

УДК 615.322:582.681.81:581.442.014.22:615.454.1.07.

РАЗРАБОТКА ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОЙ МАЗИ С ЭКСТРАКТОМ ПОЧЕК *POPULUS NIGRA*

Разработана новая лекарственная форма -20% мазь с экстрактом тополя черного на основе ПЭГ. Определены оптимальные условия приготовления и технологические свойства мази. Мазь обладает высокой степенью биодоступности в эксперименте *in vitro*. Исследованы антимикробные свойства мази в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Разработаны методики стандартизации флавоноидов в новом препарате растительного происхождения – мази с экстрактом почек тополя. Количественное определение флавоноидов в мази проведено методом спектрофотометрии. Средняя относительная погрешность определения при $P=95\%$ не более 2,04%.

Ключевые слова: мазь, экстракт почек тополя черного, флавоноиды.

Н.В. Никитина
С.Н. Степанюк

*Пятигорская
государственная
фармацевтическая
академия*

e-mail: n_niki7@mail.ru

В связи с возрастающей потребностью здравоохранения в лекарственных препаратах растительного происхождения актуальной задачей является получение новых эффективных лекарственных средств. Преимущество фитопрепаратов объясняется более мягким действием и малой токсичностью, что позволяет их использовать для профилактики и длительного лечения многих заболеваний без выраженного побочного действия [3].

Объектом нашего исследования являются почки тополя черного /*Populus nigra*/, которые издавна применяются в качестве бактерицидного, ранозаживляющего, противовоспалительного средства. Их используют для лечения гнойничковых и грибковых заболеваний кожи, при заболеваниях суставов, подагры, ревматизма, радикулита, при воспалениях различного характера [1]. Широкий спектр фармакологического действия почек тополя обусловлен присутствием в них комплекса БАВ гидрофильного и липофильного характера: эфирного масла, в состав которого входят терпеноиды, содержащие цинеол, популен и др.; флавоноиды – около 20 соединений, основными из которых являются пиноцембрин, фенилпропаноиды, фенолкарбоновые кислоты и др.[10,12]. В литературе имеются данные, что по своему химическому составу почки тополя близки к прополису – продукту жизнедеятельности пчел [9]. Поэтому почки тополя черного являются перспективным сырьем для получения лекарственных средств.

Прогрессивным методом более полного выделения природных фитокомплексов является двухфазное экстрагирование растительного сырья системами несмешивающихся растворителей различной полярности. Этот способ позволяет одной технологической операцией извлекать из растительного сырья и липидные и гидрофильные соединения, что обеспечивает расширение поликомпонентного состава БАВ, их более полное извлечение [7].

Целью настоящего исследования является выбор оптимальной мазевой основы для создания мягкой лекарственной формы, разработка способов стандартизации дерматологической мази на основе почек тополя черного двухфазного экстракта и изучение ее антибактериальной активности.

Экспериментальная часть. На терапевтический эффект мазей большое влияние оказывает характер основ, которые отличаются большим разнообразием и способны оказывать существенное влияние на высвобождение действующих веществ отвечающих за необходимый лечебный эффект. Это обуславливается разнообразием физико-химических свойств как действующих, так и вспомогательных веществ, используемых при разработке мазевой композиции.[2, 13]. В работе использовали почек

тополя черного экстракт жидкий, полученный нами с использованием метода двухфазной экстракции в присутствии ПАВ [11].

Был осуществлен выбор оптимальной мазевой основы, обеспечивающей максимальный терапевтический эффект мази: местное воздействие на очаг поражения и резорбтивное действие. Для выбора мазевой основы было приготовлено несколько композиций мазей с использованием различных носителей: липофильных, гидрофильных, эмульсионных. В качестве компонентов гидрофильных основ использовали ПЭГ-400, ПЭГ-1500, ПЭГ-4000, ДМСО, растворы Na-КМЦ, глицерин, твин-80, воду очищенную. Компонентами эмульсионных основ явились ПЭГ-400, твин-80, вазелин, эмульгатор Т-2, вода очищенная, а компонентами липофильных – масло подсолнечное, аэросил-300, эмульгатор Т-2, твин-80, свиной жир, вазелин. Все мазевые композиции содержали 20% почек тополя черного двухфазного экстракта жидкого.

