисунок 8. Получение потомства в группе контроля II

Рисунок 9. Отсутствие беременности, родов и потомства в опытной группе

Приложение № 3

Влияние водных растворов суммы сапонинов в сухом экстракте из стиракса лекарственного различных концентраций на жизнеспособность спермиев

Концентрация водного раствора сапонинов	Время контакта спермы с растворами	Образец № 1		Образец № 2		Образец № 3	
		Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %
0.05%	30 с	20,12	5,65	23,61	10,20	21,31	8,63
	60 с	13,27	9,32	17,02	11,33	12,69	6,51
	5 мин	4,56	1,96	3,28	1,13	4,43	1,87
	10 мин	2,18	1,09	1,55	0,54	2,63	1,11
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.1%	30 с	7,86	2,59	5,09	3,62	4,71	2,73
	60 с	3,44	1,05	1,53	0,45	3,07	1,52
	5 мин	2,12	0,81	1,75	0,33	2,32	1,31
	10 мин	0,19	0,02	1,24	0,12	0,95	0,05
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.2%	30 с	6,39	3,19	4,58	2,08	3,49	1,29
	60 с	2,44	1,65	2,11	1,01	1,22	0,9
	5 мин	1,04	0,3	1,3	0,26	0,51	0,28
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.3%	30 с	4,49	2,21	3,05	1,31	1,92	1,03
	60 с	2,57	1,08	2,50	0,63	1,15	0,75
	5 мин	0,16	0,03	0,13	0,02	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.4%	30 с	0,52	0,24	0,31	0,13	0,15	0
	60 с	0,32	0,02	0,16	0	0	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.5%	30 с	0	0	0	0	0	0
	60 с	0	0	0	0	0	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
Концентрация водного раствора сапонинов	Время контакта спермы с растворами	Образец № 4		Образец № 5		Образец № 6	
		Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %

0.05%	30 с	31,06	9,14	21,97	11,71	25,15	10,39
	60 с	18,49	7,79	14,21	8,04	16,31	9,13
	5 мин	8,61	3,01	5,74	3,08	5,51	3,12
	10 мин	5,71	3,41	3,19	1,41	3,40	1,22
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.1%	30 с	8,33	4,19	5,21	2,91	8,46	5,11
	60 с	5,20	2,01	1,36	0,68	3,21	1,98
	5 мин	3,77	1,58	1,31	0,23	3,49	1,03
	10 мин	1,41	1,01	0,34	0	1,04	0,67
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.2%	30 с	7,18	4,17	4,33	2,28	5,17	2,18
	60 с	5,83	2,96	3,06	1,24	3,41	1,28
	5 мин	1,66	0,57	1,20	0,20	0,86	0,61
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.3%	30 с	7,48	3,20	3,52	1,49	4,77	2,85
	60 с	4,11	2,01	2,27	1,05	3,61	1,11
	5 мин	0,25	0,07	0,19	0,08	0,21	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.4%	30 с	0,65	0,28	0,29	0,08	0,41	0,15
	60 с	0,28	0,07	0,10	0	0,16	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.5%	30 с	0	0	0	0	0	0
	60 с	0	0	0	0	0	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0

Концентрация водного раствора сапонинов	Время контакта спермы с растворами	Образец № 7		Образец № 8		Образец № 9	
		Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %
0.05%	30 с	19,03	6,32	24,37	12,18	11,80	7,44
	60 с	11,12	4,80	16,07	6,83	11,82	4,66
	5 мин	3,46	1,50	5,60	2,49	2,69	1,38
	10 мин	2,47	1,01	3,36	2,04	1,53	0,32
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.1%	30 с	7,72	4,09	9,24	4,26	4,53	1,29
	60 с	2,13	1,35	6,15	2,88	2,30	0,67
	5 мин	1,98	0,40	4,07	2,13	1,84	0,44
	10 мин	0,54	0,06	1,55	0,74	0,84	0,03

	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.2%	30 с	5,08	2,41	6,65	3,34	2,91	1,06
	60 с	4,03	1,53	4,36	2,68	1,17	0,88
	5 мин	1,9	0,34	1,47	0,54	0,25	0,14
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.3%	30 с	3,76	1,14	5,15	2,96	2,83	1,43
	60 с	1,23	0,80	3,93	1,73	2,20	0,76
	5 мин	0,05	0,01	0,07	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.4%	30 с	0,33	0,13	0,58	0,36	0,17	0,01
	60 с	0,11	0	0,34	0,14	0	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.5%	30 с	0	0	0	0	0	0
	60 с	0	0	0	0	0	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0

Концентрация водного раствора сапонинов	Время контакта спермы с растворами	Образец № 10		Образец № 11		Образец № 12	
		Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %	Число подвижных спермиев %	Число активно подвижных спермиев %
0.05%	30 с	20,03	7,15	18,77	6,91	24,13	8,25
	60 с	18,74	8,06	15,37	6,18	16,99	7,38
	5 мин	4,43	2,33	5,81	2,71	5,06	3,51
	10 мин	2,86	1,84	4,76	1,59	3,06	0,93
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.1%	30 с	7,51	3,14	6,13	2,09	7,12	4,64
	60 с	2,38	1,09	4,56	1,89	2,47	1,75
	5 мин	2,34	1,41	2,66	1,24	2,46	1,10
	10 мин	0,63	0,16	1,02	0,26	0,91	0,02
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.2%	30 с	5,15	2,11	3,86	1,22	5,45	2,93
	60 с	3,18	1,72	2,70	1,47	3,69	2,44
	5 мин	0,92	0,33	0,8	0,31	1,15	0,37
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.3%	30 с	7,25	2,11	4,23	1,64	6,12	2,02
	60 с	3,84	1,21	2,33	0,94	2,98	0,87

	5 мин	0,23	0,1	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.4%	30 с	0,63	0,30	0,35	0,14	0,55	0,25
	60 с	0,42	0,22	0,16	0	0,29	0,10
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0
0.5%	30 с	0	0	0	0	0	0
	60 с	0	0	0	0	0	0
	5 мин	0	0	0	0	0	0
	10 мин	0	0	0	0	0	0
	15 мин	0	0	0	0	0	0
	30 мин	0	0	0	0	0	0

Приложение № 4

Для служебного пользования. Экз. №__

проект

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Околоплодники стиракса лекарственного

***Styrax officinalis* L. pericarpium** **ФС-42**

Вводится впервые

Срок введения установлен

с «_____» _____200__г.

Срок действия

до «_____» _____200__г.

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на околоплодники стиракса лекарственного для получения сухого экстракта, применяемого в качестве лекарственного средства.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Околоплодники стиракса лекарственного

ПОКАЗАТЕЛИ	**МЕТОДЫ**	**НОРМЫ**
Внешние признаки	Визуально Органолептический	Соответствует ФС
Микроскопия	ГФ XIII	Соответствует описанию ФС микрофотографиям ФСП
Качественные реакция		Соответствует ФС
Числовые показатели: Влажность Золы общей Золы, не растворимой в 10% кислоте Коэффициент водопоглощения Коэффициент поглощения: этанола 96% метанола	 ГФ XIII ГФ XIII ГФ XIII ГФ XIII ГФ XIII	 Не более 4,5 % Не более 1% Не более 0,1% равный 2,3 мл/г равный 0,73 мл/г равный 0,77 мл/г
Количественное определение в сырье - экстрактивные вещества - суммы сапонинов	ГФ XIII	не менее 59%. не менее 7,5%.
Масса содержимого упаковки	ОФС.1.1.0005.15 ОСТ 64- 492-85	Препарат должен выдерживать требования
Микробиологическая чистота	ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0002.15	Категория 4 А.
Упаковка		По 20 или 40 кг в мешки тканевые
Маркировка		Соответствует ФС
Хранение	ГФ XIII	В сухом, защищенном от света месте.
Срок годности		2 года.

Собранные с августа по октябрь и высушенные околоплодники дикорастущего многолетнего кустарника или невысокого дерева стиракса лекарственного – *Styrax officinalis* L., сем. стираксовых – *Styracaceae*.

Технология получения сырья. При сборе плодов стиракса лекарственного после полного их созревания (с августа по октябрь) обрывают плодов руками, складывая их в мешки или корзины. Для отделения плодов от других частей которые могут попасть в сырье при сборе (от листьев, веточек и плодоножек) собранное сырье провеивают на решетах.

Перед сушкой удаляют семян из плодов (выход свежих околоплодников без семян составляет 65-70% от массы свежесобранных плодов). Сушат околоплодников в сушилках или на открытом воздухе в сухую погоду в тени. При сушке на открытом воздухе рассыпают по 3-4 кг околоплодников стиракса лекарственного на 1 $м^2$, укрывая их от росы в хорошо проветриаемом помещении. Сушка обычно длится 5-7 дней. В сушилках околоплодники стиракса сушат при температуры до 50°С. Выход сухого сырья составляет 30-35% от массы свежесобранного околоплодников без семян.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Высушенные околоплодники стиракса лекарственного шарообразной формы разного размера. Апикальный конец чаще всего заострен. Место прикрепления к укороченному побегу (дистальный конец) более округлый. Размеры околоплодников: диаметр от 7 до 25мм. Поверхность покрыта желтовато-коричневыми звездчатыми волосками или мелкими чешуйками. Окраска околоплодников варьирует: от светло-коричневого до светлого сероватого-зеленоватого. Среди тканей околоплодника чётко различаются несколько слоев: светло-коричневая с сероватым оттенком иногда зеленоватая наружная часть плода – экзокарп; желтовато-коричневая, светлая, блестящая внутренняя часть околоплодника – эндокарп; и прозрачный желтоватый слой мезокарпа между ними. Экзокарп – наружная часть околоплодника шероховатая, покрыта складками, пупырышками, мелкими

чешуйками и густо опушена волосками. Цвет варьируется от светло-коричневого до землисто-серого и зеленовато-серого. Эндокарп – внутренняя часть околоплодника представляет собой достаточно плотный, светло-коричневый рыже-коричневый или бежевый слой, отслаивающийся как от семени, так и от высохшей мякоти мезокарпа.

