

ХАМАМА ЗИНА

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

14.04.01–технология получения лекарств

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва –2018

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГАОУ ВО РУДН)

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Суслина Светлана Николаевна

Официальные оппоненты:

Алексеев Константин Викторович - доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», главный научный сотрудник лаборатории готовых лекарственных форм, заместитель директора по инновационной деятельности

Шняк Елизавета Александровна - кандидат фармацевтических наук, Акционерное общество «Институт фармацевтических технологий», старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ВГУ»), г. Воронеж

Защита состоится « _____ » _____ 2018 г. в часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д.13

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 208.040.09

доктор фармацевтических наук,
профессор

Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 околоплодников стиракса лекарственного в опытах *in silico* и проведена компьютерная оценка плеiotропного 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.

Получена 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 сапонидах 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, рН, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследований

1.1. Объекты исследования: растительное сырье - околоплодники дикорастущего многолетнего кустарника или невысокого дерева стиракса лекарственного *Styrax officinalis* L., собранные в Сирии в период плодоношения с августа по октябрь в 2014-2016 гг. В работе использовали стандартный образец - Purified Quillaia Saponin HRS (EP standart), производства (Sigma-Aldrich, Германия).

Вспомогательные вещества (ВВ): полимер акриловой кислоты Carborol™

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).

1.2. Методы исследований: Измельчали свежее сырье - околоплодники которые получали после отделения семян из плодов - на электрической мясорубке Nova Meat Grinder (Китай), а высушенное сырье на аналитической мельнице Ика (Германия) со скоростью вращения 28 000 об./мин. Сушку сырья проводили в сушилках при температуре до 50°С или на открытом воздухе в сухую погоду в тени. (ГФ XIII, Общие методы анализа).

Микроскопический анализ сырья проводили на микроскопе Ломо, МИКМЕД – 1 (Россия), микроструктурный анализ - на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM (Jeol, Япония) – 6490LV при 30kV, детекторе SEM, размере электронного пучка 30, в высоком вакууме.

Аналитические методы: ТСХ – (Merck KGaA, Германия); ВЭЖХ PU-980– (JASCO, Великобритания); УЭЖХ Acquity UPLC® – (Waters, Ireland); МС–спектрометрия (Waters, США); ¹Н ЯМР-МС – «Jeol JNM-ECA 600» и «Jeol JNM-ECS 400» (Jeol, Япония), спектрофотометрия СФ-102 (Аквилон, Россия).

Технологические характеристики: на приборах: Flow Testers GT (Erweka, Германия), сыпучесть, SVM 101/201 - насыпная плотность (Erweka, Германия), влажность измеряли на влагомере (АВ-50 Аквилон, Россия); рН - на рН-метре S 80-K (Mettler Toledo, Испания).

Микробиологические методы *in vitro* - метод двукратных серийных разведений препаратов в жидких питательных средах.

Изучение специфической активности *in silico* – Программа MarvinSketch 17.1.23.0; Программа PASS (<http://www.way2drug.com/>).

Изучение спермицидной активности *in vivo* проведено по методике, описанной в научной литературе (С. С. Камаева, 2009).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программы Statistica MS Exsel.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Компьютерное моделирование фармакологической активности сапонинов стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.)

Для подтверждения целесообразности разработки препарата на основе БАВ *Styrax officinalis* L. в опытах *in silico* осуществлен прогноз биологической активности химических структур сапонинов, содержащихся в плодах растения (стиракс деацилсапонин, сапогенины стиракса А, В и С).

Полученные результаты компьютерной оценки плейотропного действия сапонина и сапогенинов стиракса лекарственного на основе анализа зависимостей «структура-активность» программой PASS показали, что каждая структура имеет около 300 прогнозируемых активностей с высокими значениями P_a (probability to be active) и низкими значениями P_i (probability to be inactive), что предполагает высокую фармакологическую активность. Наиболее значимые данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты прогнозирования биологической активности химических структур сапонинов стиракса с помощью программы PASS

Биологическая активность	Стиракс деацилсапонин		Сапогенины стиракса					
			А		В		С	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Гепатопротектор	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
Химиопротектор	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

P_a : probability to be active, P_i : probability to be inactive

Таким образом, выявлено, что сапонины стиракса обладают спермицидной активностью и являются антагонистами целостности мембран, что позволяет использовать прогнозировать перспективность использования их в составе местного контрацептивного средства.

2.2. Изучение сырья «стиракса лекарственного околоплодники»

Высушенные плоды стиракса лекарственного, собранные в Сирии (рисунок 1а) - у стираксовых плоды костянки или деревянистые нераскрывающиеся плоды многосемянные ягоды шарообразной формы с остающейся чашечкой, диаметром 7-25 мм с вариабельной окраской от светло-коричневого до светлого серо-зеленоватого. Один плод содержит до 3-х крупных яйцевидных семян (рисунок 1б). Во фрагментах околоплодника 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 1с).

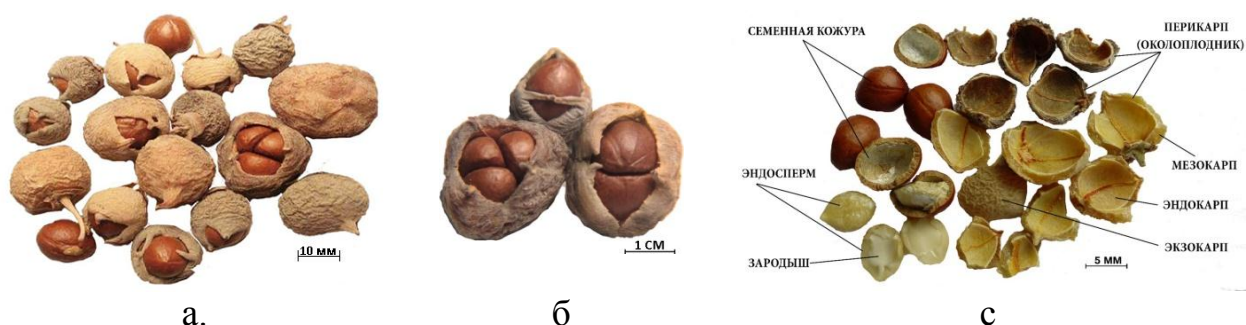


Рисунок 1. Внешние признаки высушенных плодов стиракса лекарственного

С помощью оптической и электронной микроскопии в анатомическом строении околоплодника стиракса лекарственного охарактеризованы экзо-, мезо- и эндокарп (рис. 2).