Мази готовили в соответствии с физико-химическими свойствами компонентов основ. Технология получения дерматологических мазей состояла из следующих стадий: подготовка мазевой основы, введение в нее двухфазного экстракта почек тополя черного, гомогенизация, структурирование с повторной гомогенизацией, фасовка и упаковка мази. Полученные образцы мазей представляли собой однородную массу светло – желтого цвета с характерным запахом экстракта.

С развитием биофармации особое место в оценке качества лекарственных препаратов занимает определение высвобождения действующих веществ в опытах *in vitro* [13]. Часто при изучении аппликационных лекарственных форм используют методы, основанные на диализе. Изучение высвобождения позволяет проводить сравнительное исследование основ и других вспомогательных веществ, обеспечивающих влияние на эффективность лекарственной формы – мазей резорбтивного действия. Критерием оценки используемых основ в мазях служили скорость и степень высвобождения действующих веществ (флавоноидов, содержащихся в двухфазном экстракте) из различных мазевых составов. Определение проводили методом прямой диффузии в 2% агаровый гель, содержащий раствор железа (III) хлорида в качестве индикатора. Количество высвободившейся суммы действующих веществ из мази определяли по диаметру зоны окраски с индикатором. Степень высвобождения флавоноидов из образцов мази представлена на рис. 1.

Д, мм

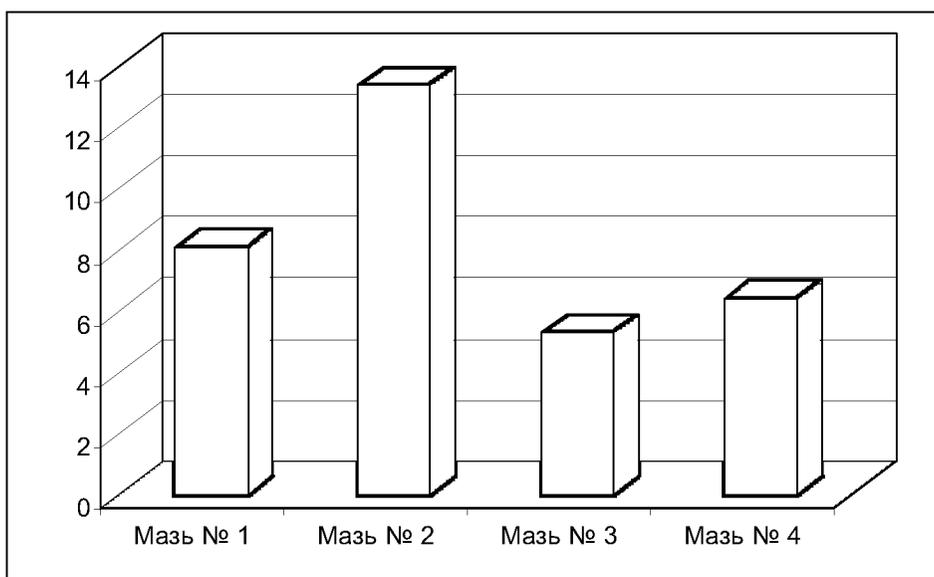


Рис. 1. Диаграмма степени высвобождения действующих веществ (флавоноидов) из мазей на различных основах.

Примечание: мазь №1 на основе эмульсионной; мазь №2 на основе – сплав ПЭГ-1500 – ПЭГ-400 (6:3); мазь №3 на основе – жир свиной очищенный; мазь №4 (олеогель) на аэросиле-300

Установлено, что максимальная степень высвобождения действующих веществ в модельных опытах *in vitro* обеспечивает мазевая основа №2, представляющая собой сплав ПЭГ-400 с ПЭГ-1500. Результаты исследований позволили считать ее оптимальной основой для мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного.

Сравнительное определение антимикробной активности мазей основ и двухфазного экстракта почек тополя черного проводили методом диффузии в агар, зараженный тест-микроорганизмами [6]. В качестве тест-культур использовали следующие культуры микроорганизмов: 1 – *Staphylococcus aureus* (209); 2 – *Staphylococcus aureus* (Type); 3 – *Staphylococcus epidermidis* Wood-46; 4 – *Escherichia coli* 675; 5 – *Escherichia coli* 055; 6 – *Salmonella typhimurium*; 7 – *Shigella flexneri*; 8 – *Shigella sonnei* 3d; 9 – *Pseudomonas aeruginosa*; 10 – *Bacillus subtilis* L₂; 11 – *Bacillus anthracoides* – 96.