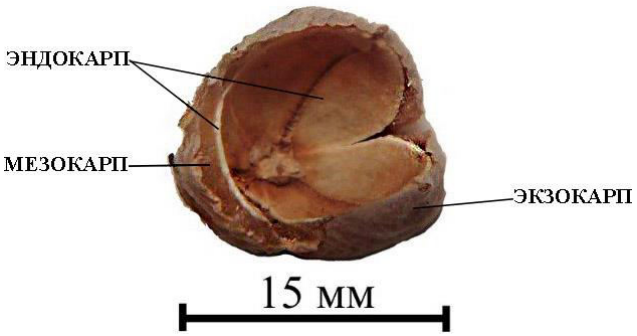


Рисунок. 1. Вид отделенного от семени околоплодника

Во фрагментах околоплодника после разрушения плода присутствуют темно-зеленные или светло-желтые ткани экзо - и мезокарпа, а также ткани светло-коричневого или желтого цвета (плотные), отслаивающийся от других частей околоплодника и семени – эндокарп.

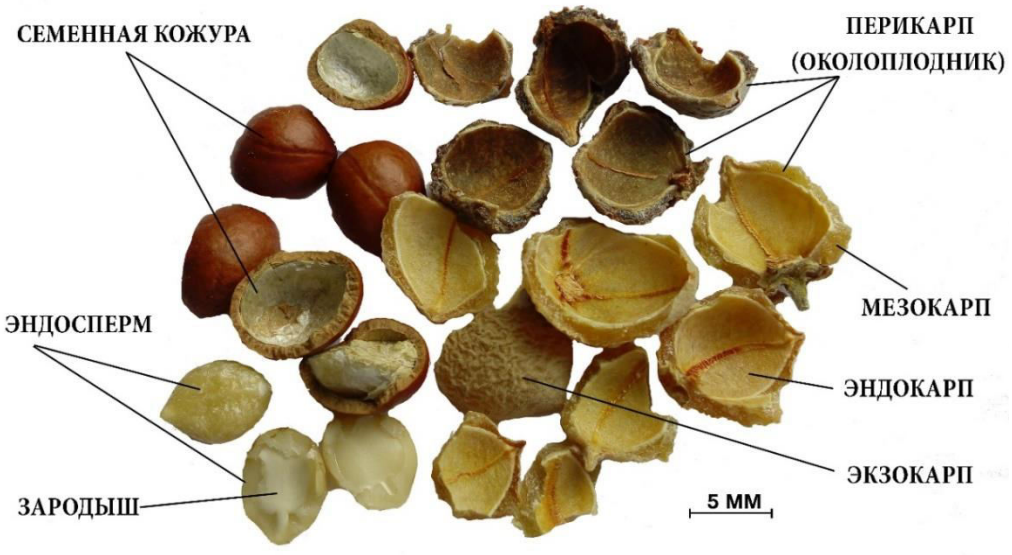


Рисунок. 2. Вид высушенных плодов после их разрушения

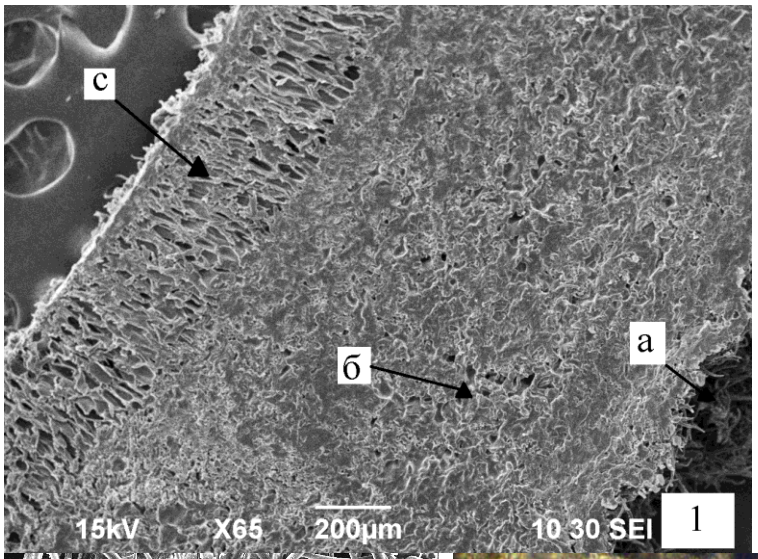
Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки околоплодников различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2,5 мм. Цвет с поверхности и на изломе желтоватый. Запах специфический. Вкус водного извлечения горьковатый.

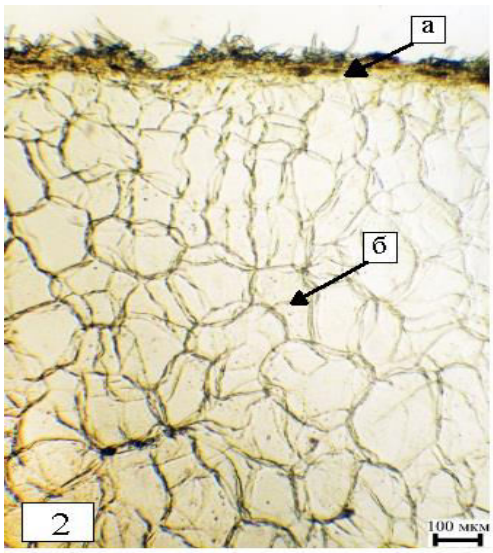
Микроскопические признаки. *Цельное и измельченное сырье.* На поперечном срезе околоплодника видны три слои: экзокарп, мезокарп и эндокарп. Экзокарп представлен слоем наружной эпидермы. Наружная поверхность околоплодника густо покрыта звёздчато-лучистыми трихомами. Клетки экзокарпа мелкие, толстостенные, расположены в 2-4 слоя. Волоски состоят из 4-12 заостренных клеток, выходящих из одного основания в разные стороны толщиной 6-9 мкм.

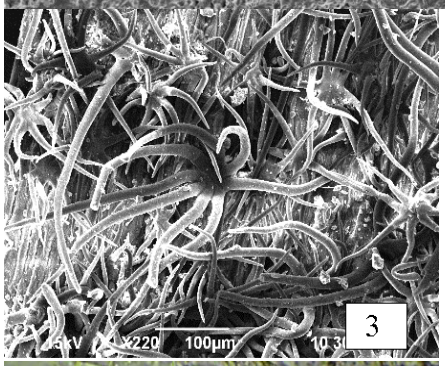
Мезокарп состоит из крупных, округлых к наружной части и вытянутых со слабо извилистыми стенками к внутренней части околоплодника клеток. В верхней части мезокарпа встречаются кубические кристаллы. Проводящие элементы расположены в мезокарпе ближе к внутренней поверхности околоплодника. Рядом с ними встречаются одиночные склеренхимные клетки или их группы по 2-3 клетки. В примыкающих к экзокарпию клетках содержатся хлоропласты, а клетки, примыкающие к эндокарпию, нередко служат местом накопления крахмальных зёрен. Эндокарп представлен толстостенными пористыми клетками, расположенными в несколько слоев и уменьшающимися в размерах к внутренней части околоплодника.

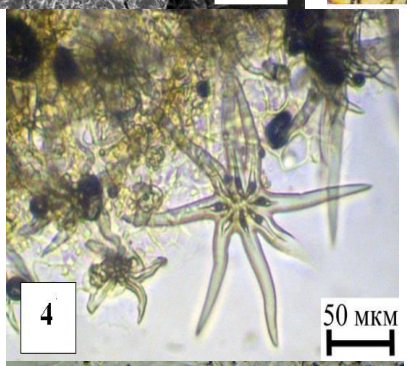
Поверхность эндокарпа ровная, местами с выемками, имеющими размеры клеток 30х50 мкм. Главная часть эндокарпа представлена склеренхимой, клетки которой непосредственно примыкают к мезокарпию. Часть эндокарпа, обращённая к полости плода - внутренний эпидермис. На внутреннем эпидермисе плода имеется губчатый слой – аэренхима. На эндокарпе также имеются трихомы. Они состоят из одной или нескольких длинных заостренных клеток, выходящих из одного основания. В отличие от трихом экзокарпия они расположены спорадически.

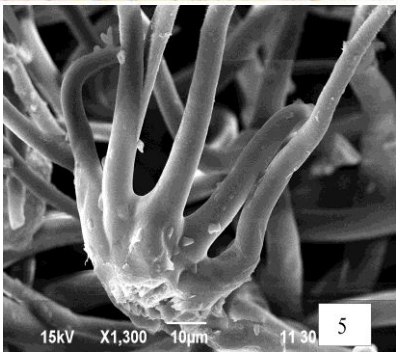
Плодоножка имеет цилиндрическую форму и густо покрыт звезчатыми трихомами.