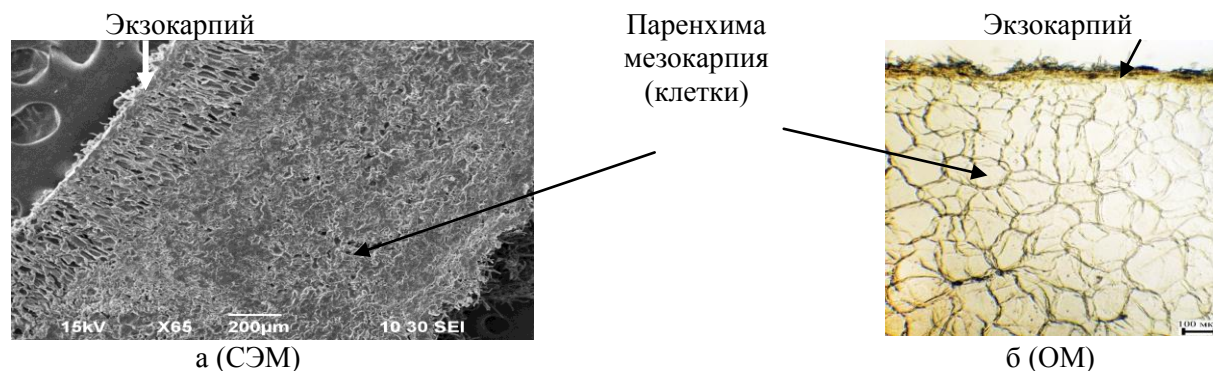
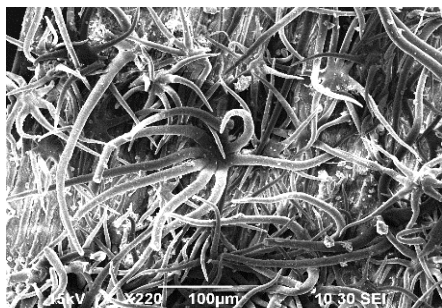


Рисунок 2. Поперечный срез экзо- и мезокарпия околоплодника стиракса лекарственного

Поверхность экзокарпа плодов густо покрыта звёздчато-лучистыми многоклеточными трихомами, клетки которых расположены в 2-4 слоя. Волоски состоят из 4-12 заостренных клеток, выходящих из одного основания в разные стороны, толщина волосков: 6-9 мкм (рис. 3).



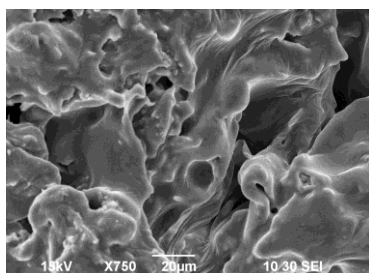
а (СЭМ)



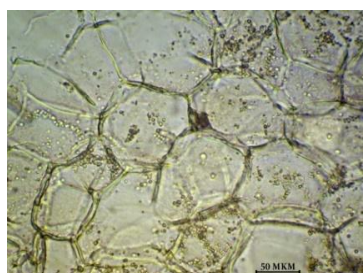
б (ОМ)

Рисунок 3 . Многочисленные звездчатые трихомы на поверхности экзокарпа

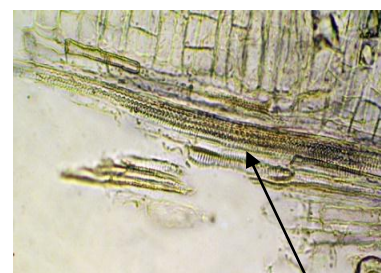
Мезокарп состоит из крупных, округлых к наружной части и вытянутых со слабо извилистыми стенками к внутренней части околоплодника клеток. Проводящие элементы расположены в мезокарпе ближе к внутренней поверхности околоплодника. Рядом с ними встречаются одиночные склеренхимные клетки или их группы по 2-3 клетки (рис. 4). В примыкающих к экзокарпию клетках содержатся хлоропласты, а клетки, примыкающие к эндокарпию, нередко служат местом скопления крахмальных зёрен (рис 4: б).



а (СЭМ)



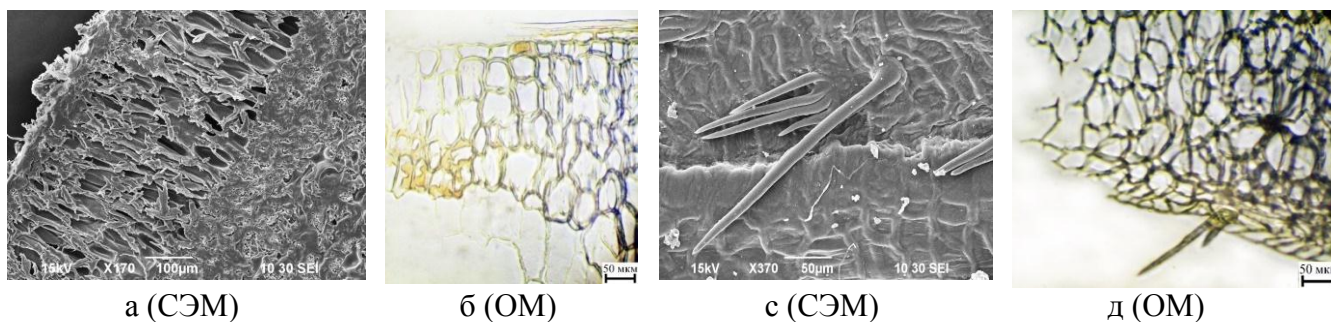
б (ОМ)