Через 18 часов замеряли диаметр зоны угнетения роста микроорганизмов в мм. Полученные результаты свидетельствовали о наличии противомикробной активности у двухфазного экстракта почек тополя: он обладает бактериостатическим действием в отношении *Escherichia coli* 055, *Bacillus subtilis* L и выраженной бактерицидной активностью в отношении всех остальных используемых в опыте кокковых культур, бацилл и энтеробактерий. Что касается мазевых основ, то наибольшую антибактериальную активность проявляли мази, приготовленные на сплавах ПЭГ.

В настоящее время необходимым этапом разработки мягких лекарственных форм является изучение их реологических свойств [13]. Структурно – механические свойства выбранной мази на сплаве ПЭГ изучали на ротационном вискозиметре РВ-8 после 30 мин термостатирования при температуре 20°C. [14]. Кинетику структурообразования исследуемой системы изучали в области изменения градиента скорости течения от малых к большим и от больших к малым скоростям. Минимальная масса груза составила 10г, так как при грузе с меньшей массой не происходило вращение внутреннего цилиндра вискозиметра. При общей массе грузов более 80г время оборотов системы переставало изменяться. С помощью секундомера определяли время 4 оборотов вращающейся системы вискозиметра. Далее проводили исследования с использованными ранее массами грузов, но в обратном порядке. Пластическую вязкость вычисляли по формуле:

$$\eta = K \cdot \frac{P - P_0}{N},$$

где P – сумма двух равных грузов, подвешенных на обоих нитях прибора;

P₀ – собственное трение подшипников;

N – число оборотов цилиндра вискозиметра в секунду;

K – постоянная ротационного вискозиметра (0,393).

Результаты исследований реологических свойств мази представлены в табл.1.

Таблица 1

Исследование реологических свойств мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного

Общий вес груза, г (P)	Время, с		Число оборотов		Число оборотов (N), с ⁻¹		Вязкость, пуаз (η)	
	18,4	17,8	4	4	0,2174	0,2247	31,6352	30,6075
30	11,5	9,7	4	4	0,3960	0,4124	31,0739	26,2064
40	7,1	5,5	4	4	0,5634	0,7273	26,1581	20,2633
50	4,4	4,1	4	4	0,9091	0,9756	20,5340	19,1344
60	3,2	2,9	4	4	1,2500	1,3793	18,0780	16,3833
70	2,6	2,5	4	4	1,5384	1,6666	17,2437	16,5797
80	2,1	2,1	4	4	1,9048	1,9048	15,9899	15,9899

Согласно полученных результатов зависимости скорости вращения цилиндра прибора от нагрузки, получили «восходящую» кривую, которая в совокупности с «нисходящей» кривой, построенной при снятии нагрузки, образует петлю гистерезиса. На основании проведенных исследований были построены реограммы течения мази. Реограмма течения мази отражена на рис. 2.

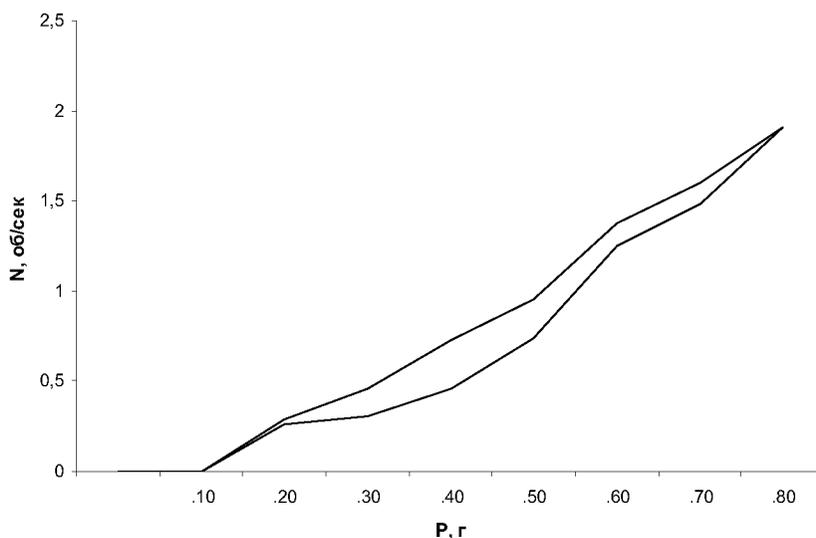


Рис. 2. Реограмма течения мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного

Реограмма течения мази, приготовленной на сплаве ПЭГ, характеризуется небольшой площадью под кривой петли гистерезиса, выраженной узостью петли, что говорит о достаточной стойкости мази к технологическим воздействиям (на стадиях гомогенизации, фасовки и транспортировки), способности легко выдавливаться из туб, хорошей аппликационной и намазывающей способности. Данные реологических исследований таких характеристик как эффективная вязкость, предельное напряжение сдвига, восстановление структуры мази после нагрузки (тиксотропные свойства) показали, что мазь относится к дисперсным системам с тиксотропным типом структуры, для которых характерны упруго-вязкие свойства.