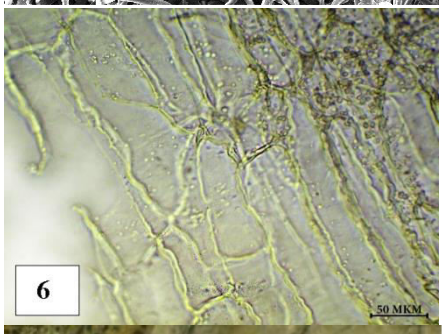

с
б
а
15kV X65 200µm 10 30 SEI
1

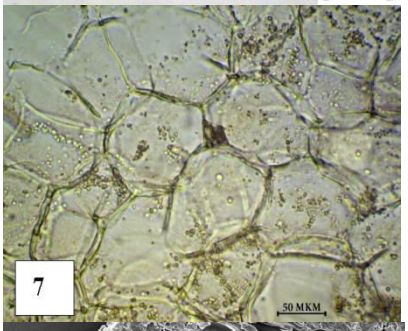

а
б
2
100 МКМ

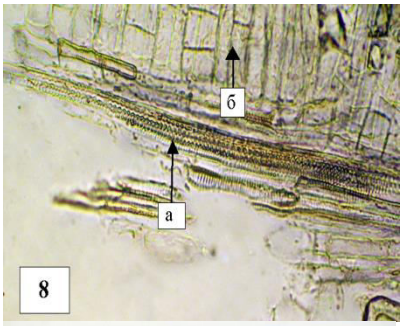

3

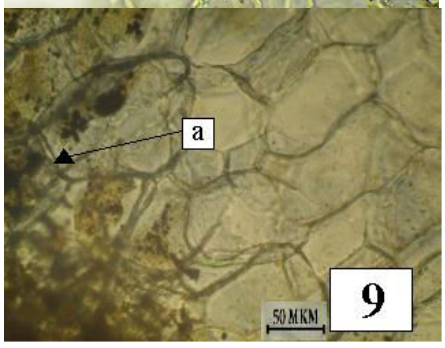

4
50 МКМ

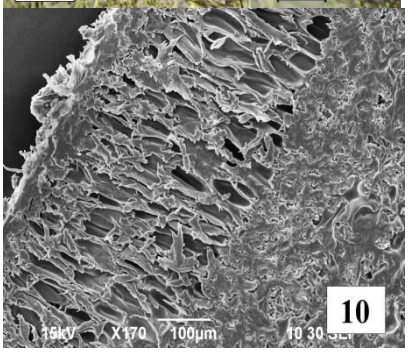

15kV X1,300 10µm
5

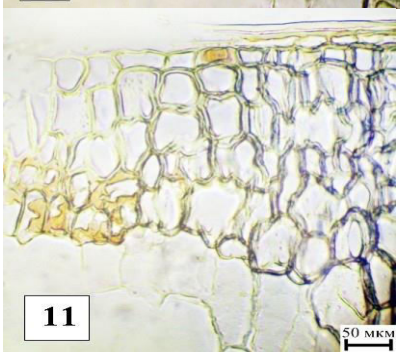

6
50 МКМ

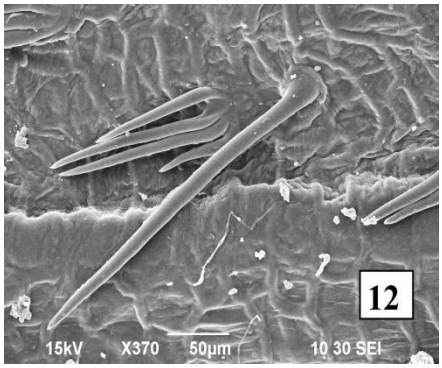

7
50 МКМ

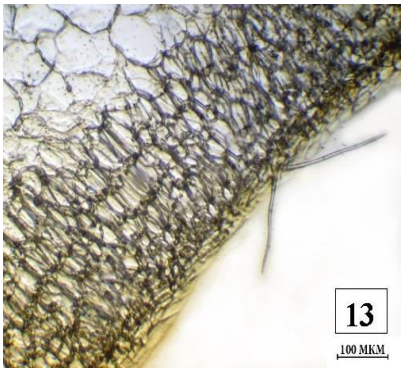

б
а
8


а
50 МКМ
9


15kV X170 100µm
10


11
50 МКМ


12
15kV X370 50µm 10 30 SEI


13
100 МКМ

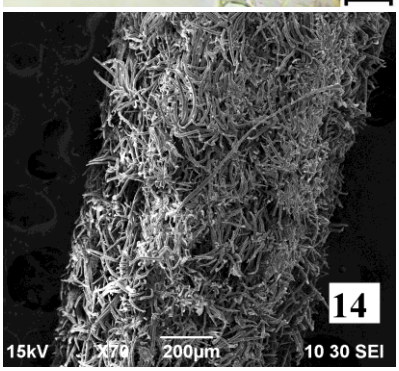

14
15kV X70 200µm 10 30 SEI

Рисунок 3**-** Стиракс лекарственный околоплодников

1 (СЭМ), 2 (ОМ)– поперечный срез экзокарпия и мезокарпия: а–Экзокарпий, б– паренхима мезокарпия, с– эндокарий; 3 (СЭМ) –многочисленные звезчатые трихомы на поверхности экзокарпа; 4 (ОМ), 5 (СЭМ) – звезчато-лучистые трихомы; 6 (ОМ)– продольный разрез мезокарпия; 7 (ОМ)– поперечный разрез мезокарпия; 8 (ОМ)– срез мезокарпия: а– сосуды, б– клетки мезокарпия; 9 (ОМ)– крахмальные зёрна в мезокарпе (после окрашивания раствором Люголя): а– крахмальные зёрна; 10 (СЭМ), 11 (ОМ) – поперечный срез эндокарпия; 12 (СЭМ) –эндокарп в плане (трихомы); 13 (ОМ) – поперечный срез эндокарпа (трихомы); 14 (СЭМ) – плодоножка покрыта волосками.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО PQS). Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца Purified Quillaia Saponin HRS, EP standart растворяют в 2 мл метанола, перемешивают. Срок годности раствора 10 сут.

Испытуемый раствор. Около 0,6 г (точная навеска) сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ) растворяют в 2 мл метанола, перемешивали в течение 1 мин, затем фильтровали. Срок годности раствора 10 сут.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором размером 10 × 20 см на алюминиевой подложке наносят 10 мкл испытуемого раствора (раствора сухого экстракта стиракса лекарственного в метаноле) и 10 мкл раствора стандартного образца (СО PQS).

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, ее помещают в камеру при температуре 20 °С со смесью растворителей: хлороформ-метанол-вода (6:3:1). Пластину вынимают из камеры после прохождения фронта растворителей 15 см, сушат в течение 5 минут, затем опрыскивают раствором взвеси дефибринированной крови.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться зоны адсорбции белого цвета с Rf около 0,68 испытуемого раствора и Rf около 0,55 (сапонины СО PQS).

2. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 1 г измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл и прибавляют 20 мл спирта этилового 70%. Содержимое колбы нагревают на водяной бане в течение 30 мин с обратным холодильником. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через складчатый бумажный фильтр в пробирку вместимостью 20 мл.

2 мл извлечения помещают в пробирку вместимость 20 мл, прибавляют 8 мл воды, перемешивают и энергично встряхивают. Наблюдается образование обильной и устойчивой пены (сапонины).

2 мл извлечения переносят в две пробирки вместимость 20 мл (мерные, с одинаковым диаметром). В одну из пробирок 8 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,1Н, в другую - 8 мл раствора натрия гидроксида 0,1Н. Обе пробирки интенсивно встряхивают в течение 1 мин. образуются пена, равная в обеих пробирках по объему (тритерпеновые сапонины).

2 мл извлечения переносят в фарфоровую чашку диаметром 10 см, помещают на кипящую водяную баню и выпаривают досуха в вытяжном шкафу. К сухому остатку прибавляют 1 мл хлороформа и 5 капель концентрированной серной кислоты. Появиться желтое окрашивание, постепенно переходящее в красное окрашивание (тритерпеновые сапонины) [ТУ 9377-075-04868244-2008].

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье*, *измельченное сырье* – не более 4,5%.

Зола общая. *Цельное сырье*, *измельченное сырье* – не более 1%.

Зола, не растворимая в 10% растворе HCl. *Цельное сырье*, *измельченное сырье* – не более 0,1%.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, не более 2%. *Измельченное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,25мм, не более 20%; частиц размером более 2 мм не более 15%.

Коэффициент водопоглощения. *Измельченное сырье*: равный 2,3 мл/г.

Коэффициент поглощения этанола 96%. *Измельченное сырье*: равный 0,73 мл/г.

Коэффициент поглощения метанола. *Измельченное сырье*: равный 0,77 мл/г.

Посторонние примеси

Другие части стиракса (листья и ветки). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Плодоножки. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 6 %.

Органическая примесь. -

Минеральная примесь. -

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» (Категория 4 А).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* экстрактивные вещества– не менее 59%, сумма сапонинов– не менее 7,5 %.

Экстрактивные вещества

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 6,0 г (точная навеска) высушенных околоплодников стиракса лекарственного (с определенной влажностью W%) помещают в колбу 250 мл, прибавляют 30 мл метанола. Колбу взвешивают и проводят первичную мацерацию сырья в течении 1 ч, после чего соединяют ее с обратным холодильником и нагревают на водяной бане в течение 2 ч. После охлаждения взвешивают колбу с содержимым и восполняют растворителем потерю в массе. Затем взбалтывают колбу и фильтруют содержимое. Эту процедуру повторяют 3 раза, каждый раз прибавляя фильтрат обратно в колбу. Фильтраты объединяют, отбирают 10,0 мл и высушивают эти пробы досуха при температуре 100 °С, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе и взвешивают сухой остаток (m).