с (ОМ) Сосуды

Рисунок 4. Срез мезокарпия околоплодника стиракса лекарственного

Эндокарп представлен толстостенными пористыми клетками 30x50 мкм. Поверхность эндокарпа ровная, местами с выемками. Главная часть эндокарпа представлена склеренхимой. На эндокарпе также имеются трихомы, состоящих из одной или нескольких длинных заостренных клеток, выходящих из одного основания. В отличие от трихом экзокарпия они расположены спорадически (рисунок 5).



а (СЭМ)

б (ОМ)

с (СЭМ)

д (ОМ)

Рисунок 5. Поперечный срез эндокарпия стиракса лекарственного

Также были установлены некоторые показатели для раздела «Испытания» проекта НД на сырье. Результаты представлены в таблице 2. Работа над установлением норм остальных показателей таких как (тяжелые металлы, радионуклиды, остаточные количества пестицидов) продолжается.

Таблица 2. Некоторые характеристики высушенных околоплодников стиракса лекарственного

Показатель	Норма	Показатель	Значение, мл/г
Влажность, %	не более 4,5	Коэффициент водопоглощения	2,3
Зола общая, %	не более 1,0	Коэфф. поглощения метанола	0,77
Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	не более 0,1	Коэфф. поглощения спирта 96%	0,73
Дисперсный состав	частиц размером более 2 мм, не более 15%; частиц размером менее 0,25 мм, не более 20%		

2.3. Разработка технологии сухого экстракта околоплодников стиракса лекарственного

Выделение суммы сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного проводилось методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета метанолом и спиртом этиловым различной концентрации, при соотношении сырья и экстрагента 1:5, при температуре 55-60°C. После упаривания в вакууме (230 мбар) при 66°C первичное извлечение последовательно обрабатывали сначала этилацетатом (1:10 вес/объем), потом н-бутанолом (1:30 вес/объем). При подкислении очищенного извлечения раствором кислоты хлористоводородной до pH=1,0 выпадал осадок, который отфильтровывали на воронке с бумажным фильтром и сушили на воздухе при комнатной температуре, затем в вакуум-сушильном шкафу, до полного удаления растворителя и соляной кислоты. Полученный сухой экстракт, содержащий сумму сапонинов, - аморфные частицы от светло-кремового до кремового цвета с серым оттенком, со специфическим запахом. Результаты подбора условий экстрагирования представлены в таб. 3.

Таблица 3. Технологические параметры выделения СЭСЛ

Технологические параметры	Экстрагент				Фракция сырья, мм			
	метанол	спирт 96%	спирт 90%	спирт 70%	сквозь сито 0,25	на сите 0,25	на сите 0,5	на сите 1
Выход СЭСЛ, %	39,45	31,75	32,63	35,23	8,36	36,99	35,06	32,38
Технологические параметры	Время экстракции, ч.							
	4	5	6	8	9	10	11	13
выход %	30,7	31,81	34,07	34,29	34,66	34,64	34,55	34,43

Максимальный выход сухого экстракта из сырья достигал 39,45% при экстрагировании метанолом и 35,23% - спиртом 70%. Наиболее технологичной фракцией измельченного сырья признаны частицы 0,25-0,5 мм. Экономически целесообразным можно считать 8-10 циклов экстракции в течение 6-7 часов.

Этапы выделения и очистки суммы сапонинов из околоплодников стиракса лекарственного представлены на рисунке 6.



Рисунок 6. Технологическая схема выделения сапонинов из высушенных околоплодников стиракса лекарственного

Присутствие сапонинов в полученном по разработанной методике СЭСЛ подтверждено с помощью качественных реакций (пенообразование, реакции Санье и Сальковского, гемолиз эритроцитов), давших положительные результаты.

Проведено сравнение УФ, ВЭЖХ-УФ и Масс-спектров СЭСЛ и сапонинов, выделенных при помощи препаративной ТСХ из стандартного образца Purified Quillaia Saponin (CO PQS) (рис. 7). На ТСХ наблюдаются зоны адсорбции (при 245 нм / детектор-раствор взвеси дефибринированной крови) белого цвета с Rf около 0,68 - СЭСЛ и Rf около 0,55 – CO PQS.

Результаты УФ-спектрофотометрии СЭСЛ (А) и CO PQS (Б) на соответствующем участке хроматографической пластины приведены на рис. 8.

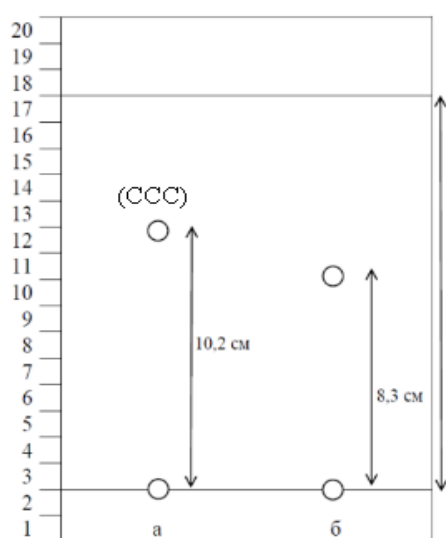


Рисунок 7. ТСХ-хроматограмма растворов сапонинов из;
а – СЭСЛ, б – CO PQS в системе хлороформ-метанол-вода (6:3:1).

Спектр поглощения растворов выделенных сапонинов в области 230 -365 нм имеет максимумы поглощения при 270 ± 1 нм и 315 ± 1 нм.