Механическую стабильность мази рассчитывали как отношение предела прочности структуры не разрушенной системы (τ_1) к величине предела прочности структуры системы, подвергнутой разрушению в течение 10 мин. во внутреннем цилиндре вискозиметра при скорости 1500 об/мин (τ_1').

$$MC = \frac{\tau_1}{\tau_1'}$$

Для мази с двухфазным экстрактом на сплаве ПЭГ механическая стабильность составила 1,24, а для самой основы 1,94. Результат исследований указывает на конденсационный характер внутрисистемной связи, легкость восстановления мазевой структуры после разрушений (механических воздействий) и подтверждает стабильность в процессе хранения и транспортировке. Отражается и влияние концентрации и природы входящего экстракта на формирование структуры дерматологической мази. Результаты шести параллельных определений показали, что мазь обладает хорошей намазывающей способностью (3,1мм) и прилипаемостью (21).

Разрабатываемая дерматологическая мазь предлагается для использования при лечении гнойных ран. Поэтому необходимо, чтобы она обладала достаточной осмотической активностью, определяющей высокую специфическую активность мази в первой фазе раневого процесса, когда рана характеризуется наличием некротических масс. В этом случае сама основа выступает как активный компонент, оказы-

вающий дренирующее действие при очищении раневой поверхности, впитывая раневое отделяемое и оказывая потенцирующее действие на лечебный эффект мази в целом. Осмотическую активность изучали по упрощенной модели диализа в приборе, представляющем собой стеклянную трубку диаметром 30мм, оба конца которой закрыты целлофановой пленкой [5]. В качестве мембраны использовали целлофан марки Купрофан толщиной 0,45мм с величиной пор 0,025мм. В всех опытах на внутреннюю поверхность одной из пленок наносили навеску испытуемой мази массой 2,0г и помещали этот конец стеклянной трубки в мазь в сосуд с водой очищенной таким образом, чтобы трубка была погружена в воду на 2-3 мм и термостатировали при температуре 37°C в течение 24 часов. В качестве контроля использовали 10% раствор натрия хлорида, который широко применяется при лечении гнойных ран. Величину осмотической активности оценивали гравиметрически при взвешивании диализного блока через каждый час после начала эксперимента, определяя количество абсорбированного раствора. Количество абсорбированной жидкости (воды очищенной) рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{(M_n - M_0) - (M_n^k - M_0^k)}{M} \cdot 100\%,$$

где P – величина осмотической активности, %;

M_n – масса диализного блока с образцом мазевой композиции в данный момент времени, г;

M_0 – масса диализного блока с образцом мазевой композиции до начала эксперимента, г;

M_n^k – масса диализного блока в контрольном опыте в данный момент времени, г;

M_0^k – масса диализного блока в контрольном опыте до начала эксперимента, г.

Через каждый час диализную трубку с навеской мази вынимали и взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,001г. Увеличение массы трубки свидетельствовало о количестве поглощенной жидкости мазевой композицией по сравнению с первоначальной массой. Диализ проводили до постоянной, неизменяющейся массы исследуемой системы.

Результаты изучения осмотической активности мазевых композиций с двухфазным экстрактом почек тополя черного (в первые 6 часов) отражены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты изучения осмотической активности

Время экспозиции, ч	Величина осмотической активности (поглощено воды, %)	
	Мазевая основа (сплав ПЭГ)	Мазь с двухфазным экстрактом
1	19,00±0,01	27,00±0,02
2	23,00±0,02	31,50±0,02
3	36,00±0,02	39,00±0,02
4	38,00±0,01	48,00±0,01
5	44,50±0,02	56,00±0,01
6	49,00±0,01	78,50±0,02

Исследования позволили доказать высокую осмотическую активность разрабатываемой мази, приготовленной на сплаве ПЭГ. Она обладает выраженной поглощающей способностью – до 420% жидкости от первоначальной массы мази при продолжительности действия 18 часов и может быть рекомендована при тяжелых гнойных процессах, характеризующихся обильной экссудацией.