Содержание экстрактивных веществ в сухом сырье околоплодников стиракса лекарственного вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m.100.100\ (30 \times 3)}{6\ .\ (100-W)\ .\ 10}\ ;$$

где: m — масса сухого остатка, г;

W — влажность сырья, %.

Сумма сапонинов

6,0 г (точная навеска) измельченных высушенных околоплодников стиракса лекарственного (с определенной влажностью W%), проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм помещают в патрон из фильтровальной бумаги и опускают в экстрактор аппарата Сокслета. Экстракцию проводят с использованием экстрагента метанол 100 мл, при температуре 55-60 °С до полного извлечения экстрактивных веществ. Полученную в колбу-приемник смесь полностью упаривают на ротационном испарителе в вакууме (230 мБар) при 66°С.

Густой экстракт последовательно обрабатывают этилацетатом и н-бутанолом. При подкислении выпадают осадок. Фильтрационный осадок представляет собой густую однородную массу серого цвета. Выпавший осадок отфильтруют, отмывают водой и сушат на воздухе при комнатной температуре до полного испарения растворителей.

К точной навеске 46,3 мг сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ), добавляют 1 мл DMSO-d_6, встряхивают в течение 1 минуты, центрифугироваться в течение 5 минут при 14000 об/мин. Раствор берут в стандартную ампулу для ЯМР d=5 мм. Регистрировать спектр ЯМР^{1}H при следующих условиях: 90º импульс, смещение 5 м.д., развертка 15 м.д., 32 К точек на спектр, 32 повторения, задержка между импульсами 40 с.

Определение содержания сапонинов проводят сравнением интегральной интенсивности откалиброванного по остаточному содержанию протонсодержащего изотопомера DMSO-d_6, и сигналов сапонинов, описанных в статье Y. Yayla et al. (2002 г.) (Рис 4). Условия регистрации спектра ЯМР^{1}H сапонинов образца должны быть такими же, как и для стандартного образца в статье. Спектр ЯМР ^{1}H СЭСЛ представлен в (Рис. 5).

	1 стиракс сапонин A	**2** стиракс сапонин B	**3** стиракс сапонин C	**4** стиракс деацил сапонин
	^{1}H	^{1}H	^{1}H	^{1}H
1	0.88, 1.51	0.88, 1.52	0.88, 1.51	0.88, 1.51
2	1.96, 1.56	1.96, 1.56	1.96, 1.56	1.95, 1.56
3	2.97	2.97	2.97	2.96
4	–	–	–	–
5	0.70	0.70	0.70	0.70
6	1.49, 1.34	1.49, 1.33	1.48, 1.34	1.51, 1.35
7	1.46, 1.23	1.46, 1.23	1.46, 1.23	1.46, 1.22
8	–	–	–	–
9	1.56	1.56	1.56	1.56
10	–	–	–	–
11	1.82, 1.82	1.82, 1.82	1.82, 1.82	1.82, 1.82
12	5.26	5.25	5.26	5.28
13	–	–	–	–
14	–	–	–	–
15	1.20, 1.58	1.21, 1.58	1.20, 1.58	1.20, 1.58
16	3.93	3.97	3.93	4.20
17	–	–	–	–
18	2.45	2.45	2.45	2.55
19	2.52, 1.10	2.52, 1.10	2.52, 1.10	
20	–	–	–	–
21	5.74	5.94	5.73	4.19
22	5.41	5.56	5.41	3.89
23	0.98	0.98	0.98	0.98
24	0.79	0.79	0.79	0.76
25	0.89	0.89	0.89	0.85

Рисунок 4. Результаты ЯМР ^{1}H сапонинов стиракса A, B, C и дезацилсапонин - Y. Yayla et al. (2002 г.)

Для сапонина В был выбран сигнал при 5.94 м.д., для сапонинов А и С выбрана совокупность сигналов в области 5.70-5.8 м.д и 5.41 м.д. Сигналов дезацилсапонина, не перекрывающихся другими сигналами, не обнаружено.

Для количественного определения измерют интегральную интенсивность сигналов сапонинов стиракса. Процентное содержание каждого сапонина в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество (X, % масс) вычисляют по формуле:

$$X, \%_{\text{масс}} = 100 \cdot (S' / S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100/(100 - W)], \quad \text{где}$$

S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

M – молекулярная масса определяемого вещества;

M_0 – молекулярная масса;

a – навеска испытуемого образца;

a_0 – навеска вещества-стандарта;

W – содержание влаги, %.

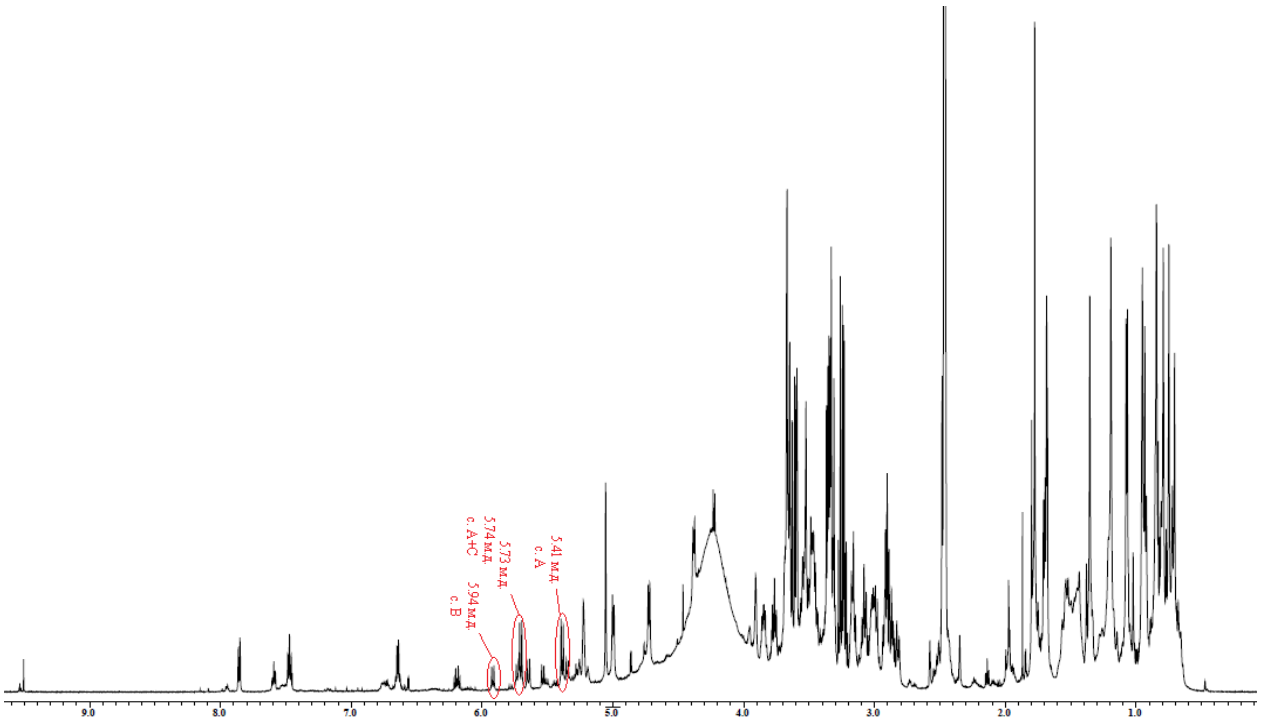


Рисунок 5. Спектр ЯМР ^{1}Н сухого экстракта стиракса лекарственного

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Примечание. Реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах ГФ XIII издания, вып.1, 2.

Разработчики ФС:

Доцент кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН, к.фарм.н., доцент

С. Н. Суслина

Аспирант кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН

Зина Хамама

Доцент кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН, к.фарм.н., доцент

А. С. Хомик

Доцент кафедры ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии РУДН, к.фарм.н., доцент

В. В. Вандышев

Приложение № 5

Для служебного пользования. Экз. №__

проект

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Стиракса лекарственного экстракт сухой (СЭСЛ)

***Styrax officinalis* L. extractum siccum** **ФС**

Вводится впервые

Срок введения установлен

с «_____» _____200__г.

Срок действия

до «_____» _____200__г.

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на сухой экстракт из околоплодников стиракса лекарственного (СЭСЛ) для применения в качестве лекарственного средства.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

Стиракса лекарственного экстракт сухой, получаемый из околоплодников дикорастущего многолетнего кустарника или невысокого дерева стиракса лекарственного – *Styrax officinalis* L., сем. стираксовых – *Styracaceae,* экстракцией спиртом с содержанием суммы тритерпеновых сапонинов не менее 28 % применяемый для производства лекарственных препаратов.

Описание

Порошок сухого очищенного экстракта стиракса представляет собой аморфные частицы от светло-кремового до кремового цвета с серым оттенком, со специфическим запахом (Рис 1.).

Рисунок 1. Внешние вид СЭСЛ

Микроскопические признаки СЭСЛ

Форма частиц СЭСЛ определяется с помощью СЭМ. Частицы сухого экстракта стиракса лекарственного имеют различные размеры и форму. Частицы многоугольные, с ломанными краями иногда удлиненные иногда округлые. Поверхность частиц – покрыта выступающими многогранными образованиями. Даже округлые частицы имеют очень неровную поверхность.