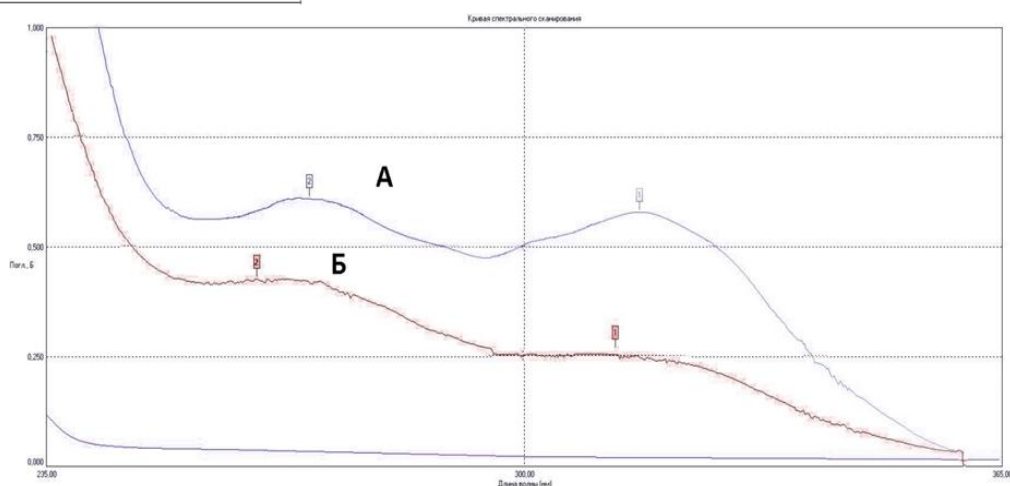


Рисунок 8. УФ-кривые спектрального сканирования растворов сапонинов стиракса лекарственного (А- из СЭСЛа; Б- из ССС).

Были получены ВЭЖХ профили для СЭСЛ (А) и ССС (Б). На ВЭЖХ СЭСЛ идентифицированы 4 пика (Рисунок 9).

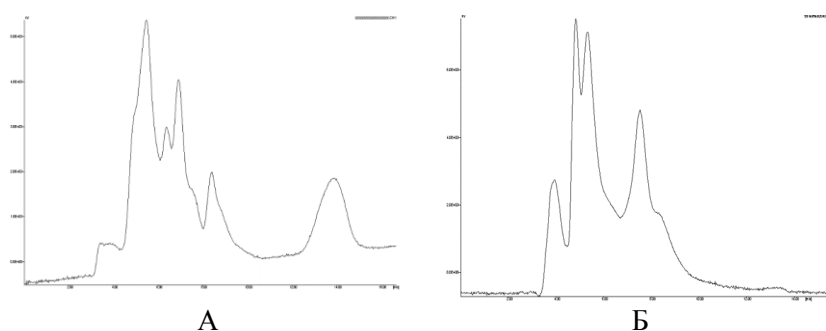


Рисунок 9. ВЭЖХ-УФ (260 нм) профили растворов сапонинов стиракса лекарственного (А – СЭСЛ, Б – ССС).

С помощью УЭЖХ-ВРМС в сумме сапонинов идентифицирована часть пиков с помощью данных справочной литературы по временам удерживания от 3,7 до 6,18 мин и молекулярным массам, которые соответствуют сапонинам стиракса лекарственного. УЭЖХ-МС профиль пиков представлен на рис. 10.

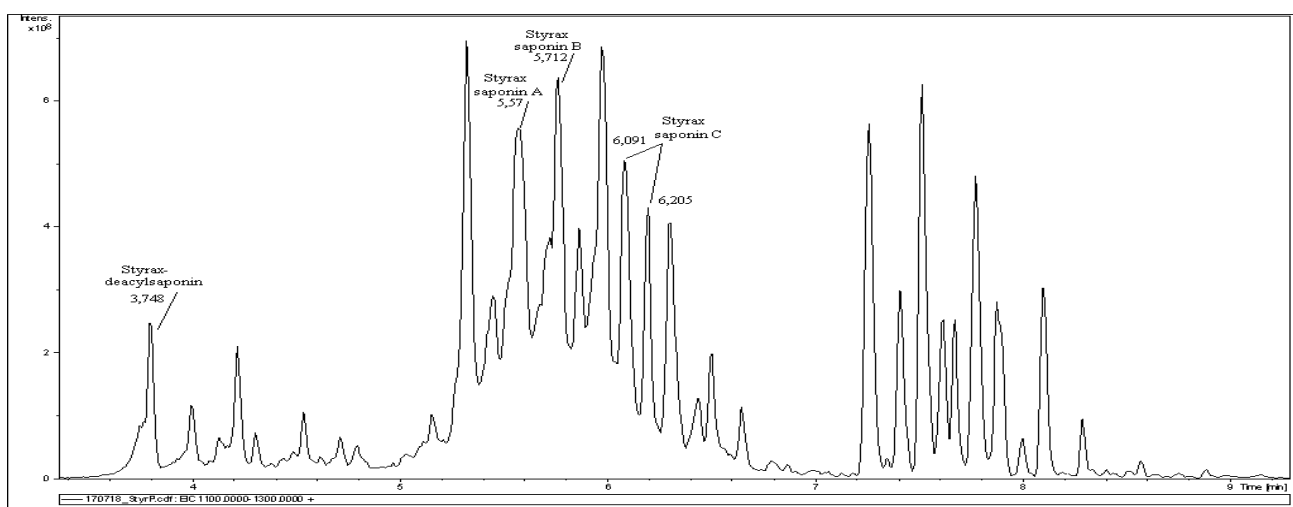


Рисунок 10. УЭЖХ-МС профиль отрицательных m/z в диапазоне 1100-1300, характерных для сапонинов *Styrax officinalis* L.