Опытные образцы мази в эксперименте *in vivo* показали значительное ранозаживляющее и противовоспалительное действие. На основании проведенных исследований была составлена технологическая схема производства мази с почек тополя черного двухфазным экстрактом жидким на сплыве ПЭГ.

Контроль качества дерматологической 20% мази на основе двухфазного экстракта из почек тополя черного проводили по таким показателям как органолептические свойства, однородность, рН мази, коллоидная стабильность, подлинность и количественное содержание действующих веществ. Потенциометрически определено рН разработанной мази-6,53. Структурную стабильность определяли путем центрифугирования после приготовления мази, а также после 48 часов хранения в различных температурных условиях (5°C, 20°C, 34°C). Результаты исследования показали, что мазь на сплыве ПЭГ обладает коллоидной стабильностью после хранения при указанных температурах, разделение фаз не наблюдалось.

Согласно литературным данным антибактериальная и противовоспалительная активность почек тополя обусловлена наличием флавоноидов в частности пиноцембрина и пиностробина [8,12]. К доминирующим компонентам экстракта из почек тополя черного относятся также фенилпропаноиды – гидроксикоричные кислоты, обладающие подобным спектром действия [8]. Почки тополя содержат эфирное масло, в основном терпеноидной природы, которое также вносит вклад в противовоспалительное и антибактериальное действие [1]. В соответствии с вышеизложенным, представлялось целесообразным провести определение основных действующих веществ, обуславливающих фармакологическую активность полученной мази. Для качественного определения флавоноидов использовали химические реакции: с раствором железа (III) (черно-зеленое окрашивание), с раствором аммиака (оранжевое), с концентрированной кислотой хлористоводородной (красно-оранжевое) [12].

Учитывая сложный фитохимический состав используемого в составе мази двухфазного экстракта почек тополя, для идентификации флавоноидов (пиностробина и пиноцембрина) предложен метод ТСХ в системе растворителей спирт этиловый – хлороформ (9:1), проявитель – диазореактив [4]. Полученные значения R_f (0,8 и 0,71) подтвердили присутствие указанных БАВ в мази.

Изучение УФ-спектра спиртовых растворов мази в области 220-380-нм показало, что имеется максимум поглощения при длине волны 289 ± 2 нм, совпадающий с раствором пиностробина [4]. Это позволяет рекомендовать указанный метод для идентификации флавоноидов в мази. С целью качественного обнаружения пропаноидов (гидроксикоричных кислот) также использовали метод ТСХ в системах растворителей *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5). Полученные хроматограммы просматривали в УФ-свете и обрабатывали диазореактивом. По совпадению R_f спиртового раствора мази с R_f СОВС были идентифицированы: феруловая кислота (R_f 0,85), кумаровая кислота (R_f 0,13) и кофейная кислота (R_f 0,31).

Присутствие в мази БАВ терпеноидной структуры, содержащихся в масляной фракции двухфазного экстракта, было подтверждено реакцией с раствором ванилина в концентрированной хлористоводородной кислоте. Наблюдали появление малиново-красного окрашивания [4].

Таблица 3

Содержание суммы флавоноидов в мази

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность	Содержание суммы флавоноидов	Метрологические характеристики
1.	0,2045	0,331	0,148	$X_{cp}=0,147$
2.	0,2036	0,325	0,146	$S^2=7,8 \cdot 10^{-6}$
3.	0,1992	0,326	0,149	$S=0,003$
4.	0,2104	0,334	0,145	$S_x=0,0012$
5.	0,2096	0,327	0,142	$\Delta X=0,003$
6.	0,2059	0,336	0,149	$\varepsilon=2,04\%$

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в анализируемой мази мы учитывали данные литературы о том, что прямое спектрофотометрическое определение исходного экстракта и дифференциальное на основе реакции с алюминия хлоридом дают сопоставимые результаты. Поэтому для количественного анализа мази был использован метод прямой спектрофотометрии при длине волны 289 нм. Расчет содержания суммы флавоноидов в мази в пересчете на пиностробин проводили по удельному показателю поглощения пиностробина (685) [8]. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Как свидетельствуют экспериментальные данные, количественное содержание флавоноидов в мази составляет $0,147 \pm 0,003\%$. Относительная погрешность анализа находится в пределах $\pm 2,04\%$. Предложенные методики оценки качества мази на основе двухфазного экстракта почек тополя можно рекомендовать для стандартизации ее качества.