Неровная поверхность частиц не позволяет им скользить относительно друг друга (Рис 2.).

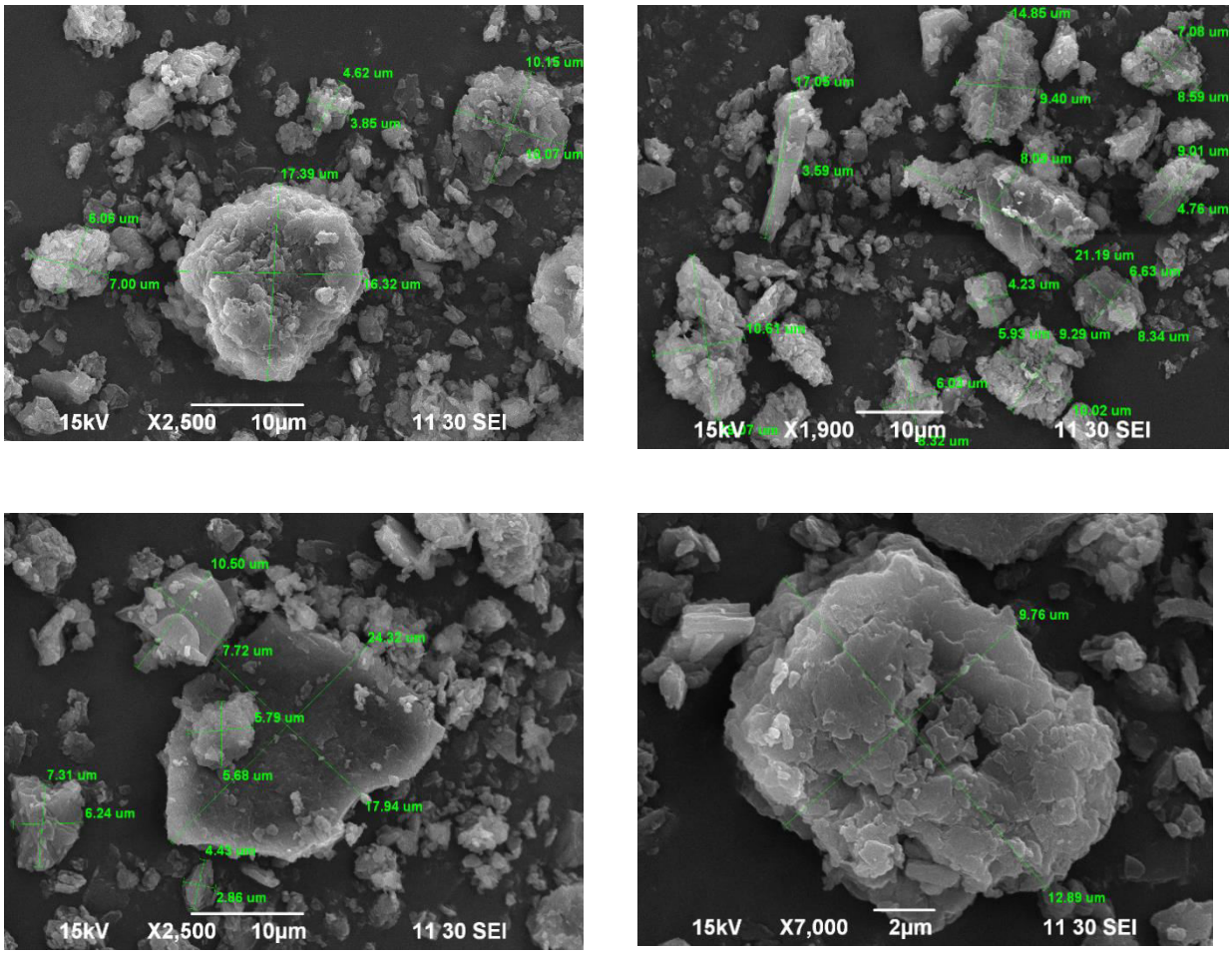


Рисунок 2. Микрофотографии частиц порошка СЭСЛ под СЭМ

Подлинность

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО PQS). Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца Purified Quillaia Saponin HRS, EP standart растворяют в 2 мл метанола, перемешивают. Срок годности раствора 10 сут.

Испытуемый раствор. Около 0,6 г (точная навеска) сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ) растворяют в 2 мл метанола, перемешивали в течение 1 мин, затем фильтровали. Срок годности раствора 10 сут.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором размером 10 × 20 см на алюминиевой подложке наносят 10 мкл испытуемого раствора (раствора сухого экстракта стиракса лекарственного в метаноле) и 10 мкл раствора стандартного образца (СО

PQS). Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, ее помещают в камеру при температуре 20 °С со смесью растворителей: хлороформ-метанол-вода (6:3:1). Пластину вынимают из камеры после прохождения фронта растворителей 15 см, сушат в течение 5 минут, затем опрыскивают раствором взвеси дефибринированной крови.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться зоны адсорбции белого цвета с Rf около 0,68 испытуемого раствора "сумма сапонинов стиракса (ССС)" и Rf около 0,55 (сапонины СО PQS).

2. 0,2 г СЭСЛ помещают в пробирку вместимость 20 мл, прибавляют 10 мл воды, перемешивают и энергично встряхивают. Наблюдается образование обильной и устойчивой пены (сапонины).

3. 0,2 г СЭСЛ переносят в две пробирки вместимость 20 мл. В одну из пробирок 2 мл воды и 8 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,1Н, в другую 2 мл воды и 8 мл раствора натрия гидроксида 0,1Н. Обе пробирки интенсивно встряхивают в течение 1 мин. образуются пена, равная в обеих пробирках по объему (тритерпеновые сапонины).

4. 0,2 г СЭСЛ растворили в 5 мл изотонического раствора натрия хлорида, добавили полученный раствор к 1 мл взвеси дефибринированной крови. В контрольную пробирку к 1 мл взвеси дефибринированной крови добавили 5 мл изотонического раствора натрия хлорида. В результате наблюдается образование белого опалесцирующего раствора «лаковая» крови, который через несколько минут выпал в осадок в виде белых хлопьев. Надосадочная жидкость стала прозрачной. В пробирке с контролем не наблюдалось изменений.

5. К 0,2 г. СЭСЛ прибавляют 1 мл хлороформа и 5 капель концентрированной серной кислоты. Появиться желтое окрашивание, постепенно переходящее в красное окрашивание (тритерпеновые сапонины).

Потеря в массе при высушивании. Не более 6,5 %. В соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании**».**

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты**»**.

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Влажность СЭСЛ: составляет 6,5±0,8 %.

растворимость СЭСЛ

Растворимость СЭСЛ определяются по методике ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15 при комнатной температуре. Результаты растворимости представлены в таб. (1.).

Таблица 1. – растворимость СЭСЛ при (20± 2)°С

№ опыта	Растворитель / Система растворителей	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества	Обозначения растворимости
1	Вода очищенная	1:1000	Мало растворим
2	Вода очищенная + ТЭА	1:10	Растворим
3	Вода очищенная +трометамол	1:10	Растворим
4	Вода очищенная +NaOH	1:10	Растворим
5	Спирт 95%	1:100	Умернно растворим
6	Метанол	1:20	Растворим
7	Глицерин	1:125	Мало растворим
8	Ацетон	1:20	Растворим
9	Пропиленгликоль	1:200	Мало растворим
10	Диметилсульфоксид	1:20	Растворим
11	Полиэтиленгликоль-400	1:1000	Мало растворим
12	Хлороформ	1:200	Мало растворим
13	н-бутанол	1:2000	Очень мало растворим

степень сыпучести СЭСЛ

Результаты технологических характеристик СЭСЛ представленные в таблице (2.).

Таблица 2. – Технологические характеристики порошка СЭСЛ

Сыпучесть, г/с		**Угол естественного откоса, град**	**Насыпная масса, г**	**Насыпная плотность, г/см^3**		**Индекс Карра** $К_{пр}$ **%**	**Индекс Хауснера**
Насадкамм± 0,01							
10	0	68±2	0,428±0,02	ρ_{10}	0,439±0,01	25,64	1,343
15	0			ρ_{500}	0,575±0,01		
25	0						

Регистрация УФ-спектрофотометрия СЭСЛ и ССС

Около 0,010 г СЭСЛ помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в метаноле и доводят объем до метки (раствор А). Выделенную с помощью препаративной ТСХ ССС помещают в метанол последовательно фильтруют через целлюлозный, а затем через шприцевый фильтр CHROMAFIL Xtra PTFE (Тефлон) с размером пор 45 мкм (раствор Б).

УФ-спектр раствора А и Б снимают на спектрофотометре АКВИЛОН СФ-102 в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют метанол.

УФ-спектр поглощения 0,1% метанольных растворов сапонинов, выделенных из стиракса лекарственного в области от 230 до 365 нм должен имеет максимум поглощения при длине волны 270 ± 1 нм и 315 ± 1 нм.

Количественное определение. Содержание суммы сапонинов должно быть не менее 28 %.

К точной навеске 46,3 мг сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ), добавляют 1 мл DMSO-d_6, встряхивают в течение 1 минуты, центрифугироваться в течение 5 минут при 14000 об/мин. Раствор берут в стандартную ампулу для ЯМР d=5 мм. Регистрировать спектр ЯМР^{1}Н при следующих условиях: 90º импульс, смещение 5 м.д., развертка 15 м.д., 32 К точек на спектр, 32 повторения, задержка между импульсами 40 с.