Для количественного определения сапонинов в СЭСЛ разработана и валидирована методика ЯМР- ^1H спектрометрии. Спектр ЯМР ^1H сухого экстракта стиракса представлен на рис. 11.

Для количественного определения измеряют 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 – влажность, %.

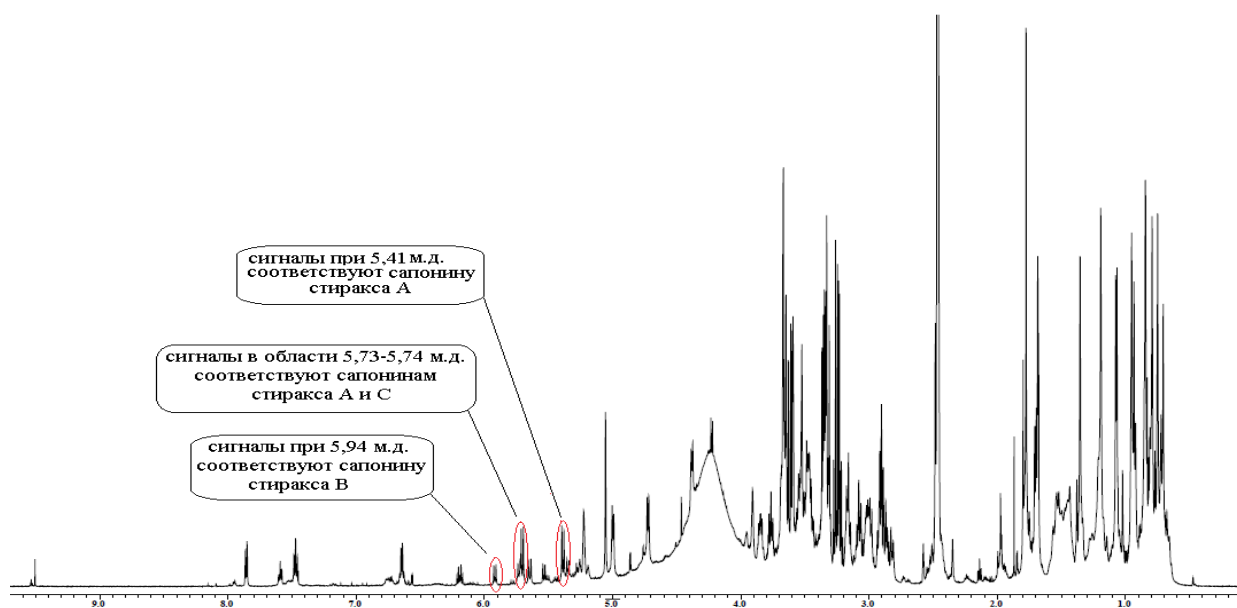


Рисунок 11. Спектр ЯМР ^1H сухого экстракта стиракса лекарственного. Содержание сапонинов А, В, С в полученных образцах СЭСЛ по разработанной методике количественного определения составило не менее $28,3 \pm 0,66$ %.

2.4. Исследование биологической активности СЭСЛ в опытах *in vitro*

Спермицидная активность СЭСЛ *in vitro* на образцах спермы нормального эякулята человека зафиксирована цитологически. При добавлении 0,5% раствора СЭСЛ в 0,9% натрия хлорида, подвижных и живых спермиев через 30 секунд не наблюдается.

Установлена антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий *S.aureus* 209-Р, грамотрицательных бактерий *E.coli* ATCC 25922, *Pr.vulgaris* ATCC 6896 и *Ps.aeruginosa* ATCC 9027, также дрожжеподобных грибов *C.albicans* ATCC 10231 – в концентрации 2000-4000 мкг/мл, и сильная антимикотическая активность в отношении *Microsporum canis* 252– в концентрации 31,2 мкг/мл.

Доказанная спермицидная, антимикробная и антимикотическая активность СЭСЛ свидетельствует о целесообразности его использовании в составе вагинальных форм контрацептивного действия. Также была рассчитана доза СЭСЛ - 0,025 г на одно применение.

2.5. Разработка состава, технологии и методик стандартизации спермицидной плёнки на основе СЭСЛ

Для обоснования состава спермицидных пленок были приготовлены образцы пленочной основы и пленок с СЭСЛ, включающих наиболее подходящие компоненты для вагинального применения, составы представлены в таблице 4.

Таблица 4. 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	-	-
Сухой экстракт стиракса	-	-	-	-	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Нейтрализующий агент	до pH 6-8									
Вода очищенная	до 100,0									

На основании оценки плёнок органолептически и по таким технологическим показателям как: однородность, отсутствие микротрещин, разрывов, механических включений и пузырьков воздуха; хорошее отставание от подложки, избыточная липкость, эластичность, характер поверхности; время дезинтеграции, время растворения - выбран состав 10.

Методика получения вагинальной пленки ВСПЭС

Пленки получали в асептических условиях. Готовили пленочную основу и раствор СЭСЛ. Смешивали, после деаэрации пленочную массу разливали на полимерную подложку, сушили при комнатной температуре, снимали с подложки, дозировали. Технологическая схема представлена на рисунке 12.

Описание: прозрачные пленки светло- желтого цвета, без воздушных включений, с гладкой не липкой поверхностью, легко складываются, без запаха и вкуса, на изломе – однородные. Размер пленок 5×5 см, масса 0,22±0,02 г., толщина 206,03±5,1 мкм, содержание влаги не более 16,0%, pH раствора пленки в

20 мл воды очищенной рН = $4,5 \pm 0,02$, визуально фиксируется потеря формы пленки за $20,5 \pm 4,04$ секунд и время растворения пленки за $64,67 \pm 5,68$ секунд.