Выводы: Разработан состав дерматологической мази, содержащей двухфазный экстракт почек тополя черного, обладающий антимикробным действием. Разработаны методики качественного и количественного определения флавоноидов в мази.

Литература

1. Антимикробная активность экстрактов и эфирных масел почек некоторых видов *Populus L.* / В. Б. Браславский, В. А. Куркин [и др.] // Растительные ресурсы. – 1991. – Т. 27, вып. 2. – С. 77 – 81.
2. Багирова, В.Л. Мази. Современный взгляд на лекарственную форму / В.Л. Багирова, Н.Б. Демина, Н.А. Кулинченко // Фармация. – 2002. – №4. – С. 24-26.
3. Валь, Е.И. Препараты из растительного сырья: отраслевая проблема / Е.И. Валь // Ремедиум.-2001.-№1-2.-С.38-40.
4. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа /МЗ СССР. – 11-е изд. Доп. – М.: Медицина,1987. – Вып. 1. – 336с.
5. Гунько, В.Г. Изучение осмотической активности некоторых мазевых основ / В.Г. Гунько, А.А. Гунько, Н.М. Мушенко // Хим. – фармац. журн. – 1982. – № 3. – С. 83 – 91.
6. Гунар, О.В. Определение антимикробного действия лекарственных веществ – практические подходы / О.В. Гунар, Н.И. Каламова, Н.С. Евтушенко // Фармация. – 2002. – №2. – С. 4-7.
7. Каухова, И.Е. Особенности экстрагирования БАВ двухфазной системой экстрагентов при комплексной переработке лекарственного растительного сырья /И.Е. Каухова // Растительные ресурсы. – 2006. – Вып.1. – С. 82 – 90.
8. Количественное определение суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в почках некоторых видов *Populus L.* / В.Б. Браславский, В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная [и др.] // Растит. ресурсы. – 1991. – Т. 27, вып. 3. – С. 130-134.
9. Куркин, В.А. Стандартизация сырья и препаратов тополя и прополиса /А.А. Куркин, В.Б. Браславский // Фармация. – 2009. – №4. – С. 53-55.
10. Никитина, Н.В. Изучение возможности использования почек тополя черного для антимикробного препарата / Н.В. Никитина, Т.И. Максименко [и др.] // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы VII Международ. съезда. – СПб, 2003. – С. 80-82.
11. Никитина, Н.В. Изучение условий получения двухфазного экстракта из тополя черного почек (*Populus nigra L.*), семейства *Salicaceae* и его анализ / Н.В. Никитина, С.Н. Степанюк // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2009. – Вып. 64. – С.198-199.
12. Сенцов, М.Ф. Исследование химического состава почек тополя черного / М.Ф. Сенцов, В. Б. Браславский, В.А. Куркин // Растительные ресурсы. – 1996. – Т. 32. – вып. 1-2. – С. 100-105.
13. Тенцова, А.И. Современные аспекты исследования и производства мазей / А.И. Тенцова, В.И. Грецкий. – М.: Медицина, 1980. – 192 с.
14. Цагарешвили, Г.В. Консистентные свойства мягких лекарственных средств и методы их определения / Г.В. Цагарешвили, Г.С. Башура. – Тбилиси: Мецниереба, – 1969. – С.96.

DEVELOPMENT OF DERMATOLOGICAL OINTMENT WITH EXTRACT OF GEMMAE POPULI NIGRAE

N.V. Nikitina
S.N. Stepanuk

*Pjatiqorsk State
Pharmaceutical Academy*

e-mail: n_niki7@mail.ru

New soft medicinal forma – 20% ointment with extract of gemmae Populi nigrae on the basis of PEG. Optimum conditions of the technology and technological properties were determined. Ointment showed high degree of bioavailability in the experiment in vitro. Antimicrobial properties of ointment against strains of gram-positive and gram-negative bacteria were investigated. The techniques of standardization of flavonoids in the new herbal preparation – ointment with an extract of gemmae Populi nigrae were developed. Quantitative determination of flavonoids in the ointment conducted by spectrophotometry. A relative error of determination with confidence probability $P=95\%$ is not more than 2,04%.

Key words: ointment, extract of gemmae Populi nigrae, flavonoids.