Определение содержания сапонинов проводят сравнением интегральной интенсивности откалиброванного по остаточному содержанию протонсодержащего изотопомера DMSO-d_6, и сигналов сапонинов, описанных в статье Y. Yayla et al. (2002 г.). Условия регистрации спектра ЯМР^{1}Н сапонинов образца должны быть такими же, как и для стандартного образца в статье.

Для сапонина В был выбран сигнал при 5.94 м.д., для сапонинов А и С выбрана совокупность сигналов в области 5.70-5.8 м.д и 5.41 м.д. Сигналов дезацилсапонина, не перекрывающихся другими сигналами, не обнаружено.

Для количественного определения измерют интегральную интенсивность сигналов сапонинов стиракса. Процентное содержание каждого сапонина в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество (*X*, % масс) вычисляют по формуле:

$$X, \%_{\text{масс}} = 100 \cdot (S' / S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100/(100 - W)],$$ где

S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

M – молекулярная масса определяемого вещества;

M_0 – молекулярная масса;

a – навеска испытуемого образца;

a_0 – навеска вещества-стандарта;

W – содержание влаги, %.

Хранение. В защищенном от влаги и света месте при температуре от 15 до 25 °С.

Приложение № 6

ПРОЕКТ
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вагинальные пленки «ВСПЭС» **ОФС**

Вводится впервые

Вагинальные пленки «ВСПЭС» – твердые дозированные лекарственные формы, которые быстро растворяются при контакте с вагинальной жидкостью, содержащие действующее вещество сухого экстракта стиракса лекарственного (СЭСЛ) и вспомогательные вещества, в том числе пленкообразующие и пластификаторы. Вагинальные пленки «ВСПЭС» произведены на основе биодеградируемых материалов. Они используют как противозачаточные, с потенциальным противомикробным эффектом в отношении сопутствующих заболеваний половых путей.

Состав ВСПЭС на 100,0 г

Компоненты	**Содержание, г**
Сухой экстракт стиракса лекарственного	**1,1**
ПВС	**4,5**
Карбопол 980	**0,1**
Нейтрализующий агент	**pH 6-8**
Глицерин	**7,4**
Вода очищенная	**до 100**

Описание. Пленки имеют квадратную форму, со стороной 5×5 см; толщина – около 200 мкм, гладкую поверхность, без воздушных включений, прозрачные, легко складываются, не липкие, цвет пленок светло желтый (с возможностью добавления окрашивающих агентов), без запаха и вкуса, на изломе – однородные.

Подлинность.

УФ – спектрофотомерия: УФ - спектры вытяжек пленок метанолом в диапазоны от 200 до 400 нм должны иметь характерные максимум поглощения при 270±1 нм и 315±1 нм.

ТСХ: в системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1) (УФ-свет, 245 нм / детектор - раствор взвеси дефибринированной крови). На хроматограмме обнаруживаются зоны адсорбции белого цвета с Rf около (0,68) (сапонины).

Размеры пленки. Определяют геометрические размеры пленки (длину, ширину, толщину) микрометром. Пленка ВСПЭС - квадрат 5 см х 5 см. Толщина: определяют среднее значение 6 измерений в разных местах пленки (в центре и четырех углах). Толщина ВСПЭС не более 206,03± 5,10 мкм.

Однородность массы. Проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Если предусмотрено испытание на однородность дозирования, то контроль однородности массы не требуется.

Проводят трехкратные измерения для 6 полученных образцов одной серии, средняя масса пленки ВСПЭС 25 $см^2$ не более 0,22 ± 0,02 г.

Однородность дозирования. Проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность дозирования», если нет других указаний в нормативной документации.

Содержание влаги - потеря в массе при высушивании. Определение содержания влаги проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании». Нормируемые значения показателей содержания влаги равны 14,50±1,36 % .

pH водной растворения пленки. Испытание проводят с требованиями ОФС «Ионометрия» при одной и той же температуре 25 ºС. Нормируемое

значение pH дисперсии пленки в 20 мл растворе уксусной кислоты 0,001 М - pH=3,5 (имитирующий искусственную вагинальную жидкость) не превышает 4,376±0,20.

Распадаемость - время дезинтеграции пленки. С целью определения время дезинтеграции, образцы пленки помещают в 20 мл 0,001 М раствора уксусной кислоты pH 3,5 на шейкер и определяют время потеря формы. Время дезинтеграции пленки ВСПЭС должно быть не превышает 20,5±4,04 сек.

Растворение. Проводят с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» и определяется после полного растворения пленки ВСПЭС в 20 мл 0,001 М раствора уксусной кислоты pH 3,5. Нормируемое значение растворения ВСПЭС не превышает 64,67±5,68 сек.

Растворение ВСПЭС один из способов подтверждения соответствующего высвобождения действующих веществ.

Исследование микробиологической чистоты. Проводят согласно требованиям ОФС «Микробиологическая чистота» категории 2: общее число на 1 пленке допускается не более 100 колониеобразующей единицы суммарно аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов, при отсутствии *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, энтеробактерий, устойчивых к желчи и *Candida albicans.*

Количественного определения суммы сапонинов стиракса (ССС) в ВСПЭС

Подготовка образца пленки, для количественного определения используют одну пленку, масса одной пленки размером 5×5 см примерно равна 0,22 ± 0,02 г, испытуемый образец выдерживают в растворе метанола (15 мл) в течении 1 часа, после чего разрезают ножницами на мелкие кусочки. Затем интенсивно встряхивают на вортексе в течение 5 минут. Промывку пленки метанолом повторяют 3 раза. Затем раствор метанола отобран в колбе и испаряют метанол на роторном испарителе.

Методика – После полного испарения метанола на роторном испарителе, к содержимому колбы добавляют 1 мл DMSO-d_6, встряхивают в течение 1 минуты, центрифугируют в течение 5 минут при 14000 об/мин. Раствор переносят в стандартную ампулу для ЯМР d=5 мм. Регистрируют спектр ЯМР ^{1}H при следующих условиях: 90º импульс, смещение 5 м.д., развертка 15 м.д., 32 К точек на спектр, 32 повторения, задержка между импульсами 40 с.

Определение содержания сапонинов проводят сравнением интегральной интенсивности откалиброванного по остаточному содержанию протонсодержащего изотопомера DMSO-d_6, и сигналов сапонинов, описанных в статье Y. Yayla et al. (2002 г.).

Для количественного определения измерют интегральную интенсивность сигналов сапонинов стиракса. Процентное содержание каждого сапонина в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество (*X,* % масс) вычисляют по формуле:

$$X,\ \%_{\text{масс}} = 100 \cdot (S'/S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100/(100 - W)],$$ где

S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

M – молекулярная масса определяемого вещества;

M_0 – молекулярная масса;

a – навеска испытуемого образца;

a_0 – навеска вещества-стандарта;

W – содержание влаги, %.

Пленка ВСПЭС содержит 5,6 мг суммы А и С сапонина (сигналы в области 5.70-5.8 м.д и 5.41 м.д.) и 1,2 мг В сапонина (сигнал при 5.94 м.д.).

Содержание суммы сапонинов в одной пленки должно быть не менее 6,0 мг.

Исследования стабильности. В соответствии с Международным советом по гармонизации (МСГ) (International Council for Harmonisation: ICH):

Стабильность пленочных продуктов оценивают в течение 24 месяцев в условиях окружающей среды или промежуточных условий (при температуре 25±5°С ивлажности 60±2%). На каждой контрольной точке (после 6, 12, 18, 24 месяцев) проверятся цвет, запах, внешний вид, подлинность, pH, количественное содержание активного вещества, микробиологическую чистоту и массу содержимого упаковки.

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Пленки ВСПЭС расфасовывают по 1 пленке в буфлен по ТУ 5453-030-21032843-96, затем помещают во вторичную упаковку (пачку из картона).

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90.

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств». В сухом, защищенном от света месте при температуре 15 - 25°С.
Срок годности 2 года.