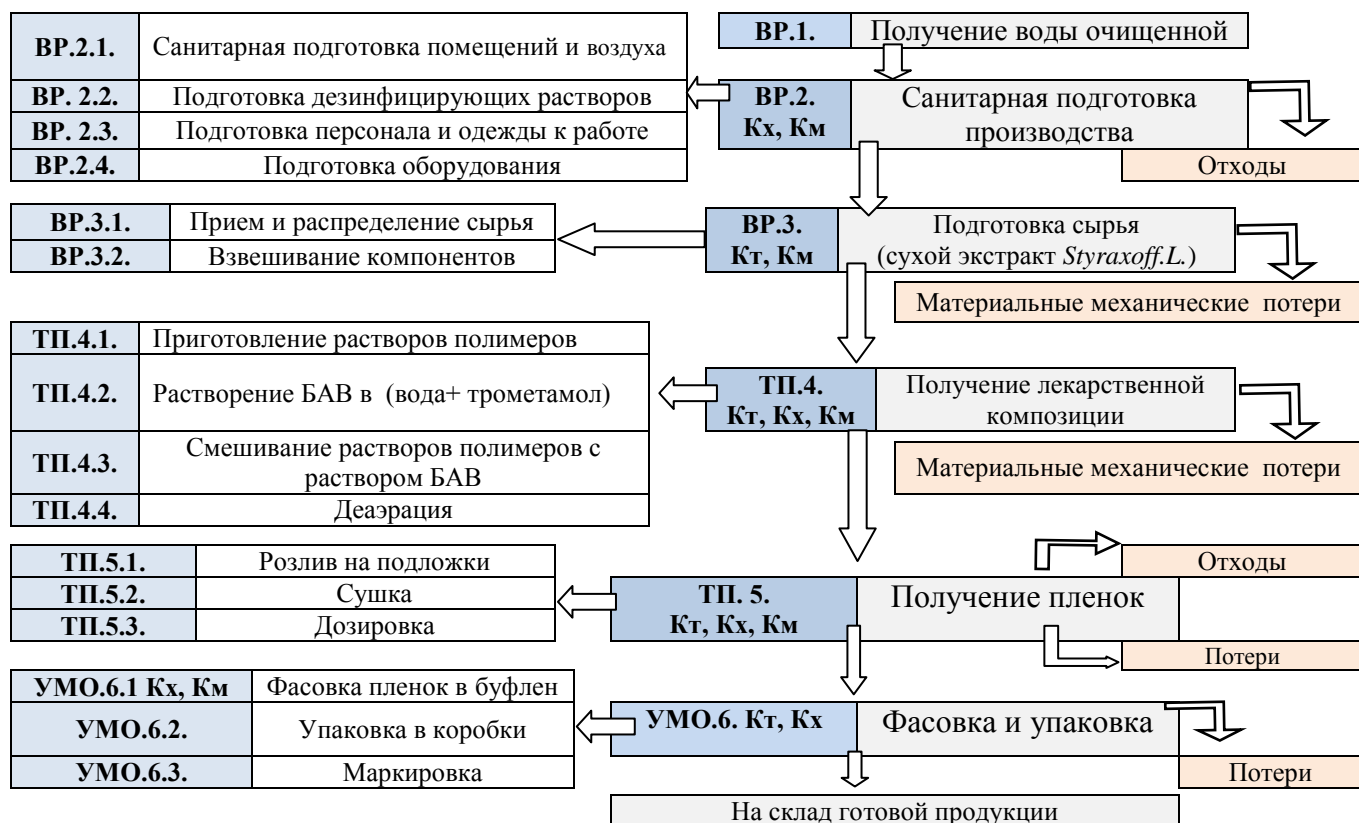


Рисунок 12. Технологическая схема производства вагинальных пленок с сапонидами стиракса

Для качественного и количественного определения сапонинов стиракса в пленках была разработана и валидирована методика ЯМР ^1H . В результате анализа установлено, что пленка содержит 5,6 мг суммы сапонинов А и С и 1,2 мг сапонины В, что эквивалентно 96% содержанию сапонинов в пленке. Спектр ЯМР ^1H сапонинов стиракса ВСПЭС представлен на рисунке 13.

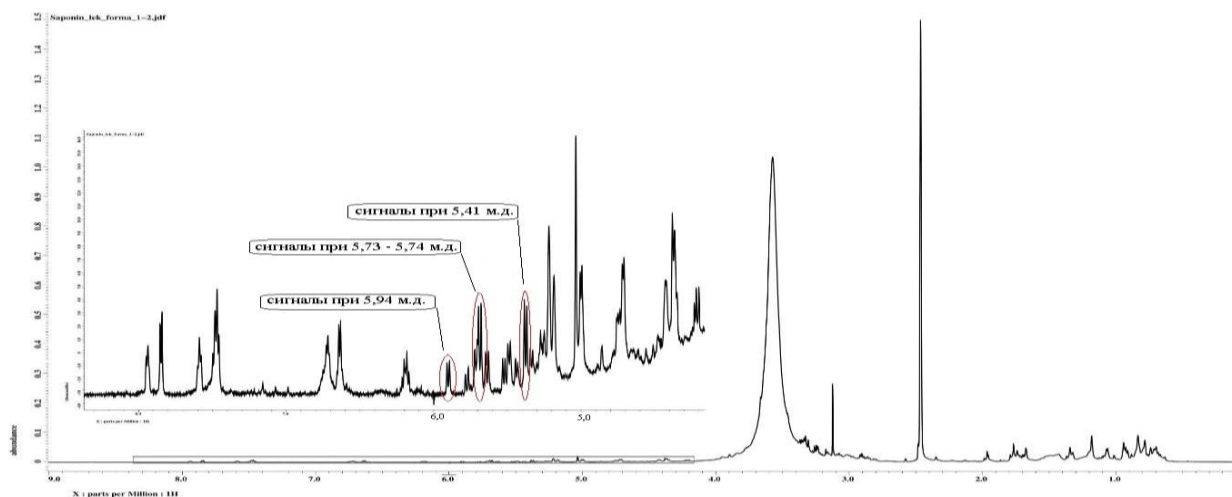


Рисунок 13. Спектр ЯМР ^1H сапонинов стиракса из ВСПЭС

Высвобождение суммы сапонинов из ВСПЭС оценивалось при контакте с со средой высвобождения (СВ) в качестве которой использовался раствор уксусной кислоты 0.001 М рН (3,5-4,5), контролем являлась вода, по результатам титрования потенциометрически стандартным раствором NaOH (0,0125 моль/л) до рН7,0. Результаты высвобождения для 6 образцов представлены на рисунке 14.

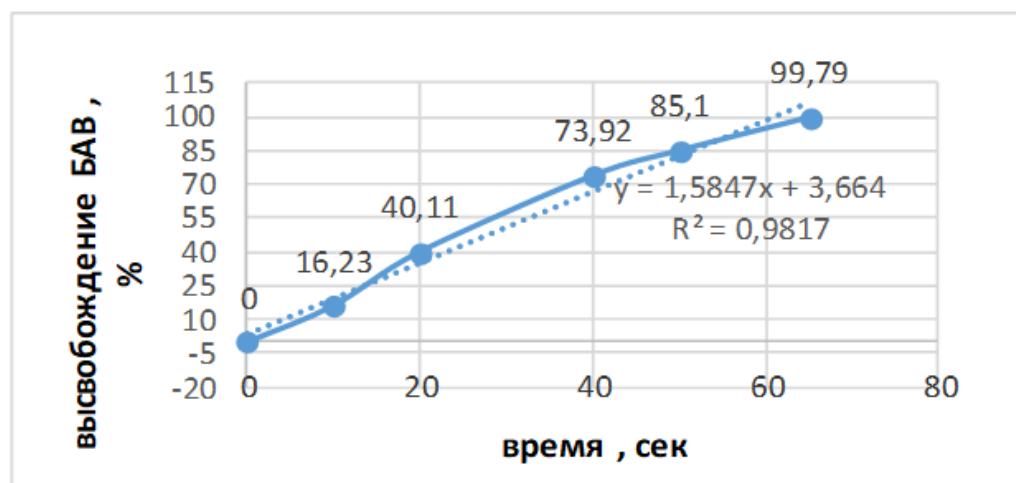


Рисунок 14. Высвобождение сапонинов из ВСПЭС

В результате установлено, что БАВ полностью высвобождаются через минуту при полном растворении плёнки.

Определение подлинности ВСПЭС осуществлялось методом ТСХ по принципу сквозной стандартизации, представлены на рис. 15, и при длинах волн 270 ± 1 нм и 315 ± 1 нм на рис.16 УФ-СФМ.

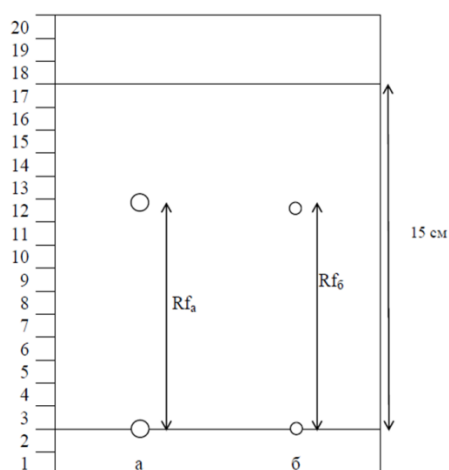


Рисунок 15. Хроматограмма растворов сапонинов из:
 а – СЭСЛ;
 б – ВСПЭС в метаноле.

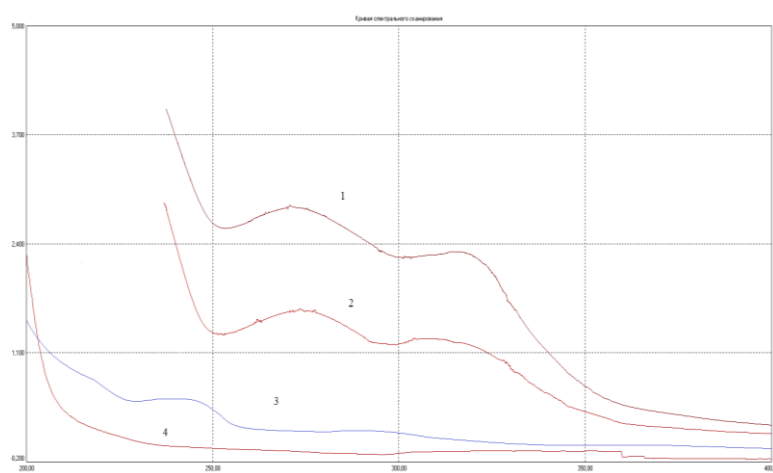


Рисунок 16. УФ-кривые спектрального сканирования растворов:
 1- СЭСЛ; 2 - ВСПЭС в метаноле;
 3 -основы; 4-метанола.

Для установления срока годности хранения ВСПЭС осуществляли в упаковке из буфлена в течение 24 месяцев при $25 \pm 2^\circ \text{C}$ и относительной влажности воздуха $60 \pm 5\%$ в термостате ТС-1/20 СПУ (Россия). Каждые 6 месяцев определяли следующие показатели; описание, подлинность, рН, однородность дозирование, время растворения пленки, количественное содержание суммы БАВ, МБЧ и массу содержимого упаковки. Результаты свидетельствуют о возможности установления срока годности - 24 месяца.

2.6. Изучение специфической активности ВСПЭС в опыте *in vivo*

Контрацептивное действие исследовалось на базе Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр) (ЦКП (НОЦ)) РУДН и вивария РУДН, на 45 половозрелых крысах, в качестве препарата сравнения использовали «Фарматекс, крем вагинальный» (Франция).