Приложение № 7

Результаты прогнозирования биологической активности химических структур сапонинов стиракса с помощью программы PASS (Pa>0,5)

PASS Online-All Activities, Web Server prediction results: ***Styrax deacylsaponin***

Pa	Pi	Activity
0,992	0,001	Hepatoprotectant
0,971	0,000	ICAM1 expression inhibitor
0,970	0,002	Caspase 3 stimulant
0,951	0,002	Chemopreventive
0,934	0,004	Antineoplastic
0,918	0,001	Caspase 8 stimulant
0,913	0,002	Membrane integrity antagonist
0,893	0,002	Transcription factor NF kappa B stimulant
0,893	0,002	Transcription factor stimulant
0,890	0,004	Immunostimulant
0,881	0,003	Wound healing agent
0,877	0,001	Alpha glucosidase inhibitor
0,872	0,003	Lipid peroxidase inhibitor
0,861	0,006	Anaphylatoxin receptor antagonist
0,854	0,004	Oxidoreductase inhibitor
0,847	0,005	Hypolipemic
0,843	0,005	Antiinflammatory
0,855	0,018	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,838	0,005	Apoptosis agonist
0,818	0,004	Antifungal
0,806	0,004	Antithrombotic
0,803	0,005	Glyceryl-ether monooxygenase inhibitor
0,778	0,003	Antiviral (Influenza)
0,770	0,006	Antiprotozoal (Leishmania)
0,772	0,008	Immunosuppressant
0,762	0,004	Hepatic disorders treatment
0,759	0,004	Antiulcerative
0,751	0,003	Chitinase inhibitor
0,749	0,005	Antineoplastic (lung cancer)
0,766	0,023	Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
0,761	0,024	CYP2H substrate
0,753	0,023	Benzoate-CoA ligase inhibitor
0,726	0,008	Anticarcinogenic
0,712	0,003	Nitric oxide antagonist
0,712	0,004	Beta glucuronidase inhibitor
0,706	0,004	Antinociceptive
0,707	0,006	Proliferative diseases treatment

0,698	0,004	Antineoplastic (ovarian cancer)
0,673	0,011	Cholesterol antagonist
0,664	0,016	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase inhibitor
0,648	0,003	Dementia treatment
0,639	0,006	Bilirubin oxidase inhibitor
0,624	0,004	Myc inhibitor
0,637	0,018	UDP-glucuronosyltransferase substrate
0,624	0,011	Lactase inhibitor
0,614	0,003	DNA ligase (ATP) inhibitor
0,619	0,008	Antibacterial
0,613	0,009	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase inhibitor
0,586	0,016	Aspartyltransferase inhibitor
0,568	0,002	Vascular dementia treatment
0,601	0,047	Phosphatase inhibitor
0,556	0,010	Antileukemic
0,565	0,020	Dermatologic
0,550	0,010	Antimetastatic
0,530	0,009	Mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor
0,546	0,025	Alkenylglycerophosphoethanolamine hydrolase inhibitor
0,527	0,011	Antitoxic
0,531	0,016	CYP17 inhibitor
0,513	0,006	Antioxidant
0,518	0,018	Mycothiol-S-conjugate amidase inhibitor
0,514	0,018	Antineoplastic (breast cancer)
0,505	0,013	CYP2C9 inducer

PASS Online-All Activities, Web Server prediction results: ***Styrax -sapogenins A***

Pa	Pi	Activity
0,981	0,000	ICAM1 expression inhibitor
0,973	0,001	Hepatoprotectant
0,951	0,004	Antineoplastic
0,919	0,002	Lipid peroxidase inhibitor
0,896	0,004	Caspase 3 stimulant
0,870	0,005	Apoptosis agonist
0,866	0,003	Chemopreventive
0,864	0,003	Antineoplastic (ovarian cancer)
0,859	0,002	Transcription factor NF kappa B stimulant
0,859	0,002	Transcription factor stimulant
0,848	0,004	Oxidoreductase inhibitor
0,830	0,005	Antiinflammatory
0,815	0,002	Nitric oxide antagonist
0,807	0,002	Caspase 8 stimulant
0,807	0,004	Antineoplastic (lung cancer)
0,747	0,004	Hepatic disorders treatment

0,718	0,012	Hypolipemic
0,708	0,011	Phosphatase inhibitor
0,705	0,009	Antifungal
0,687	0,003	Transcription factor NF kappa B inhibitor
0,688	0,005	Antineoplastic (colorectal cancer)
0,687	0,005	Antineoplastic (colon cancer)
0,686	0,015	Membrane integrity antagonist
0,683	0,019	Immunosuppressant
0,668	0,008	Antiviral (Influenza)
0,655	0,005	Antinociceptive
0,646	0,008	Antineoplastic (breast cancer)
0,619	0,004	Myc inhibitor
0,589	0,009	Gestagen antagonist
0,580	0,008	Antiviral (Rhinovirus)
0,588	0,023	Lipid metabolism regulator
0,562	0,005	Antineoplastic (melanoma)
0,560	0,012	CYP17 inhibitor
0,568	0,020	Dermatologic
0,547	0,006	Prostate cancer treatment
0,558	0,018	AR expression inhibitor
0,565	0,027	Ecdysone 20-monooxygenase inhibitor
0,559	0,022	Antipruritic
0,543	0,012	Antimetastatic
0,534	0,004	Antineoplastic (carcinoma)
0,528	0,005	Antineoplastic (cervical cancer)
0,527	0,005	DNA ligase (ATP) inhibitor
0,530	0,012	Antileukemic
0,534	0,023	Insulin promoter
0,526	0,021	Antiprotozoal (Leishmania)
0,546	0,043	Glyceryl-ether monooxygenase inhibitor
0,500	0,002	Antineoplastic (thyroid cancer)
0,505	0,036	Immunostimulant
0,504	0,037	Beta glucuronidase inhibitor
0,556	0,104	CYP2J substrate
0,564	0,113	Mucomembranous protector

PASS Online-All Activities, Web Server prediction results: ***Styrax -sapogenins B***

Pa	Pi	Activity
0,927	0,002	Hepatoprotectant
0,926	0,005	Antineoplastic
0,912	0,003	Caspase 3 stimulant
0,898	0,002	Chemopreventive
0,871	0,003	Oxidoreductase inhibitor
0,863	0,004	Membrane integrity antagonist

0,853	0,002	Transcription factor NF kappa B stimulant
0,853	0,002	Transcription factor stimulant
0,837	0,003	Antineoplastic (ovarian cancer)
0,833	0,001	Caspase 8 stimulant
0,831	0,003	Lipid peroxidase inhibitor
0,820	0,005	Antiinflammatory
0,816	0,001	ICAM1 expression inhibitor
0,807	0,008	Apoptosis agonist
0,797	0,004	Antineoplastic (lung cancer)
0,776	0,003	Nitric oxide antagonist
0,775	0,002	Antinociceptive
0,755	0,008	Lipid metabolism regulator
0,745	0,004	Antiviral (Influenza)
0,729	0,008	Antisecretoric
0,720	0,005	Insulin promoter
0,726	0,014	Immunosuppressant
0,713	0,010	Phosphatase inhibitor
0,706	0,005	Hepatic disorders treatment
0,728	0,028	Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
0,728	0,030	CYP2H substrate
0,679	0,006	Antineoplastic (colorectal cancer)
0,685	0,015	Hypolipemic
0,676	0,006	Antineoplastic (colon cancer)
0,647	0,014	HMOX1 expression enhancer
0,634	0,008	Antineoplastic (breast cancer)
0,628	0,016	Ecdysone 20-monooxygenase inhibitor
0,624	0,013	Antiprotozoal (Leishmania)
0,618	0,024	Cytoprotectant
0,605	0,018	Antifungal
0,602	0,019	Cholesterol antagonist
0,589	0,009	Gestagen antagonist
0,607	0,026	Glyceryl-ether monooxygenase inhibitor
0,598	0,018	CYP3A inducer
0,595	0,016	Antithrombotic
0,588	0,020	CYP3A4 inducer
0,570	0,005	Prostate cancer treatment
0,573	0,009	Antiviral (Rhinovirus)
0,569	0,006	Myc inhibitor
0,577	0,019	Dermatologic
0,558	0,004	Transcription factor NF kappa B inhibitor
0,566	0,012	CYP17 inhibitor
0,563	0,019	Chitinase inhibitor
0,544	0,004	DNA ligase (ATP) inhibitor
0,551	0,015	Antiulcerative
0,555	0,024	Beta glucuronidase inhibitor

0,527	0,005	P-glycoprotein inhibitor
0,522	0,003	Cholesterol synthesis inhibitor
0,607	0,088	Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
0,523	0,005	Antineoplastic (melanoma)
0,530	0,014	Antimetastatic
0,540	0,026	Antipruritic
0,513	0,004	Protein phosphatase inhibitor
0,528	0,019	Antipsoriatic
0,540	0,031	Immunostimulant
0,506	0,002	Antineoplastic (thyroid cancer)
0,500	0,010	Antiviral (Herpes)
0,494	0,004	Protein-tyrosine phosphatase inhibitor
0,488	0,003	Antineoplastic (endocrine cancer)
0,510	0,031	Alkenylglycerophosphoethanolamine hydrolase inhibitor
0,575	0,098	Antieczematic
0,525	0,078	TP53 expression enhancer
0,524	0,127	Mucomembranous protector

PASS Online-All Activities, Web Server prediction results: ***Styrax -sapogenins C***

Pa	Pi	Activity
0,944	0,002	Hepatoprotectant
0,930	0,005	Antineoplastic
0,894	0,002	Chemopreventive
0,868	0,003	Oxidoreductase inhibitor
0,850	0,002	Transcription factor NF kappa B stimulant
0,850	0,002	Transcription factor stimulant
0,847	0,001	Caspase 8 stimulant
0,848	0,005	Apoptosis agonist
0,843	0,005	Antiinflammatory
0,833	0,001	ICAM1 expression inhibitor
0,831	0,005	Caspase 3 stimulant
0,818	0,003	Antineoplastic (ovarian cancer)
0,810	0,003	Lipid peroxidase inhibitor
0,813	0,007	Hypolipemic
0,781	0,003	Nitric oxide antagonist
0,780	0,004	Antineoplastic (lung cancer)
0,778	0,008	Membrane integrity antagonist
0,763	0,004	Antiviral (Influenza)
0,755	0,004	Antiulcerative
0,738	0,004	Hepatic disorders treatment
0,717	0,007	Antithrombotic
0,711	0,003	Antinociceptive
0,719	0,014	Immunosuppressant