ВСПЭС вводили животным в виде 1,5% геля СЭСЛ. Исследование ВСПЭС выявило контрацептивную активность в 90 % случаев, сопоставимую с зарубежным препаратом (таблица 5).

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

Группа	Количество самок в в группе, шт.			Эффективность контрацептивного действия, %
	Всего	Забеременевших	Не беременных	
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

Одновременно было установлено отсутствие местного раздражающего действия, поскольку ни у одного из животных не было отмечено изменений внешнего вида видимых слизистых оболочек влагалища, появления экссудата, эритем, гиперемии, ссадин.

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– Н¹;
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– Н¹.
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*.

Практические рекомендации

Результаты диссертационного исследования могут быть внедрены в учебный процесс для студентов по дисциплинам «Фармацевтическая технология», «Фармацевтическая химия», «Фармакология» и «Фармакогнозия». Возможно 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Хамама, З.** Разработка и валидация методики количественного определения содержания тритерпеновых сапонинов в сухом экстракте из околоплодников стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.)/ **З. Хамама, В. А. Ивлев, С.Н. Суслина, С. Лазар** // **Здоровье и образование в XXI веке.**-том 20.- № 6.- 2018.- С.88-92.
2. **Хамама, З.** Анатомо-диагностические признаки и числовые показатели нового вида лекарственного растительного сырья стиракса лекарственного околоплодники/ **З. Хамама, А., С. Н. Суслина и др.**// **Вестник новых медицинских технологий.**-том 12.- № 3.- 2018.- С. 153-158.
3. **Хамама, З.** Особенности использования контрацептивных средств в Сирии/ **З. Хамама, А. С. Хомик, С. Н. Суслина**// **Фармация.**-том 66.- № 2.- 2017.- С. 11-14.
4. **Хамама, З.** Обзор рынка контрацептивных лекарственных препаратов спермицидного действия в настоящее время./ **З. Хамама, А. С. Хомик, С. Н. Суслина** // **Вестник новых медицинских технологий.**- том 24.- № 3.- 2017.- С.109-115.
5. **Хамама, З.** Фармакогностическое изучение околоплодников *Styrax officinalis* L. Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине/ **З. Хамама, А. С. Хомик, С. Н. Суслина** //Сборник V научно-практической конференции - Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине.- Москва.- 2017.- С. 232-235.
6. **Хамама, З.** Разработка технологии получения сухого экстракта из околоплодников *Styraxofficinalis* L. методом циркуляционной экстракции./ **З. Хамама, А. С. Хомик, С. Н. Суслина, А. А. Савосина, Д. В. Радева** // Сборник научных трудов по итогам IV Международной научно-практической конференции - Актуальные проблемы и достижения в медицине.- Самара.- 2017.- С. 110-113.
7. **Хамама, З.** Целевые низкомолекулярные фрагменты метаболома *Styrax officinalis* L. в составе инновационных лекарственных форм./**З. Хамама, Хомик, С. Н. Суслина**//Сборник научных трудов пятой научно-практической конференции-Молодые ученые и фармация XXI века.- Москва.- 2017.- С. 56.

8. **Хамама, З.** Компьютерное моделирование фармакологической активности сапонинов стиракса лекарственного./ **З. Хамама, Р. Мусса, С. Н. Суслина**//Сборник материалов XXV Российского национального конгресса - Человек и лекарство.- Москва.- 2018.- С.92.
9. **Hamama, Z.** Morphological characterization of fruits of Syrian medical plant (*Styrax officinalis*) – determination of saponin content/ **Z. Hamama, A.S. Khomik, S.N. Suslina** //Сборник научных трудов по итогам III Международной научно-практической конференции - Проблемы медицины в современных условиях. - Казань.- 2016г.- С.169-173.
10. **Hamama, Z.** Computer aided prediction of biological activity spectra for secondary metabolites present in *Styrax officinalis*. / **Z. Hamama, A.S. Khomik, S.N. Suslina** //Материалы VIII Международной научной конференции-Science4health 2017.- Москва.- 2017.- С. 27.
11. **Hamama, Z.** Isolation and detection of saponins from the Syrian medical plant – *Styrax officinalis*/ **Z. Hamama, A.S. Khomik, S.N. Suslina** //МатериалыVII международной научной конференции -Science4Health 2016.- Москва.- 2016.- С. 18-19.
12. **Hamama, Z.** The scope of Vaginal drug delivery system – review./ **Z. Hamama** //Сборник статей по материалам IVмеждународной научно-практической конференции- Современная парадигма научного знания: актуальность и перспективы.- Москва.- 2016.- С. 113-117.
13. **Hamama, Z.** The chemical investigations on the Syrian plant *Styrax officinalis*./**Z. Hamama**//Сборник статей по материалам IV международной научно-практической конференции- Современная парадигма научного знания: актуальность и перспективы.- Москва.- 2016.- С. 118-122.
14. **Hamama, Z.** Contraceptives Usage Patterns Among Syrian Women, the Obstacles and Abortion Rate/ **Z. Hamama, S. N. Suslina** // Сборник статей по материалам III международной научно-практической конференции- Современная парадигма научного знания: актуальность и перспективы.- Москва.- 2015.- С. 176-178.

Список сокращений

БАВ – биологически активные вещества
 ВСПЭС – вагинальные спермицидные пленки с экстрактом околоплодников стиракса лекарственного
 МБЧ – микробиологическая чистота
 МС – масс-спектрометрия
 ОМ – оптический микроскоп
 ПМР – протонный магнитный резонанс
 СО PQS – стандартный образец сапонины (Purified Quillaia Saponin)
 ССС – сумма сапонинов стиракса.
 СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
 СЭСЛ – сухой экстракт стиракса лекарственного
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 УФ - СФМ – ультрафиолетовая спектрофотометрия