0,706	0,012	Phosphatase inhibitor
0,697	0,010	Antifungal
0,684	0,012	Lipid metabolism regulator
0,626	0,011	Alcohol O-acetyltransferase inhibitor
0,623	0,013	Antipruritic
0,610	0,008	Antineoplastic (colorectal cancer)
0,616	0,016	Antisecretoric
0,603	0,008	Gestagen antagonist
0,599	0,005	Myc inhibitor
0,612	0,018	HMOX1 expression enhancer
0,603	0,010	Antineoplastic (breast cancer)
0,613	0,022	Immunostimulant
0,609	0,018	Cholesterol antagonist
0,604	0,014	Insulin promoter
0,598	0,008	Antineoplastic (colon cancer)
0,604	0,022	Gastrin inhibitor
0,594	0,016	Dermatologic
0,642	0,068	Antieczematic
0,573	0,013	Antipsoriatic
0,567	0,010	Antiviral (Rhinovirus)
0,629	0,076	CYP2J substrate
0,555	0,006	Prostate cancer treatment
0,634	0,087	Mucomembranous protector
0,556	0,010	Antimetastatic
0,582	0,037	Cytoprotectant
0,553	0,013	CYP17 inhibitor
0,573	0,035	Glyceryl-ether monooxygenase inhibitor
0,541	0,005	Antineoplastic (melanoma)
0,541	0,006	Antiviral (Herpes)
0,555	0,029	Ecdysone 20-monooxygenase inhibitor
0,507	0,006	DNA ligase (ATP) inhibitor
0,511	0,023	Antiprotozoal (Leishmania)
0,503	0,038	Beta glucuronidase inhibitor
0,508	0,060	Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
0,520	0,095	CYP2J2 substrate

Приложение № 8

"У Т В Е Р Ж Д А Ю "

Первый проректор,
проректор по научной
работе РУДН
…Н.С. Кирабаев

" " января 2018 года

А К Т

об использовании в учебном процессе

Разработки состава и технологии изготовления биорастворимых лекарственных полимерных пленок с растительным экстрактом.

Автор предложения: Хамама Зина, аспирант кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН.

Источник предложения: опубликованный в печати фрагмент диссертационной работы на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук «**РАЗРАБОТКА, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЛЁНКИ СПЕРМИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ, НА ОСНОВЕ САПОНИНОВ *STYRAX OFFICINALIS L.***».

Объект внедрения: методика получения инновационных лекарственной форм-биорастворимых лекарственных полимерных пленок с растительным экстрактом.

1. Приготовление основы ПВС (поливиниловый спирт): Для приготовления 10% раствора спирта поливинилового 50 мл: отвесили 5,0 г ПВС, отмерили 50 мл воды очищенной и добавили в нее ПВС. Основообразующее вещество набухало при комнатной температуре в течение 40 минут при постоянном помешивании. Полученную смесь нагревали до температуры 90-100°С, непрерывно перемешивая, до полного растворения, после охладили до комнатной температуры.
2. Приготовление основы, с использованием Карбопола 940: Для приготовления 0,5% раствора карбопола, объемом 50 мл: отвесили 0,25 г карбопола, затем отмерили 50 мл воды очищенной и добавили (напылили) карбопол. Основообразующее вещество набухало при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего было добавлено несколько капель ТЭА (триэтаноламина) до pH 6,5-7,5 и полного растворения, размешали.
3. Сухой экстракт растворили в смеси вода и ТЭА, затем его вводили в состав полимерной композиции (раствор полимеров) и в качестве пластификатора применяли глицерин и тщательно смешивали.
4. Разливали гленочную массу после деаэрации на подложки. После сушки, высушенную пленку снимали от подложки, дозировали.

Предложение используется на кафедре общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН для обучения студентов 5 курса фармацевтического отделения медицинского факультета по теме "Технология получения твердых лекарственных форм".

Зав. каф. Общей фармацевтической
и биомедицинской технологии РУДН,
кандидат фарм. наук, доцент С. Н. Суслина

удостоверяю.
Учёный секретарь аграрного факультета РУДН Т. В. Максимова

Приложение № 9

"У Т В Е Р Ж Д А Ю "

Первый проректор,
проректор по научной
работе РУДН
_____ А.С. Кирабаев

5 января 2018 года

А К Т

об использовании в учебном процессе
методики выделения и очистки сапонинов из лекарственного растительного сырья (ЛРС)

Автор предложения: Хамама Зина, аспирант кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН.

Источник предложения: опубликованный в печати фрагмент диссертационной работы на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук «**РАЗРАБОТКА, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЛЁНКИ СПЕРМИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ, НА ОСНОВЕ САПОНИНОВ *STYRAX OFFICINALIS L.***».

Объект внедрения: Методика выделения и очистки сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного.

Разработка метода получения сухого экстракта методом циркуляционной экстракции. Циркуляционная экстракция осуществлялась в аппарате Сокслета. Около 60,0г (точная навеска) измельченного сырья помещали в патрон из фильтровальной бумаги, и экстрагировали метанолом (400 мл) в течение 10 ч. Затем экстракт упаривали на роторном испарителе Heidolph® Laboratory 4002 control (337 mbar, температура 40 ± 5°C) до получения густого экстракта. После этого, густой экстракт очищали этилацетатом и н-бутанолом. Густой экстракт обрабатывали этилацетатом (1:10 вес / объем) в течение 6 часов при перемешивании, полученную смесь фильтровали. Этилацетат удаляли с помощью роторного испарителя (температура 40°C, 240 mbar). Остаток обрабатывали н-бутанолом 10% в пропорции (1:30 вес / объем) в течение 3 часов при перемешивании. Затем после удаления слоя н-бутанола проводили переосаждение сапонинов при подкислении раствором HCl до pH = 1,0. Осадок сапонинов отделяли фильтрацией с последующей сушкой.

Предложение используется на кафедре общей фармацевтической и биомедицинской технологии РУДН для обучения студентов 5 курса фармацевтического отделения медицинского факультета по теме "Производство экстракционных препаратов".

Зав. каф. Общей фармацевтической
и биомедицинской технологии РУДН,
кандидат фарм. наук, доцент С. Н. Суслина

удостоверяю.
Учёный секретарь аграрного факультета РУДН Т. В. Максимова

Приложение № 10

Федеральное государственное автономное образовательное

учреждение высшего образования

"Российский университет дружбы народов"

ЦЕНТР КОЛЛЕКТИВНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ
(НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР)

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Состав и технологии получения биорастворимых лекарственных полимерных пленок с сухим растительным экстрактом *Styrax officinalis*.

Кем предложен: кандидатом фарм. наук, доцентом кафедры Общей фармацевтической и биомедицинской технологии ФГАОУ ВО Российского университета дружбы народов Суслиной С. Н., аспирантом кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии ФГАОУ ВО Российского университета дружбы народов Хамама Зина (Сирия).

Где и кем внедрено: Учебно-производственный участок лаборатории промышленной фармацевтической технологии центра научных исследований и разработок ЦКП НОЦ. Производственная лицензия № 12149-ЛФ от 28.12.12 г.

Цель внедрения: Расширение ассортимента контрацептивных препаратов с местным спермицидным действием.

Результаты внедрения: Предложный состав и технология производства препарата (Биорастворимые полимерные пленки с растительным экстрактом *Styrax officinalis* 1%) апробированы в условиях учебно-производственного участка лаборатории промышленной фармацевтической технологии центра научных исследований и разработок ЦКП НОЦ.

По результатам апробации производства утвержден опытно-промышленной регламент на производства препарата (Биорастворимые полимерные пленки с растительным экстрактом *Styrax officinalis* 1%).

Эффективность внедрения: Расширение ассортимента контрацептивных препаратов с местным спермицидным действием.

Директор
ЦКП НОЦ РУДН
_____ Р. А. Абрамович
24 . 01 . 2018 г.

Приложение № 11

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993 Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

29.03.2018	017298	2018111180
Дата поступления	*Входящий №*	*Регистрационный №*

Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (дата регистрации)	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
	(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу	

☐ (86) (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи установленные получающим ведомством)

☐ (87) (номер и дата международной публикации международной заявки)

☐ (96) (номер евразийской заявки и дата ее подачи)

☐ (97) (номер и дата публикации евразийской заявки)

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (почтовый адрес: фамилия и инициалы или наименование адресата)

Князева Любовь Алексеандровна

Адрес 141100 Московская обл., г.Щелково, пл.Ленина, д.1, кв. 183

Телефон: 8-916-686-73-02 Факс: E-mail: kniazeva48@rambler.ru

АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (заполняется при подаче заявки на секретное изобретение)

ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение

В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация

(54) **НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

КОМПОЗИЦИЯ СПЕРМИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ВАГИНАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ТРИТЕРПЕНОИДНЫЕ САПОНИНЫ ИЗ *STYRAX OFFICINALIS L.*

(71) **ЗАЯВИТЕЛЬ** (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс)	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ
1. Хамама Зина (SY)	СНИЛС: 199-808-216 36 Паспорт N 012148524(SY) ДОКУМЕНТ (серия, номер)
☐ изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование) ☐ исполнителем работ по: ☐ государственному контракту ☐ муниципальному контракту заказчик работ (указать наименование) Контракт от №	КОД СТРАНЫ (если не установлен) RU
(74) **ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ** (указываются фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, назначенного заявителем своим представителем для ведения дел по получению патента от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или являющегося таковым в силу закона)	* ☐ патентный поверенный ☐ представитель по доверенности ☐ представитель по закону

Общее количество документов в листах	34	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия *(для промышленного образца)*	0	Совцо Ю.Д.
Количество платежных документов	1	

Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»